



**Universidade
Católica de Brasília**

**Pró-Reitoria Acadêmica
Escola de Saúde e Medicina**

**Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Genômicas e
Biotecnologia**

**VALIDAÇÃO *in planta* DE POTENCIAIS GENES NO
CONTROLE DE FITONEMATOIDES, VIA TECNOLOGIA DE
RNA INTERFERENTE**

**Autor: Paolo Lucas Rodrigues Silva
Orientadora: Dra. Maria Fatima Grossi-de-Sa
Coorientadora: Dra. Maria Eugênia Lisei-de-Sá**

**Brasília - DF
2020**

PAOLO LUCAS RODRIGUES SILVA

**VALIDAÇÃO *in planta* DE POTENCIAIS GENES NO CONTROLE DE
FITONEMATOIDES, VIA TECNOLOGIA DE RNA INTERFERENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Maria Fatima Grossi-de-Sa
Coorientadora: Dra. Maria Eugênia Lisei-de-Sá

S586v Silva, Paulo Lucas Rodrigues.
Validação *in planta* de potenciais genes no controle de fitonematoides, via tecnologia de RNA interferente / Paulo Lucas Rodrigues Silva – 2020.
131 f.; il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Brasília, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Maria Fatima Grossi-de-Sa.
Coorientação: Dra. Maria Eugênia Lisei-de-Sá

1. Parasitismo. 2. Prova de conceito. 3. Silenciamento gênico. I. Grossi-de-Sa, Maria Fatima, orienta. II. Lisei-de-Sá, Maria Eugênia, coorienta. III. Título.

CDU 613.98



Dissertação de autoria de **PAOLO LUCAS RODRIGUES SILVA**, intitulada “VALIDAÇÃO *in planta* DE POTENCIAIS GENES NO CONTROLE DE FITONEMATOIDES, VIA TECNOLOGIA DE RNA INTERFERENTE”, apresentada como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, em **31 de julho de 2020**, defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Profa. Dra. Maria Fátima Grossi de Sá
Orientador
(Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia–UCB)

Dra. Maria Eugenia Lisei de Sá
Coorientadora
(Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Centro Tecnológico do Triângulo e Alto Paranaíba)

Prof. Dr. Nicolau Brito da Cunha
Membro Interno
(Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia – UCB)

Dr. Fabrício Barbosa Monteiro Arraes
Membro Externo
(Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

Dra. Isabela Tristan Lourenço Tessutti
Suplente
(Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

AGRADECIMENTO

Às minhas irmãs Paola Santos e Juliana Affe que da mesma forma como foi na minha graduação sempre confiaram em mim, me deram apoio, preocupação e tiveram demais atitudes que me ajudaram a finalizar esse projeto. Amo vocês.

À Dra. Maria Fatima Grossi-de-Sa, pela orientação, confiança, paciência, pelo conhecimento transmitido, apoio e pelas diversas oportunidades que tive durante o mestrado. Muito obrigado.

À Dra. Maria Eugênia pela coorientação, pelo conhecimento passado, pela paciência, por todo carinho e palavras de sabedoria, além, claro, de todo apoio no projeto.

Ao Dr. Nicolau Brito, Dr. Fabrício Arraes e a Dra. Isabela Lourenço pela avaliação do projeto desenvolvido e por todo apoio ao decorrer do mestrado.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga (LIMPPI) e da UCB, principalmente aqueles que, em algum momento, contribuíram com este projeto. Agradeço especialmente a Dra. Carolina Morgante e Dr. Fabrício Arraes por toda ajuda e ensinamento na realização e análise da RT-qPCR, o que foi um grande desafio. A Dra. Isabela Lourenço por todo auxílio com a realização da parte microscópica das galhas do algodão e com a ajuda na transformação do tabaco. E a Gilanna Ferreira pelo auxílio na contagem de galhas.

Também merecem o meu agradecimento especial os amigos Camila de Jesus, Carol Caetano, Juliana Arruda, Leonardo Kretzer, Lorrana Flores, Luanna Pinheiro, Lukas Brayán, Mara Alice, Martha Bravo, Rafael Pacheco e Thuanne Ribeiro que me ajudaram nos momentos em que mais precisei desabafar e relaxar em momentos fora do trabalho, sem vocês eu estaria perdido.

Ao estudante de iniciação científica João Pedro Abreu por todo suporte na execução do projeto. Por confiar e me ajudar, além de todo conhecimento que pudemos compartilhar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia (UCB) pela confiança em me aceitar como aluno e por todo conhecimento obtido pelo excelente e inspirador corpo docente.

Por fim, agradeço à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo fornecimento de toda a estrutura e pelos recursos disponibilizados. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro durante todo o período do mestrado e ao Instituto Mato-Grossense do Algodão (IMAmt) e Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCTs) pela parceria e apoio para a realização deste projeto.

“Se você não gosta do seu destino, não aceite. Em vez disso, tenha a coragem de o mudar do jeito que você quer que seja.” Naruto Uzumaki

RESUMO GERAL

Referência: SILVA, P. L. R. **Validação *in planta* de potenciais genes no controle de fitonematoides, via tecnologia de RNA interferente.** 2020. 131 p. Dissertação de mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2020.

Existem cerca de 4 mil espécies de nematoides parasitas de plantas descritas mundialmente e, dentre estas, os nematoides formadores de galhas (NFG) (*Meloidogyne* spp.), compõem um dos gêneros economicamente mais importantes. Os métodos atuais de controle de fitonematoides são danosos ao meio ambiente e possuem alto custo, fazendo-se necessário, portanto, novos meios de manejo. Nos últimos anos, a tecnologia de RNA interferente (RNAi) emergiu como uma ferramenta biotecnológica em potencial para controlar populações de fitonematoides por meio do silenciamento de genes essenciais à sobrevivência e/ou de genes efetores capazes de suprimir a resposta de defesa do hospedeiro. Nesse contexto, o Capítulo 1 deste estudo objetivou realizar prova de conceito em plantas de algodão geneticamente modificado (GM), expressando moléculas de dsRNAs, utilizando uma construção gênica com fragmentos de dsRNAs para os genes para cisteína protease (*Mi-cpl*), isocitrato liase (*Mi-icl*) e fator de *splicing* (*Mi-fs*), *in tandem*, denominada *dsMinc1*, visando a obtenção de resistência ao fitonematoide *Meloidogyne incognita*. Os dados apresentados reforçam o papel fundamental desses genes no metabolismo, desenvolvimento/parasitismo e reprodução do fitonematoide, uma vez que a redução da expressão dos mesmos, levou a uma diminuição no sucesso reprodutivo do fitonematoide (redução de galhas g⁻¹ raiz, massa de ovos g⁻¹ raiz e fator de reprodução (FR)). Assim, foram selecionadas três progênies na geração T₃, oriundas de três eventos de transformação independentes (*dsMinc1*-10.16.3, *dsMinc1*-20.39.3 e *dsMinc1*-64.15.1), que demonstraram grande potencial no controle deste fitonematoide. Em paralelo, o Capítulo 2 teve como finalidade validar a participação de cinco potenciais genes efetores (*Minc3s01206g21700*, *Minc3s00292g09561*, *Minc3s00280g09294*, *Minc3s01217g21793* e *Minc3s01635g25253*) de *M. incognita* em inibir o sucesso parasitário e/ou reprodutivo deste fitonematoide em plantas de *Nicotiana tabacum* GM, transformadas, via *Agrobacterium*. Diante da provável função efetora desses genes (predita *in silico*), foi realizado o perfil cinético de expressão dos cinco genes avaliados, revelando-os como importantes nos processos de penetração e migração (fases iniciais) em raízes de plantas, além da sua provável participação nos estádios finais do ciclo do fitonematoide. As plantas de tabaco GM T₁, contendo as construções de dsRNAs dos cinco genes, assim como as plantas controle (WT) estão sendo desafiadas contra *M. incognita*. A caracterização molecular e o desafio das plantas com *M. incognita* estão ainda em andamento, para determinar o papel destes genes no parasitismo e/ou reprodução desse fitonematoide, o que incluirá a realização de novos bioensaios, em gerações posteriores. As informações aqui apresentadas fornecem subsídios para o desenvolvimento de estratégias de controle de fitonematoides ambientalmente sustentáveis, confirmando, assim, a importância da aplicação do uso da tecnologia do RNAi para a obtenção de cultivares GM de importância econômica.

Palavras-chave: Parasitismo. Prova de conceito. *Meloidogyne incognita*. *Gossypium hirsutum*. silenciamento gênico.

ABSTRACT

There are about 4 thousand species of plant-parasitic nematodes described worldwide. Among those, root-knot nematodes (RKN) (*Meloidogyne* spp.) belong to one of the most economically important genera. The available phytonematodes control methods are harmful to the environment, expensive, becoming necessary; therefore, new means of management. In recent years, interfering RNA (RNAi) technology has emerged as a potential biotechnological tool for controlling populations of phytonematodes by silencing genes essential for survival and/or effector genes capable of suppressing the host's defense response. In this context, Chapter 1 of this study aimed to carry out proof of concept on genetically modified (GM) cotton plants, expressing dsRNA molecules, using a cassette construct with dsRNA fragments for the genes for cysteine protease (*Mi-cpl*), isocitrate lyase (*Mi-icl*), and splicing factor (*Mi-fs*), *in tandem*, called *dsMinc1*, with the objective of obtaining resistance to the phytonematode, *Meloidogyne incognita*. The data presented reinforce the fundamental role of these genes in the metabolism, development/parasitism, and reproduction of the phytonematode, since the decrease in their expression, led to a reduction in the reproductive success of the phytonematode (reduction of galls g⁻¹ root, mass of eggs g⁻¹ root and reproduction factor (RF)). Thus, three T₃ progenies were selected, originating from three independent transformation events (*dsMinc1*-10.16.3, *dsMinc1*-20.39.3, and *dsMinc1*-64.15.1), which demonstrated great potential in the control of this phytonematode. In parallel, Chapter 2 aimed to validate the participation of five potential effector genes (*Minc3s01206g21700*, *Minc3s00292g09561*, *Minc3s00280g09294*, *Minc3s01217g21793*, and *Minc3s01635g25253*) of *M. incognita* to inhibit the parasitic success of this parasite and/or transformed via *Agrobacterium*. In view of the probable effector function of these genes (predicted *in silico*), the kinetic profile of expression of the five evaluated genes was performed, revealing them as important in the processes of penetration and migration (initial phases) in plant roots, in addition to their probable participation in the final stages of the phytonematode cycle. The GM tobacco T1 plants, containing the dsRNA fragments for the five genes and plant control (WT), are being challenged against *M. incognita*. The molecular characterization of tobacco GM and phytonematode challenge are still in progress to determine the role of these genes in parasitism and/or reproduction of this phytonematode; thus, conducting new bioassays in later generations are still necessary. The information presented here provides subsidies for the developing of new strategies to control these environmentally sustainable phytonematodes, thus confirming the importance of applying RNAi technology to obtain GM cultivars of economic importance.

Keywords: parasitism. proof of concept. *Meloidogyne incognita*. *Gossypium hirsutum*. gene silencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Ciclo de vida do nematoide-das-galhas *Meloidogyne* sp. J1 = juvenil do primeiro estágio, J2 = juvenil do segundo estágio, J3 = juvenil do terceiro estágio e J4 = juvenil do quarto estágio. 19
- Figura 2 – Ilustração esquemática do mecanismo de interferência por RNA a partir de dsRNAs em fitonematoides. A molécula de RNA de fita dupla (dsRNA) se liga a uma proteína DICER, de um modo dependente de ATP que exibem 2 nucleotídeos (nt) salientes nas suas extremidades 3', que a divide em pequenos RNAs interferentes (siRNAs); esses siRNAs se ligam a proteínas parte do Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC). O RISC separa os siRNAs em duas fitas: uma das fitas é degradado enquanto a outra serve como uma sonda de busca, que liga o RISC a alvos complementares de RNA. Após esse reconhecimento, ocorre a formação do complexo siRNA/mRNA, a enzima argonauta RNaseH (Slicer) identifica e cliva (degrada) esse RNA de cadeia simples carregado (ssRNA), causando o silenciamento gênico. 23
- Figura 3 – Mecanismo de RNAi mediado por plantas em nematoides parasitas de plantas. Moléculas de dsRNAs são produzidas no citoplasma de células vegetais como RNA *hairpin*, produzido por plantas transgênicas (com uma sequência em orientação senso e anti-senso, separadas por uma região não codificante). Os dsRNAs podem ser ingeridos pelos fitonematoides, por meio dos tubos de alimentação. Alternativamente, as moléculas de dsRNAs são processadas pela maquinaria de RNAi da planta e os siRNAs são ingeridos pela espécie alvo. 26

Figuras do Capítulo 1

- Figura 1.1 – Mapa da produção agrícola do algodão no Brasil. Os números dentro do mapa representam o valor absoluto da produção do algodão em mil toneladas. 40
- Figura 1.2 – Cassete de expressão *dsMinc1*. Representação esquemática do cassete de expressão *dsMinc1* (10.781 pb) contendo fragmentos de dsRNAs, *in tandem* senso e anti-senso provenientes de três diferentes genes de *M. incognita* (*Mi-cpl*, *Mi-icl* e *Mi-fs*) sob o controle do promotor *uceS8.3*, seguido pelo terminador *Nos* (*T-nos*). Bordas esquerda e direita do vetor binário (LB e RB - *left e right borders*), respectivamente. Os marcadores de herbicidas incluíram o gene da aceto-hidroxiácido sintase (*ahas*), controlado por seu promotor e terminador (*ahas-t*), e o gene de resistência ao glufosinato de amônia (*bar*), controlado pelo promotor duplicado 35S do vírus do mosaico da couve-flor (35S 2x) e *T-nos*. 477
- Figura 1.3 – *Pipeline* experimental utilizado para identificar e caracterizar eventos de algodão GM expressando as moléculas de dsRNAs da construção *dsMinc1*. Após bombardear embriões de algodão (cultivar BRS 372) com cassetes linearizados da construção *dsMinc1*, as plantas de algodão transformadas foram selecionadas por resistência ao Imazapir, conferida pelo gene *ahas*. Uma vez aclimatados em casa de vegetação, as plantas T₀ foram caracterizadas pela expressão do gene *bar*, imunodetectação pelo Kit LibertyLink[®] e também selecionadas pela amplificação do gene *bar* por PCR (377 pb). Dessa forma, foram selecionados sete eventos de transformação de algodão T₀. Aleatoriamente, foram selecionados 3 eventos para o avanço de geração (*dsMinc1*-10, *dsMinc1*-20 e *dsMinc1*-64). A geração de algodão GM T₁ foi caracterizada por PCR, como na geração T₀. Dessa forma, foram selecionadas três plantas PCR positivas para cada evento de transformação T₀ selecionado (*dsMinc1*-10.13, *dsMinc1*-10.16 e *dsMinc1*-10.19; *dsMinc1*-20.19, *dsMinc1*-20.25 e *dsMinc1*-20.39; *dsMinc1*-64.2, *dsMinc1*-64.8 e *dsMinc1*-64.15) para constituir a geração T₁. Foi escolhido aleatoriamente um evento de cada planta de algodão GM (*dsMinc1*-10.16, *dsMinc1*-20.39 e *dsMinc1*-64.15) para o avanço de geração. Foram semeadas dez sementes de algodão T₂, as quais foram caracterizadas

fenotipicamente em relação à resistência ao fitonematoide *M. incognita* e pela amplificação do gene *bar*, por PCR (377 pb). As plantas que apresentaram fenótipos com maior nível de resistência (*dsMinc1*-10.16.3, *dsMinc1*-20.39.3 e *dsMinc1*-64.15.1), quando comparados aos controles de susceptibilidade (BRS 372 e FM 966), foram selecionados para obtenção da geração T₃. Foram semeadas dez plantas de algodão T₃, que foram caracterizadas da mesma maneira que a geração T₂. Legenda: ⊗: autofecundação.....576

Figura 1.4 – Caracterização de plantas de algodão da geração T₂ transformadas com *dsMinc1* e desafiadas contra *M. incognita*. Cada barra representa um total de 10 plantas avaliadas. (a) padrão de galhas observados nas raízes de plantas de algodão e suas respectivas notas. (b) Porcentagem de plantas suscetíveis (nota 1, pontilhado), moderadamente suscetíveis (nota 2, cinza escuro) e resistentes (nota 3, preto) de acordo com o índice de galhas. As progênes T₂, oriundas de três eventos de transformação, foram avaliadas quanto ao índice de galhas em relação aos controles de suscetibilidade (WT – BRS 372) e de resistência (M-315). (c) Porcentagem de plantas selecionadas por amplificação do gene *bar* por PCR (377 pb) das progênes T₂ resistentes (nota 3) no bioensaio contra *M. incognita*; PCR positivo para plantas (preto); plantas PCR negativo (cinza escuro).....59

Figura 1.5 – Efeito das moléculas de dsRNAs do cassete de expressão *dsMinc1* no desenvolvimento e reprodução de *M. incognita* em plantas de algodão GM. (a) Número de galhas g⁻¹ de raiz induzidas; (b) FR (fator de reprodução) e (c) o número de massas de ovos g⁻¹ de raiz de *M. incognita* em diferentes linhagens T₃ (*dsMinc1*-10.16, *dsMinc1*-20.39 e *dsMinc1*-64.15), controle de suscetibilidade BRS 372 (WT) e de resistência (M-315) são mostrados aos 120 DAI. Barras indicam os erros padrão dos dados médios (n = 3-7) e os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste t de Student (*p* < 0,05), em comparação com plantas de controle não GM (WT).....60

Figura 1.6 – Amplificação de regiões gênicas no cassete de expressão *dsMinc1* em algodão T₃. Gel de agarose 1% contendo amplificação do fragmento do gene de seleção *bar* de 377 pb (a) e do promotor *uceS8.3* de 257 pb (b). (WT): planta não transformada utilizada como controle negativo; (-): água usada como controle negativo da reação de PCR; (+): controle positivo – cassete de expressão *dsMinc1*; M: marcador em pares de bases (pb) (*Ladder 1kb plus* (Invitrogen®)).610

Figura 1.7 – Análise macroscópica de raízes de plantas de algodão mostrando que a intensidade de galhas provocadas por *M. incognita* foi comparativamente maior nas plantas controle do que nas progênes das plantas GM T₃, aos 120 DAI. As setas amarelas indicam a posição das galhas na raiz de cada planta avaliada. WT, algodão não transformado (BRS 372), M-315, genótipo de algodão utilizado como padrão de resistência.621

Figura 1.8 – Análise histológica de tecidos de galhas de linhagens de algodão WT (BRS 372) e GM em imagens de campo claro de seções longitudinais de galhas de algodão coradas com azul de toluidina. Controle WT (BRS 372); controle de resistência (M-315). (*) células gigantes e locais de alimentação; (n) fitonematoide. As setas vermelhas indicam elementos do xilema. As setas pretas indicam células gigantes malformadas apresentando parede celular como material manchado, sugerindo tentativa de mitose. Barras = 50 μm.....64

Figura 1.9 – Caracterização média dos níveis relativos de acúmulo de transcritos por RT-qPCR dos genes presentes no *dsMinc1* de galhas em plantas de algodão infectados por *M. incognita*, coletados de plantas de algodão GM T₃ (*dsMinc1*-10.16.3, *dsMinc1*-20.39.3 e *dsMinc1*-64.15.1) e WT. (a) Expressão relativa do gene *Mi-cpl*; (b) expressão relativa do gene *Mi-icl*; (c) expressão relativa do gene *Mi-fs*. As barras indicam os erros padrão dos dados médios (n = 3). Diferenças significativas foram avaliadas pelo teste de Turkey, no qual a expressão gênica de

Mi-cpl, *Mi-icl* e *Mi-fs* em galhas de diferentes eventos de transformação de plantas de algodão foram comparadas às plantas controle WT (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). 66

Figuras do Capítulo 2

Figura 2.1 – *Pipeline* de filtragem de proteomas de NFG para identificação de novos candidatos a efetores. O *pipeline* ilustra as principais etapas de seleção *in silico*, a partir dos dois conjuntos completos de proteínas (*M. incognita* e *M. hapla*), que permitiu a identificação de novos alvos não redundantes para o desenvolvimento de métodos de controle específicos e mais seguros. NFG: nematoide formador de galha; NFC: nematoide formador de cisto; V.1: versão 1; V.3: versão 3; *Blacklisted*: cordados, anelídeos, moluscos e plantas. 79

Figura 2.2 – Mapas dos vetores e regiões dos genes, utilizados nas construções para os experimentos de silenciamento gênico, via RNAi *in planta*. As sequências alvo e os vetores binários modulares dos genes *Minc3s01206g21700* (a), *Minc3s00292g09561* (b), *Minc3s00280g09294* (c), *Minc3s01217g21793* (d) e *Minc3s01635g25253* (e) é representado esquematicamente. Mostrando também, as regiões específicas selecionadas para serem alvo de silenciamento via RNAi de cada gene. A expressão dos dsRNAs é dirigida pelo promotor constitutivo, *uceS8.3*. Quando o dsRNA é expresso na planta hospedeira, é produzido um RNA em *hairpin* (hpRNAi), separado por *intron*. Os nucleotídeos inicial e final das regiões escolhidas estão demarcadas e identificados. 82

Figura 2.3 – Amplificação dos amplicons dos potenciais genes efetores. Gel de agarose 1%, demonstrando a reação de PCR de colônia das *A. tumefaciens*, transformadas com as construções *Minc3s01206g21700*, *Minc3s00292g09561*, *Minc3s00280g09294*, *Minc3s01217g21793* e *Minc3s01635g25253*, contendo amplificação do fragmento da sequência de ligação do *intron* da piruvato desidrogenase quinase (PDK) de aproximadamente 600 pb. (-): água usada como controle da reação de PCR; (+): controle positivo – cassete de expressão do gene; M: marcador em pares de bases (pb) (*Ladder 1kb plus* (Invitrogen®)). 93

Figura 2.4 – Seleção de plantas de *N. tabacum* GM T₀. (a) Seleção *in vitro* de *N. tabacum* após transformação com *A. tumefaciens*. Os explantes foram transferidos para meios seletivos e indutores, de acordo com a fase de desenvolvimento da planta. Após o enraizamento das plantas em meio de cultura, (b) as plantas foram transferidas para solo em casa de vegetação, onde foram aclimatadas e tiveram seu material genético amplificado por PCR para seleção. MS (sacarose e *Gamborg's Vitamin Solution*); MS0 (sacarose, fitagel, *Gamborg's Vitamin Solution*, Cx, BAP, NAA e KanR); MS1 (sacarose, fitagel, *Gamborg's Vitamin Solution*, Cx e KanR). 94

Figura 2.5 – Seleção de plantas GM T₁ de *N. tabacum* em meio MS com KanR 100 µg mL⁻¹. WT: planta não transformada que não germinou na placa de seleção. GM: planta transgênica que geminou e cresceu na placa de seleção. 954

Figura 2.6 – Amplificação dos potenciais genes efetores em *N. tabacum* T₁. Gel de agarose 1% contendo amplificação do fragmento do gene de seleção *bar* de aproximadamente 377 pb. (a) *ds21700.1*, (b) *ds9561.11*, (c) *ds9294.2*, (d) *ds9294.3*, (e) *ds9294.4*, (f) *ds21793.3*. (WT): planta não transformada utilizada como controle negativo; (-): água usada como controle negativo da reação de PCR; (+): controle positivo – cassete de expressão do gene; M: marcador em pares de bases (pb) (*Ladder 1kb plus*). 95

Figura 2.7 – Efeito das moléculas de dsRNAs no desenvolvimento e reprodução de *M. incognita* em plantas de tabaco T₁. (a) O número de galhas g⁻¹ de raiz não foi significativamente diferente ($p < 0,05$) nas linhagens GM e no WT. (b) O FR (fator de reprodução) de *M. incognita* não diferiu significativamente ($p < 0,05$) nas raízes WT em comparação com as linhagens GM. As barras indicam os erros padrão dos dados médios (n = 3-5) e as diferentes letras são significativamente diferentes pelo teste Tukey ($p < 0,05$) entre os tratamentos. 97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes alvo do fitonematoide *M. incognita*, potencialmente envolvidos na infecção e/ou no seu desenvolvimento, relatados pelo uso da tecnologia RNAi.....27

Tabelas do Capítulo 1

Tabela 1.1 – Oligonucleotídeos utilizados na caracterização molecular de plantas de algodão GM, transformadas com o cassete de expressão *dsMinc1*, e na avaliação do silenciamento de *M. incognita*.....50

Tabela 1.2 – Relação das progênies T₀ de algodão transformado com o cassete de expressão *dsMinc1* e seus respectivos números de cópias do transgene estimado pela técnica de qPCR.56

Tabelas do Capítulo 2

Tabela 2.1 – Oligonucleotídeos utilizados nas caracterizações moleculares de *A. tumefaciens*, *N. tabacum* GM e na avaliação do silenciamento de *M. incognita*.85

Tabela 2.2 – Resumo das sequências codificantes (CDS) das proteínas candidatas a efetores selecionadas para alvos de silenciamento gênico. LTS (*Lenght Target Sequence*), tamanho do gene alvo selecionado para silenciamento gênico e a porcentagem de bases GC, determinadas como parâmetros de escolha dessas sequências que se estão sublinhadas e em negrito.91

Tabela 2.3 – Repetições de plantas GM de cada construção submetidas ao bioensaio contra *M. incognita*.96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
µmol	micromolar
a.C.	antes de Cristo
ACT	actina
ahas	aceto-hidroxiácido sintase
BAP	N-Benzil-9-(2-tetrahidropiranyl)-adenina
cDNA	DNA complementar
cm	centímetros
<i>Contigs</i>	seqüências contíguas montadas por alinhamento de <i>reads</i>
CPL	cisteína protease
CTAB	brometo de cetrimônio
Cx	cefotaxima
DAI	dias após a inoculação
DICER	<i>dsRNA-specific RNase III-type endonuclease</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	deoxinucleotídeo
dsRNA	RNA de dupla fita
<i>EFl</i>	fator de elongação
FR	fator de reprodução
Fw	<i>forward</i>
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Gb	gigabases
GM	geneticamente modificado (a)
g	grama
Gt	gentamicina
h	hora
ICL	isocitrato liase
IG	índice de galhas
INRA	<i>Institut national de la recherche agronomique</i>
J2	juvenis de segundo estágio
J3	juvenis de terceiro estágio
J4	juvenis de quarto estágio
kb	quilobase - 1000 pares de bases
kanR	canamicina
L	litro
MgCl	cloreto de magnésio
Mhas	milhões de hectares
miRNA	microRNA
mL	mililitro
mM	milimolar
M-MLV RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>

mRNA	RNA mensageiro
MS	Murashige e Skoog
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFC	nematoides formadores de cisto
NFG	nematoides formadores de galhas
NGS	sequenciamento de próxima geração
NPP	nematoide parasita de planta
nM	nanomolar
nt	nucleotídeos
NTC	<i>No template control</i>
°C	graus Celsius
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Pf	população Final
Pi	população Inicial
PIB	produto Interno Bruto
ppJ2	juvenis de segundo estágio pré-parasitas
qPCR	PCR quantitativo
Rf	rifampicina
RISC	<i>RNA-induced Silencing Complex</i>
RNA	ácido ribonucleico
RNAi	RNA interferente
RT-PCR	transcrição reversa seguida de PCR
RT-qPCR	transcrição reversa seguida de PCR quantitativa
Rv	<i>reverse</i>
s	segundo
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i>
T-DNA	DNA de transferência
THG	transferência horizontal de genes
WT	não transformada (<i>wild type</i>)

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	7
1 INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 Nematoides parasitas de plantas e medidas de controle	18
1.2 Silenciamento gênico via RNA interferente	21
1.3 Potenciais genes envolvidos na resistência de plantas a <i>M. incognita</i> , por meio do silenciamento gênico, mediado por RNAi	25
1.3.1 Silenciamento gênico de genes essenciais de fitonematoides via RNAi ..	29
1.3.2 Silenciamento gênico de genes efetores de fitonematoides via RNAi.....	32
1.4 Promotores gênicos em plantas.....	34
2 OBJETIVO GERAL.....	35
CAPÍTULO 1 – Prova de conceito em algodão: Avaliação do efeito do silenciamento de três genes piramidados no controle de <i>M. incognita</i>	37
RESUMO	37
1 INTRODUÇÃO.....	38
1.1 Histórico do Algodão e sua importância.....	38
1.2 Fitonematoides que afetam a produção do algodão.....	41
1.3 Métodos de transformação de algodão	43
1.4 Algodão geneticamente modificado	44
2 HIPÓTESE	46
3 OBJETIVOS.....	46
3.1 Objetivo geral	46
3.2 Objetivos específicos	46
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 Construção gênica.....	47
4.2 Material vegetal	47
4.3 Transformação das plantas de algodão	48
4.4 Caracterização molecular de plantas de algodão GM.....	49

4.5	Determinação do número de cópias do cassete de expressão <i>dsMinc1</i> no genoma de plantas de algodão GM por meio de qPCR	51
4.6	Multiplicação de fitonematoides e extração dos ovos	51
4.7	Bioensaios de infecção de <i>M. incognita</i> em plantas de algodão GM	52
4.8	Análise morfológica das células gigantes nas plantas expressando <i>dsMinc1</i>	53
4.9	Avaliação do silenciamento dos genes <i>Mi-cpl</i> , <i>Mi-icl</i> e <i>Mi-fs</i> em fitonematoides extraídos das raízes de plantas de algodão GM por PCR em tempo Real (RT-qPCR)	54
4.10	Análise estatística	55
5	RESULTADOS	55
5.1	Transformação e caracterização molecular de plantas de algodão GM	55
5.2	A presença de dsRNAs piramidados nas gerações T ₂ e T ₃ do algodão reduzem a reprodução de <i>M. incognita</i>	58
5.2.1	Avaliação das progênies T ₂	58
5.2.2	Avaliação das progênies T ₃	59
5.3	Raízes de plantas de algodão expressando múltiplas cópias de dsRNAs do cassete de expressão <i>dsMinc1</i> induzem alterações nas células gigantes induzidas por NFG	63
5.4	Análise de expressão relativa dos genes presentes no <i>dsMinc1</i> em fitonematoides extraídos de raízes de plantas de algodão GM	65
6	DISCUSSÃO	66
7	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	73
	CAPÍTULO 2 – Validação de potenciais moléculas efetoras no controle de <i>M. incognita</i> em planta modelo	76
	RESUMO	76
8	INTRODUÇÃO	76
9	HIPÓTESE	79
10	OBJETIVOS	80
10.1	Objetivo geral	80
10.2	Objetivos específicos	80

11	MATERIAL E MÉTODOS.....	80
11.1	Seleção dos fragmentos de potenciais genes efetores de <i>M. incognita</i> e construção gênica	80
11.2	Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	83
11.3	Preparação de células eletrocompetentes	83
11.4	Transformação e seleção das células com plasmídeo de interesse.....	84
11.5	Transformação de <i>N. tabacum</i> via <i>A. tumefaciens</i>	86
11.6	Caracterização molecular de plantas de tabaco GM da geração T ₀	87
11.7	Seleção de progênies de tabaco GM da geração T ₁ em meio seletivo	88
11.8	Cultura de <i>M. incognita</i> e extração dos ovos	88
11.9	Bioensaios de infecção de <i>M. incognita</i> nas progênies de tabaco GM T ₁ ..	89
11.10	Análise estatística.....	89
12	RESULTADOS	89
12.1	Determinação de regiões de cada gene de <i>M. incognita</i> para silenciamento via RNAi	89
12.2	Obtenção de <i>A. tumefaciens</i> com os potenciais genes efetores.....	93
12.3	Transformação de <i>N. tabacum</i> e seleção dos eventos T ₀ e progênies T ₁	93
12.4	Bioensaios com as progênies de tabaco GM T ₁ contra <i>M. incognita</i>	94
13	DISCUSSÃO.....	97
13.1	Tabaco GM expressando dsRNA de potenciais genes efetores não resultou na redução da infecção por <i>M. incognita</i> na geração T ₁	97
14	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	98
15	CONCLUSÃO GERAL	100
16	PERSPECTIVAS GERAIS	100
17	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
18	ARQUIVOS SUPLEMENTARES.....	123
19	PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	130
20	REALIZAÇÕES ACADÊMICAS DURANTE O MESTRADO	131

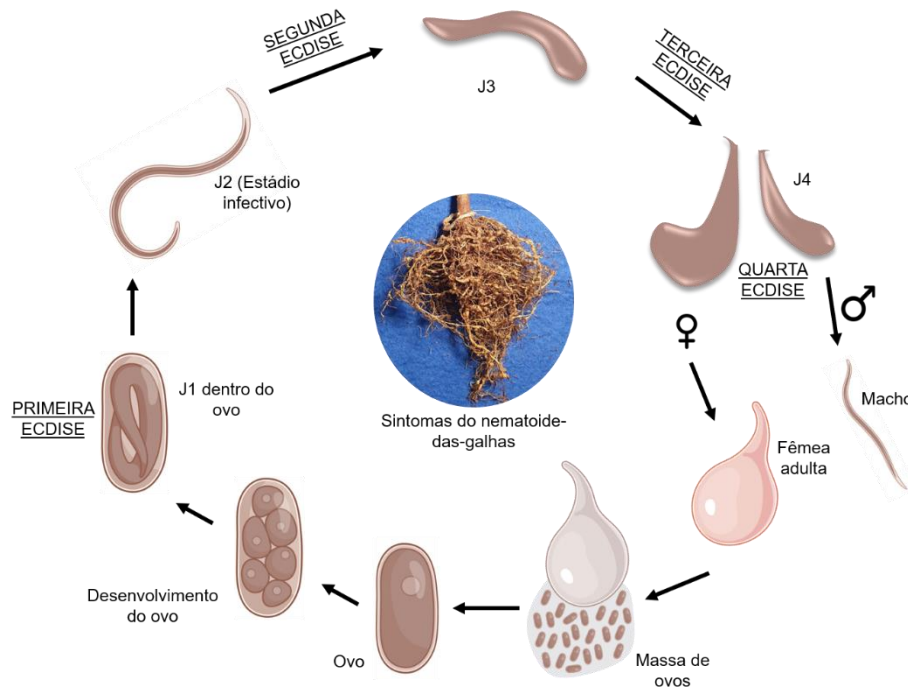
1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 NEMATOIDES PARASITAS DE PLANTAS E MEDIDAS DE CONTROLE

Mundialmente, existem cerca de 4 mil espécies de nematoides parasitas de plantas (NPP) descritas (DECRAEMER; HUNT, 2013). Há dois grupos principais desses fitonematoides: parasitas sedentários e migratórios. As formas sedentárias incluem muitos dos gêneros economicamente mais importantes, tais como os nematoides formadores de galhas (NFG) (*Meloidogyne* spp.) e os nematoides formadores de cisto (NFC) (*Heterodera* spp. e *Globodera* spp.), que são endoparasitas, além de outros gêneros semi-endoparasitas (*Rotylenchulus* spp., *Nacobbus* spp. e *Tylenchulus* spp.). Já os endoparasitas migratórios (*Radopholus* spp. e *Pratylenchus* spp.) permanecem móveis durante todo o seu desenvolvimento e se alimentam de muitas células de plantas, normalmente sem modificação celular prévia (BAKHETIA *et al.*, 2005a; DAVIS; HUSSEY; BAUM, 2009; PERRY; MOENS, 2011).

Existem descritas na literatura quatro raças de *Meloidogyne incognita*, que possuem diferentes hospedeiros, sendo as raças 3 e 4 as mais patogênicas ao algodoeiro (STARR, 1998). No Brasil, a raça 3 é a mais comum (ASMUS *et al.*, 2015). O ciclo de vida dos NFG basicamente apresenta estádios iniciados por ovo, quatro estádios juvenis (J1, J2, J3 e J4, caracterizado pelas ecdises) e a fase adulta (fêmea) (Figura 1). Características como temperatura, umidade e plantas hospedeiras influenciam diretamente no ciclo biológico desses organismos. Geralmente, esses indivíduos atingem a última fase entre três e quatro semanas (FERRAZ; MONTEIRO, 1995).

Figura 1 – Ciclo de vida do nematoide-das-galhas *Meloidogyne* sp. J1 = juvenil do primeiro estágio, J2 = juvenil do segundo estágio, J3 = juvenil do terceiro estágio e J4 = juvenil do quarto estágio.



Há alguns anos atrás, havia pouca informação disponível sobre respostas de defesa por parte das plantas coordenadas por hormônios envolvidos nas relações parasíticas complexas de longo prazo, como interações com fitonematoides de raízes (MARTÍNEZ-MEDINA *et al.*, 2017). No entanto, muito têm-se estudado acerca desse tema nos últimos anos (BALI *et al.*, 2018; GHEYSEN; MITCHUM, 2019; PIYA; BINDER; HEWEZI, 2019; SATO; KADOTA; SHIRASU, 2019). Sabe-se que os NFG podem manipular as defesas de plantas e reprogramar as células. Essas modificações geram sítios de alimentação em áreas das raízes das plantas, que irão fornecer os nutrientes necessários para seu desenvolvimento e reprodução (GHEYSEN; MITCHUM, 2011). O modo de ação dos NFG se inicia no momento da infecção da raiz hospedeira. Nesse processo, ocorre a modificação de uma ou mais células vegetais, o que causa a sua desdiferenciação em um local de alimentação especializado que suporta o desenvolvimento de uma fêmea sedentária, alimentada e reprodutivamente competente. Os NFG de raiz formam células gigantes, por meio da indução de mitoses sucessivas de células vegetais, sem citocinese simultânea (DAVIS *et al.*, 2000, 2008; GRUNDLER; SCHNIBBE; WYSS, 1991; WILLIAMSON; GLEASON, 2003).

A maioria dos fitonematoides possuem um estilete oco, por meio do qual são injetadas secreções das glândulas esofagianas na célula da planta. Com isso, há a formação de um tubo de alimentação que irá assegurar forte vínculo do fitonematoide a essa célula específica, por

onde se dá a ingestão dos nutrientes, disponibilizados pela célula vegetal (MITKOWSKI; ABAWI, 2003). A infecção das raízes ocorre pelos juvenis de segundo estágio pré-parasitas (ppJ2), os quais utilizam sinais químicos da planta, liberados pelas raízes, para localizar e infectar os hospedeiros (WANG; MASLER; ROGERS, 2018), ou seja, a quimiotaxia eficiente para a localização de plantas hospedeiras é crucial. Os ppJ2 entram pelo córtex da raiz, próximo à zona de alongamento celular, e migram para o interior do cilindro vascular em direção à ponta da raiz, onde selecionam de quatro a oito células para induzir sua alimentação. Os estádios J3, J4 e das fêmeas adultas, são encontrados necessariamente nas raízes, configurando sua condição de fitonematoide endoparasita sedentário (NOE, 2010).

Repetidos ciclos de divisão e crescimento celular levam à formação de células gigantes hipertrofiadas e multinucleadas. Essas células gigantes são metabolicamente hiperativas e servem como única fonte dos nutrientes necessários para o desenvolvimento dos NFG. Além disso, a hiperplasia das células circunvizinhas causa a formação de nós radiculares ou galhas macroscopicamente visíveis, nos quais os fitonematoides são incorporados (KYNDT; FERNANDEZ; GHEYSEN, 2014; MEDINA *et al.*, 2017). Com a redução do nutriente vegetal e a absorção de água pelo dano resultante ao sistema radicular, as plantas infestadas são, portanto, fracas e possuem baixo rendimento. Uma vez que a estrutura de alimentação é estabelecida, as fêmeas continuam seu desenvolvimento e produzem centenas de milhares de ovos. Esses ovos são, então, expelidos como uma massa protegida dentro de uma matriz gelatinosa, na superfície externa da raiz (DANCHIN *et al.*, 2013).

O parasitismo de *M. incognita* provoca a inibição ou bloqueio da translocação de água e nutrientes, além de resultar em um menor desenvolvimento radicular. Como consequência, as plantas apresentam sintomas não específicos, que se comparam aos de deficiência nutricional e/ou hídrica. É comum observar folhas com manchas de coloração amarelada, em contraste com o verde normal, sintoma conhecido como “carijó” (clorose internerval). Por vezes, em casos particulares, essas manchas espalhadas podem também ser de coloração avermelhada. Outro efeito secundário sofrido pelas plantas com sistema radicular parasitado pelo fitonematoide é a maior intolerância ao estresse hídrico (BARTLEM; JONES; HAMMES, 2014).

O controle de fitonematoides durante anos foi baseado, principalmente, pelo uso de nematicidas químicos. Atualmente, nenhuma medida de controle elimina completamente as perdas decorrentes dos fitonematoides do algodoeiro. Devido aos efeitos colaterais ambientais e preocupações com a saúde animal e humana, a aplicação de muitos nematicidas sintéticos à base de carbamatos, organofosforados e organoftalidas foi proibida, ou estão sob avaliação, pela União Europeia (NTALLI *et al.*, 2016). A rotação de culturas com plantas não hospedeiras

é uma alternativa que pode proporcionar em um ano a supressão dos fitonematoides, mas a rotação efetiva com essas culturas não é largamente utilizada porque muitas delas têm baixo potencial econômico (NEVES; PINTO, 2017; DUTTA; KHAN; PHANI, 2019).

Atualmente, os principais termos formalmente definidos, aplicados à patogenicidade do fitonematoide e a resposta da planta, são suscetíveis, tolerantes e resistentes. Esses termos descrevem a capacidade de um nematoide parasita se reproduzir em uma planta hospedeira. Uma planta hospedeira suscetível é vulnerável à invasão e reprodução por uma espécie ou população específica de fitonematoide, enquanto que um hospedeiro tolerante possui a habilidade de compensar ou recuperar-se dos efeitos prejudiciais provocados pelo ataque por determinado fitonematoide. Uma planta resistente é aquela que suporta a reprodução do fitonematoide em suas raízes e pode ser quantificada com diminuições na reprodução do fitonematoide em relação a um controle suscetível, que varia de efeitos leves a completos. A resistência de ocorrência natural, frequentemente, envolve a detecção do fitonematoide pela planta, seguida por uma resposta de hipersensibilidade (WILLIAMSON; KUMAR, 2006; TOMCZAK *et al.*, 2008; MORESCO, 2016).

1.2 SILENCIAMENTO GÊNICO VIA RNA INTERFERENTE

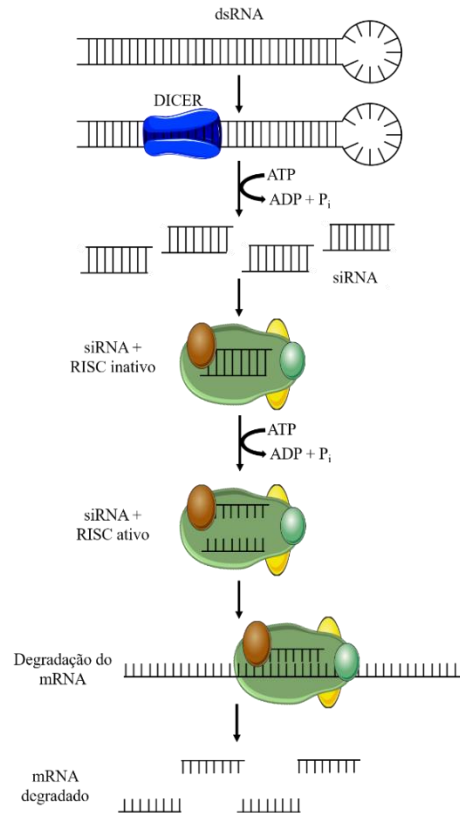
Existem pelo menos duas formas de silenciamento de genes, via RNA interferente (RNAi) em plantas. Todas essas vias envolvem a clivagem de um RNA de dupla-fita (dsRNA) em RNAs curtos. A primeira é o silenciamento via *small interfering RNA* (siRNA) citoplasmático e a segunda é o silenciamento de RNAs mensageiros endógenos por microRNAs (miRNAs) (BAULCOMBE, 2004). A molécula de RNA em certos sistemas biológicos apresenta função interferente. Desse modo, quando inserida em um determinado organismo, altera a ativação ou a transcrição de um determinado gene (IZANT; WEINTRAUB, 1984; NELLEN; LICHTENSTEIN, 1993). O RNAi é um mecanismo de regulação pós-transcricional da expressão gênica induzido por dsRNA, que é amplamente conservado e que ocorre entre plantas, animais e microrganismos (SEN; BLAU, 2006; CARTHEW; SONTHEIMER, 2009; BEREZIKOV, 2011).

Inicialmente, Fire *et al.* (1991) usaram a tecnologia do RNAi no nematoide modelo *Caenorhabditis elegans* para manipular a expressão gênica de dois genes, que codificam proteínas de miofilamentos, presentes nos músculos da parede do seu corpo. Esses efeitos foram propostos como resultado de um mecanismo *antisense* simples, dependente da hibridação entre o RNA exógeno e os transcritos de RNA mensageiro endógeno (HAMILTON; BAULCOMBE,

1999; WATERHOUSE; GRAHAM; WANG, 1998; HAMMOND *et al.*, 2000). Embora o mecanismo do RNAi tenha sido primeiramente decifrado em *C. elegans*, um fenômeno similar em plantas já havia sido descrito como silenciamento gênico pós-transcricional ao realizar experimentos com flores de petúnias. O objetivo era modificar a cor de flores de petúnia, por meio da introdução de uma enzima-chave (chalcona sintase) para a pigmentação rosa ou violeta das flores de petúnia obtendo, assim, flores mais escuras. No entanto, percebeu-se flores menos pigmentadas, flores variegadas ou completamente brancas. Esses resultados demonstraram que a atividade da chalcona sintase havia sido substancialmente diminuída (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990). Isso ocorreu devido à inibição pós-transcricional da expressão gênica em razão de um aumento da taxa de degradação do RNA mensageiro (mRNA) (VAN BLOKLAND *et al.*, 1994), cujo mecanismo era conhecido, até aquele momento, por co-supressão da expressão do gene. Esse fenômeno pode proteger as plantas de elementos genéticos móveis, como os dsRNAs de vírus, ou as consequências adversas da atividade de transposons (VOINNET, 2001; WATERHOUSE; WANG; LOUGH, 2001; ROVERE; DEL VAS; HOPP, 2002).

A técnica de silenciamento, via RNAi, envolve uma maquinaria de ribonucleases para a sua execução. Primeiramente, o dsRNA longo é expresso ou introduzido na célula (por exemplo, como resultado do emparelhamento de bases de transcritos senso e anti-senso, ou a formação de estruturas *stem-loop*), e processado em siRNAs pela DICER (*dsRNA-specific RNase III-type endonuclease*), de um modo dependente de ATP que exibem 2 nucleotídeos (nt) salientes nas suas extremidades 3'. Posteriormente, os siRNAs recém-formados, são desenrolados e carregados pelo complexo silenciador, induzido por RNA (RISC), e a outra fita do siRNA é degradada. O siRNA possui cadeia simples, que, juntamente com o completo RISC, irá localizar alvos de mRNAs com sequências homólogas ao siRNA por pareamento de bases. Na formação do complexo siRNA/mRNA, a enzima argonauta que apresenta atividade de RNaseH (*Slicer*) identifica e cliva (degrada) esse RNA de cadeia simples carregado (ssRNA), causando o silenciamento gênico (Figura 2) (MELLO; CONTE JR, 2004; BAKHETIA *et al.*, 2005a; HAMMOND, 2005; SIOMI; SIOMI, 2009; WINTER *et al.*, 2009).

Figura 2 – Ilustração esquemática do mecanismo de interferência por RNA a partir de dsRNAs em fitonematoides. A molécula de RNA de fita dupla (dsRNA) se liga a uma proteína DICER, de um modo dependente de ATP que exibem 2 nucleotídeos (nt) salientes nas suas extremidades 3', que a divide em pequenos RNAs interferentes (siRNAs); esses siRNAs se ligam a proteínas parte do Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC). O RISC separa os siRNAs em duas fitas: uma das fitas é degradado enquanto a outra serve como uma sonda de busca, que liga o RISC a alvos complementares de RNA. Após esse reconhecimento, ocorre a formação do complexo siRNA/mRNA, a enzima argonauta RNaseH (*Slicer*) identifica e cliva (degrada) esse RNA de cadeia simples carregado (ssRNA), causando o silenciamento gênico.



Outra diferente estratégia, aplicada à indução do silenciamento gênico, é via de miRNAs, que são pequenos fragmentos de RNAs (20-23 nt). Essas pequenas moléculas podem desempenhar importantes papéis reguladores de genes em animais e plantas, por emparelhamento aos mRNAs de genes codificadores de proteínas, para direcionar sua repressão pós-transcricional (BARTEL, 2009; WINTER *et al.*, 2009). Diferente dos siRNAs, que provêm de fora da célula, os miRNAs são endógenos, porém possuem semelhanças no seu processamento e função (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009). Sabe-se que os miRNAs são oriundos a estímulos que ocorrem naturalmente no organismo e seguem o mesmo caminho do RNAi dos siRNAs, também desempenham um papel importante na regulação gênica em muitos organismos, desde fitonematoides até plantas e humanos (BARTEL, 2004; SIOMI; SIOMI, 2009).

Após a descoberta do silenciamento gênico direcionado por siRNAs (FIRE *et al.*, 1998), ficou claro que as estratégias de RNAi tinham um enorme potencial para uso no controle de pragas. Estudos em plantas e fungos permitiram a descoberta de vias de silenciamento de genes, que foram desencadeadas pela expressão de transgenes (material genético transferido entre dois organismos) ou através da replicação viral (BAULCOMBE, 2004). Uma das vantagens do uso do RNAi pode ser sua aplicação em organismos sem a utilização da engenharia genética, pois não requer métodos transformadores, e pode ser realizado *in vivo*. Portanto, o método permite o estudo de fenótipos específicos do tecido e ao estágio de vida, associados à expressão gênica, bem como complexos fenótipos que não podem ser modelados em ensaios baseados em células (PERRIMON; NI; PERKINS, 2010; MOHR; PERRIMON, 2012). Desta forma, ficou claro que a caracterização das rotas de silenciamento gênico, especialmente as rotas de produção de siRNAs, foi um importante marco no desenvolvimento de estratégias de controle de pragas.

Nos últimos anos, o estudo de transcriptomas de fitonematóides tem sido empregado para prever principalmente *in silico* o perfil de expressão gênica para fins biotecnológico. Após a introdução das técnicas de Sequenciamento de Próxima Geração (NGS), amplamente utilizadas para o sequenciamento de DNA e cDNA, a análise de transcriptomas tornou-se rápida e eficiente e, atualmente, é possível detectar e identificar miRNAs, regiões não traduzidas 3' e 5' e até mesmo mRNAs completos. Com isso, é fornecido uma visão da complexidade evolutiva e biológica desses organismos (SHIN *et al.*, 2008). Diversos fatores importantes devem ser levados em consideração para aplicar a tecnologia do RNAi no desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a pragas, com base nos resultados obtidos em *C. elegans* (ABDURAKHMONOV *et al.*, 2016). Dentre estes: (1) detecção de genes vitais e específicos do organismo alvo, cujo RNAi deve causar retardo no desenvolvimento ou letalidade, preferencialmente, das espécies alvo; e (2) os dsRNAs devem ser absorvidos principalmente pelo sistema intestinal do organismo alvo, a partir da alimentação com tecidos vegetais, e devem induzir o silenciamento do gene alvo, amplificar rapidamente e se espalhar sistemicamente. Esses mesmos critérios devem ser também considerados para obtenção de plantas resistentes a fitonematóides, assegurando a especificidade desses genes para que não tenha efeitos em espécies não alvo como cordatas, plantas, anelídeos, insetos polinizadores e moluscos (DANCHIN *et al.*, 2013).

1.3 POTENCIAIS GENES ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A *M. incognita*, POR MEIO DO SILENCIAMENTO GÊNICO, MEDIADO POR RNAi

Características diagnósticas úteis para identificar os NPP são notavelmente poucas devido ao pequeno tamanho e anatomia simples dos fitonematoides parasitários. Além disso, o conhecimento das relações entre os fitonematoides e suas distribuições geográficas, para a maioria dos fitonematoides parasitários, permanece inadequado. A pesquisa sistemática é essencial para facilitar o diagnóstico de potenciais problemas de pragas, bem como melhorar as previsões sobre a patogenicidade e o alcance do hospedeiro (CHITWOOD, 2003).

A homologia existente entre genes que codificam diversas proteínas secretadas pelo fitonematoide com genes bacterianos, sugere que a transferência horizontal de genes (THG) pode ter sido uma chave no desenvolvimento do parasitismo por fitonematoides (KONDRASHOV *et al.*, 2006). O banco de dados NCBI de nucleotídeos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), por exemplo, possui, atualmente, cerca de 120.000 sequências totais de *M. incognita*. Genes compartilhados com parasitas de animais também são induzidos em NPPs e podem ter um papel na defesa do hospedeiro (WILLIAMSON; GLEASON, 2003). Com base na literatura, percebe-se que o uso da tecnologia de RNAi vem mostrando alta eficácia e resultados extremamente promissores (Tabela 1 e S1), a partir do silenciamento de genes essenciais à sobrevivência do fitonematoide e de genes efetores. Assim, a tecnologia de RNAi está emergindo como uma ferramenta biotecnológica, extremamente útil na aplicação da nematologia de plantas para elucidar a função dos genes, observando o efeito fenotípico do *knock-down* de genes alvo na transcrição.

Como citado anteriormente, as práticas de manejo existentes, como o uso de nematicidas, representam uma ameaça ao meio ambiente e possuem alto custo. Portanto, recorrer às estratégias de controle ambientalmente adequadas e econômicas é uma alternativa a ser considerada. Nos últimos anos, o RNAi emergiu como uma ferramenta potencial para controlar os fitopatógenos, por meio do método de silenciamento gênico induzido por hospedeiros (KOCH; KOGEL, 2014). Há mais de 10 anos, se sabe que a tecnologia de RNAi pode se tornar em uma ferramenta de controle de fitonematoides em espécies de interesse econômico. A primeira demonstração de plantas transgênicas com resistência à infecção por fitonematoides, baseada em RNAi, foi relatada por Yadav, Veluthambi e Subramaniam (2006) em plantas de tabaco, desafiadas com *M. incognita*. Com o intuito de gerar culturas de importância econômica GM resistentes a fitonematoides, o uso de dsRNAs para silenciar a expressão gênica é atualmente um tema bastante explorado (URWIN; LILLEY; ATKINSON,

2002; BAKHETIA *et al.*, 2005b; FANELLI *et al.*, 2005; ROSSO *et al.*, 2005; SOUZA JÚNIOR *et al.*, 2013). De acordo com McCarter (2009), as abordagens para o controle de fitonematoides, via engenharia genética, podem ser classificadas como atuando em alvos de fitonematoides, na interface fitonematoide-planta e na resposta da planta.

A captação oral de dsRNAs ou siRNAs pelos fitonematoides requer sua passagem através do tubo de alimentação. Isso funciona como um filtro molecular, portanto, não é certo que o dsRNA seja eficientemente ingerido por todos os fitonematoides (Figura 3) (BAKHETIA *et al.*, 2005a). Urwin *et al.* (1997) observaram, em seu estudo analisando a atividade da proteína fluorescente (GFP) nos tubos de alimentação de fitonematoides *in vivo* (realizado nas raízes de *Arabidopsis thaliana*), que o fitonematoide *G. pallida* exclui grande parte da captação da proteína GFP, enquanto o *M. incognita* ingere imediatamente essa proteína. Portanto, dsRNAs ou siRNAs podem passar através dos poros do tubo de alimentação. Outro detalhe importante para o funcionamento das moléculas de dsRNAs ingeridos por fitonematoides é que eles possuem um lúmen intestinal levemente alcalino, que não digere os ácidos nucleicos rapidamente, como observado em *C. elegans* (TIMMONS; FIRE, 1998). Os dsRNAs movem-se sistemicamente, a partir do intestino ou da célula injetada, induzindo o silenciamento do gene em outras células, que expressam uma sequência de mRNA homóloga (GRISHOK; TABARA; MELLO, 2000).

Figura 3 – Mecanismo de RNAi mediado por plantas em nematoides parasitas de plantas. Moléculas de dsRNAs são produzidas no citoplasma de células vegetais como RNA *hairpin*, produzido por plantas transgênicas (com uma sequência em orientação senso e anti-senso, separadas por uma região não codificante). Os dsRNAs podem ser ingeridos pelos fitonematoides, por meio dos tubos de alimentação. Alternativamente, as moléculas de dsRNAs são processadas pela maquinaria de RNAi da planta e os siRNAs são ingeridos pela espécie alvo.

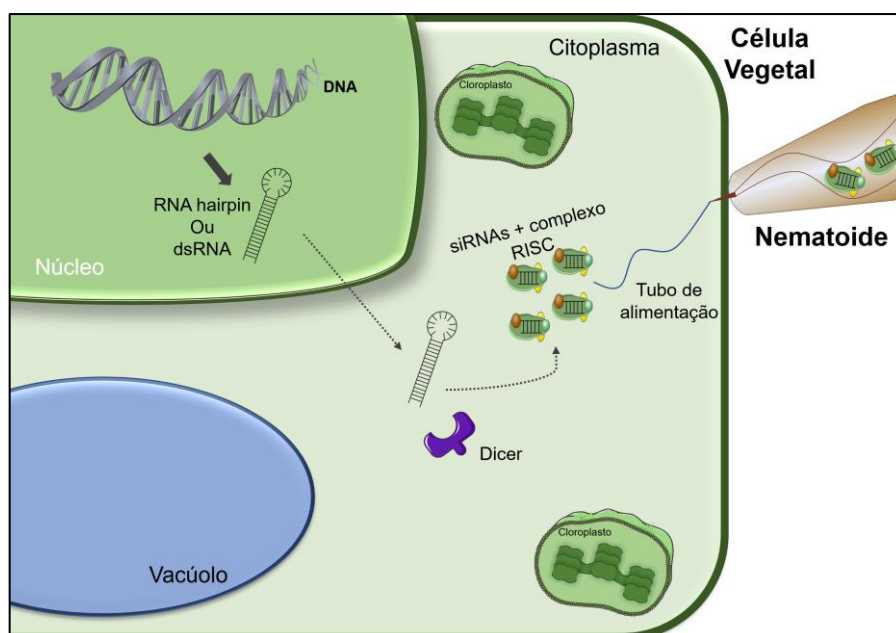


Tabela 1 – Genes alvo do fitonematoide *M. incognita*, potencialmente envolvidos na infecção e/ou no seu desenvolvimento, relatados pelo uso da tecnologia RNAi.

Gene alvo	Método de ingestão	Planta hospedeira	Tempo de infecção	Fenótipo observado	Referência
<i>pMiDuox1</i>	<i>Soaking</i>	<i>Phaseolus angularis</i>	14 DAI	Redução de 70% no nº de nematoides	Baketia <i>et al.</i> (2005)
<i>16D10</i>	<i>Soaking</i>	<i>A. thaliana</i>	13 DAI	Redução de 74-81% no nº de nematoides	Huang <i>et al.</i> (2006)
<i>16D10</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	13 DAI	Redução de 63-90% no nº de galhas Redução de 69-93% no nº de ovos	Huang <i>et al.</i> (2006)
Integrase (AW871671)	<i>In planta</i>	<i>Tabaco</i>	45 DAI	Redução de 90% no nº de nematoides	Yadav, Veluthambi e Subramaniam (2006)
<i>Mi-fs</i>	<i>In planta</i>	<i>Tabaco</i>	45 DAI	Redução de 92% no nº de galhas	Yadav, Veluthambi e Subramaniam (2006)
<i>Mi-gsts-1</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. lycopersicum</i>	42 DAI	Redução no número de massa de ovos	Dubreuil <i>et al.</i> (2007)
<i>Mi-cpl-1</i>	<i>Soaking</i>	<i>P. angularis</i>	21 DAI	Redução de 60% no nº de nematoides	Shingles <i>et al.</i> (2007)
<i>Mispc3</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	20 DAI	Redução de 52-61% no nº de nematoides	Charlton <i>et al.</i> (2010)
<i>Tp</i> (tirosina fosfatase)	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	38 DAI	Redução de 92% no nº de galhas Redução de 5,4 vezes no diâmetro de fêmeas	Ibrahim <i>et al.</i> (2011)
<i>MSP</i>	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	38 DAI	Redução de 94,7% no nº de galhas Redução de 6,5 vezes no diâmetro de fêmeas	Ibrahim <i>et al.</i> (2011)
<i>Mi-Rpn7</i>	<i>In planta</i>	<i>S. lycopersicum</i>	40 DAI	Redução de 34% no nº de massa de ovos Redução de até 50,8% de ovos	Niu <i>et al.</i> (2012)
<i>Minc03866</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. lycopersicum</i>	21 DAI	Redução de 41,2% no nº de galhas Redução de 50,3% no nº de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Minc03313</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. lycopersicum</i>	21 DAI	Redução de 57,8% no nº de galhas Redução de 53,2% no nº de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Minc01632</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. lycopersicum</i>	21 DAI	Redução de 57,7% no nº de galhas Redução de 70,1% no nº de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Minc05001</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. lycopersicum</i>	21 DAI	Redução de 51,5% no nº de galhas Redução de 71,1% no nº de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Minc08013</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. lycopersicum</i>	21 DAI	Redução de 44,5% no nº de galhas Redução de 54% no nº de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Minc02483</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. lycopersicum</i>	21 DAI	Redução de 54,4% no nº de galhas Redução de 60,9% no nº de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)

<i>Minc08335</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. lycopersicum</i>	21 DAI	Redução de 60,8% no nº de galhas Redução de 56% no nº de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Minc17713</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. lycopersicum</i>	21 DAI	Redução de 53,5% no nº de galhas Redução de 64,2% no nº de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Mi-CRT</i> (<i>Minc06693</i>)	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	56 DAI	Redução de 80% no nº de galhas	Jaouannet <i>et al.</i> (2013)
<i>flp-14</i>	<i>In planta</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	30 DAI	Redução de 50-103% no nº de fêmeas Redução de 28-57% no nº de massa de ovos	Papolu <i>et al.</i> (2013)
<i>flp-18</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	30 DAI	Redução de 43-59% no nº de fêmeas Redução de 15-50% no nº de massa de ovos	Papolu <i>et al.</i> (2013)
<i>Mi-ser-1</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	45 DAI	Redução de 30% no nº de ovos Redução de 48% no nº de J2 eclodidos	Souza Júnior <i>et al.</i> (2013)
<i>Mi-cpl-1</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	45 DAI	Redução de 45% no número de galhas Redução de 32% no nº de massa de ovos Redução de 42% no nº de ovos	Souza Júnior <i>et al.</i> (2013)
<i>Mi8D05</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	56 DAI	Redução de 90% no nº de galhas	Xue <i>et al.</i> (2013)
<i>16D10</i>	<i>In planta</i>	<i>Vitis vinifera</i>	35 DAI	Menor suscetibilidade à infecção por nematoides	Yang <i>et al.</i> (2013)
<i>Mi-icl</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	45 DAI	Redução de até 65% no nº de ovos	Lourenço-Tessutti <i>et al.</i> (2015)
<i>MiMsp40</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	49 DAI	Redução de 35,4-50,9% no nº de galhas Redução de 13,8-18,3% no nº de massa de ovos	Niu <i>et al.</i> (2016)
<i>Misp12</i>	<i>In planta</i>	<i>N. benthamiana</i>	45 DAI	Redução de 68% no nº de fêmeas Redução de 63% dos ovos de nematoides	Xie <i>et al.</i> (2016)
<i>At1g74770</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	21 DAI	Redução de 32% no nº de galhas	Kakrana <i>et al.</i> (2017)
<i>Minc18876</i>	<i>Soaking</i>	<i>N. benthamiana</i>	42 DAI	Redução de 60% no nº de galhas Redução de 60% no nº de ovos	Nguyen <i>et al.</i> (2018)
<i>Mi-msp-1</i>	<i>In planta</i>	<i>S. melongena</i>	30 DAI	Redução de 33,8-46,9% no nº de galhas Redução de 41-51,2% no nº de massa de ovos	Chaudhary <i>et al.</i> (2019)

Dentre os genes de *M. incognita* que foram caracterizados com a tecnologia do RNAi, destacam-se os que tiveram alta expressão em todo o organismo (*Minc01632*, *Minc08335*, *Minc12224*), os com alta expressão detectada especificamente em células glandulares subventrais secretoras (*Minc03866*) e os genes com expressão observada especificamente no trato intestinal, na fase J2 (*Minc00801*, *Minc17713*) (DANCHIN *et al.*, 2013).

1.3.1 Silenciamento gênico de genes essenciais de fitonematoides via RNAi

A tecnologia de RNAi pode ser útil para atingir genes essenciais para o desenvolvimento, reprodução e metabolismo dos fitonematoides (ROSSO; JONES; ABAD, 2009; LI *et al.*, 2011; LOURENÇO-TESSUTTI *et al.*, 2015; REHMAN; GUPTA; GOYAL, 2016). Em *M. incognita*, a imersão com dsRNAs para os genes que codificam a dupla oxidase (peroxidase e NADPH oxidase), reduziu a reprodução do fitonematoide em até 70% (BAKHETIA *et al.*, 2005b). O silenciamento dos genes responsáveis pela produção de quitina nas cascas dos ovos (quitina sintase) do fitonematoide *M. artiellia* afetou também o seu desenvolvimento (FANELLI *et al.*, 2005). Em outros estudos, a mortalidade de fitonematoides foi alcançada após a alimentação com dieta artificial contendo dsRNAs, onde as plantas GM que expressavam os dsRNAs tiveram maior resistência ao parasita (FIRE *et al.*, 1998; FIRE, 1999).

Algumas proteases são demonstradas como efetores, entretanto, também possuem papel essencial na vida do fitonematoide. Algumas proteases, previamente descritas em *M. incognita*, são duas proteases de cisteína-L (cisteína) (NEVEU; ABAD; CASTAGNONE-SERENO, 2003; SHINGLES *et al.*, 2007), uma serina protease semelhante à quimotripsina (FRAGOSO *et al.*, 2005) e uma protease aspártica da catepsina D (FRAGOSO *et al.*, 2009). Para os parasitas helmínticos, as proteases apresentam diversas funções na interação parasito-hospedeiro, podendo variar desde a participação durante a invasão dos tecidos do hospedeiro, até a nutrição do parasita e a evasão das respostas de defesa do hospedeiro (TORT *et al.*, 1999). As secreções dos fitonematoides parasitas são consideradas como parte essencial no controle das diferentes etapas da interação com seus hospedeiros. Em fitonematoides, proteínas secretoras codificadas por genes expressos nas glândulas esofágicas são essenciais para a penetração no hospedeiro e estabelecimento do parasitismo (DAVIS *et al.*, 2000). Como exemplo, os genes que codificam enzimas que degradam a parede celular, como a β -1,4-endoglucanase e a poligalacturonase,

transcritos nas glândulas subventrais de *M. incognita*, podem estar envolvidos na penetração das raízes (ROSSO *et al.*, 1999; JAUBERT *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a fitonematoides com base em inibidores da cisteína protease (cistatinas) fornece informações que são úteis para o desenvolvimento de resistência mediada por RNAi. A cistatina expressa de forma transgênica fornece 70-80% de resistência contra diversos fitonematoides em várias plantas hospedeiras (URWIN *et al.*, 1997b, 1997c; URWIN; GREEN; ATKINSON, 2003; ATKINSON *et al.*, 2004). Em *M. incognita*, a sequência de uma cisteína protease (CPL) (*Mi-cpl-1*, *M. incognita cathepsin L-like protease 1*) apresenta em seu N-terminal um peptídeo sinal de secreção curta de 19 aminoácidos. Essa protease também possui uma pró-região putativa de 162 aminoácidos e um domínio enzimático maduro de 221 resíduos, com um potencial sítio de N-glicosilação antes do local de clivagem, que pode ser envolvido no dobramento correto ou secreção da enzima. Alinhamentos de sequência proteica de *Mi-cpl-1* indicaram que esta molécula codifica para uma protease cisteína do tipo L-catepsina (NEVEU; ABAD; CASTAGNONE-SERENO, 2003).

O gene da CPL, é especificamente expresso nas células intestinais de J2s infecciosos de *M. incognita*. Em fitonematoides parasitas, a digestão extracelular de proteínas da dieta tem sido proposta como um papel importante para CPL semelhantes à L-catepsina intestinal. A proteína pode estar envolvida nos processos digestivos de *M. incognita*, porém, os dados sugerem que sua função não está estritamente relacionada à alimentação, mas na sua relação com o parasitismo da planta (NEVEU; ABAD; CASTAGNONE-SERENO, 2003).

A inibição do gene *Mi-cpl-1* prejudica a digestão da proteína da dieta e suprime a multiplicação de fitonematoides (VAIN *et al.*, 1998). Shingles *et al.* (2007), observaram uma redução no transcrito gênico e a redução no número de plantas infectadas com fitonematoides em quase 60%, assim como o número de fêmeas estabelecidas produzindo ovos aos 21 dias após a infecção. A partir da análise de hibridização *in situ* em fitonematoides jovens e maduros, mostrou que o gene *Mi-cpl-1* é expresso no intestino, o que sugere que o seu produto é uma enzima digestiva. Os efeitos da função desse gene foram consistentes com uma redução na eficiência da alimentação. Além disso, estes autores observaram que *Mi-cpl-1* é expressa em um nível similarmente alto em ppJ2, *M. incognita* jovem e adulta. Esses resultados indicam que a protease é importante em todos os estádios de desenvolvimento do fitonematoide, como descrito por Souza Júnior *et al.* (2013). Ao utilizar *N. tabacum* GM para avaliar o efeito da expressão de dsRNAs complementar aos mRNAs com genes de proteases no ciclo de vida do fitonematoide (*Mi-asp-1*, *Mi-ser-1* e *Mi-cpl-1*), bioensaios foram realizados com ppJ2. Ao se

avaliar a expressão do transcrito dos genes das proteases nos ovos oriundos dos eventos transgênicos, foi observada uma redução significativa no gene *Mi-cpl-1* (SOUZA JÚNIOR *et al.*, 2013). O gene *Mi-cpl-1* foi direcionado para gerar linhagens transgênicas de tomate para avaliar a resistência a fitonematoides, via RNAi. Foi demonstrado que *Mi-cpl-1* desempenha um papel crucial durante a interação fitonematoide-planta, *in planta*, o que provoca efeitos prejudiciais no desenvolvimento de *M. incognita*, reforçando o potencial da tecnologia RNAi para o manejo de fitonematoides em plantas cultivadas (DUTTA *et al.*, 2015).

Acredita-se que os fitonematoides sejam os únicos animais a utilizarem o ciclo glioxilato para gerar carboidratos, a partir da β -oxidação dos ácidos graxos (HOLMES, 1993; BARRETT; WRIGHT, 1998; JONES; BURNETT; ZOLLMAN, 1999). Ainda assim, diversos autores relataram a atividade de enzimas importantes nesse ciclo em outros animais, como aves (DAVIS *et al.*, 1990), répteis (DAVIS; JONES; GOODMAN, 1986; GOODMAN; DAVIS; JONES, 1980) e mamíferos placentários (KONDRASHOVA; RODIONOVA, 1971; POPOV *et al.*, 2001; MORGUNOV *et al.*, 2005). A via do glioxilato, geralmente encontrada em plantas e microrganismos, é semelhante ao ciclo do ácido cítrico, mas depende de duas enzimas críticas, a malato sintase e a isocitrato liase (ICL), para contornar duas etapas da descarboxilação (CORNAH; SMITH, 2002; KONDRASHOV *et al.*, 2006). De acordo com alguns autores, os fitonematoides utilizam essa via para produção de energia, a partir de lipídios armazenados durante a embriogênese (BRAECKMAN; HOUTHOOFD, 2009; PASSEY; FAIRBAIRN, 1957), fase larval (O'RIORDAN; BURNELL, 1990), inanição e durante as fases de não alimentação (REVERSAT, 1981; WADSWORTH; RIDDLE, 1989; LOURENÇO-TESSUTTI *et al.*, 2015), como para os ppJ2 de *Meloidogyne* spp. Em *M. incognita* existem cinco enzimas vinculadas à via do glioxilato. Estas incluem homólogos da malato sintase, várias enzimas não compartilhadas com o ciclo ácido cítrico (por exemplo, formiato tetrahydrofolato ligase e a ICL (*Mi-icl*)), porém há enzimas compartilhadas com esse ciclo, como a malato desidrogenase (MCCARTER *et al.*, 2003). Esse gene é considerado relevante para a vida do fitonematoide *M. incognita*, porém não há muitos estudos sobre sua importância (KONDRASHOV *et al.*, 2006; HAEGEMAN; JONES; DANCHIN, 2011). Lourenço-tessutti *et al.* (2015), avaliando o potencial do gene *Mi-icl* para resistência em plantas de tabaco, observaram que houve uma redução média de 65% nos ovos g^{-1} de raiz inoculada em plantas expressando dsRNA de *Mi-icl*, porém a formação de galhas não foi afetada pelo RNAi de *ICL*.

Genes associados ao metabolismo de RNAs também têm sido alvo de silenciamento em fitonematoide para suprimir o desenvolvimento e a reprodução (YADAV; VELUTHAMBI; SUBRAMANIAM, 2006). Esses genes são conhecidos como fatores de *splicing*, e são

relevantes pela interação com o pré-mRNAs, com outros fatores de *splicing* e com componentes proteicos das Pequenas Ribonucleoproteínas Nucleares (snRNPs), que possuem bastante importância no *splicing* alternativo (BURGE; TUSCHL; SHARP, 1999; ZAHLER, 2012). O gene do fator de *splicing* (*Mi-fs*) de *M. incognita* é essencial para o desenvolvimento do fitonematoide, pois está envolvido no metabolismo do mRNA, e é considerado um gene de manutenção (KUMAR *et al.*, 2017). Um estudo mostrando o silenciamento gênico via RNAi de *M. incognita* em plantas de tabaco, demonstrou redução do número de galhas (92%) e não foi identificado o cDNA do *Mi-fs* por RT-PCR, o que sugere ser devido à degradação total do RNA. Essa ausência é específica dos mRNAs alvo, sendo uma característica notável da resposta de RNAi, ou seja, indica que o dsRNA gerado pela planta hospedeira pode desencadear o mecanismo de RNAi no fitonematoide (YADAV; VELUTHAMBI; SUBRAMANIAM, 2006). Kakrana *et al.* (2017) testaram o promotor *NRRS* para direcionar a expressão no gene *Mi-fs* e constataram uma expressão ligeiramente reduzida deste gene *Mi-fs* nas fêmeas isoladas das raízes de *A. thaliana* em comparação ao controle, indicando que o gene *Mi-fs*, impulsionado por esse promotor, não foi silenciado significativamente. Bioensaios com eventos de *A. thaliana* expressando dsRNA do gene *Mi-fs* inoculadas com *M. incognita* apresentaram número de galhas, fêmeas e massa de ovos reduzido em 71,4, 74,5 e 86,6%, respectivamente (KUMAR *et al.*, 2017).

Raízes de soja expressando uma construção com repetição invertida de três genes *Hg-rps-3a*, *Hg-rps-4* e *Hg-spk-1* envolvidas em diferentes aspectos do processamento do RNA mostrou 81-88% de redução no número de cistos de *H. glycines* (KLINK *et al.*, 2009). Posteriormente, o silenciamento mediado por RNAi do gene *Prp-17* de *H. glycines* que codifica um fator de *splicing* de mRNA, previamente identificado em *C. elegans*, resultou em significativas reduções em número de cistos g⁻¹ de raiz de tecido da raiz (53% de redução) e número de ovos g⁻¹ de raiz de tecido da raiz (79% de redução) em soja transgênica inoculada com *H. glycines* (LI *et al.*, 2010). Em estudo similar, plantas de soja expressando o dsRNA para o fator de *splicing* *Mi-fs* de *M. incognita* em *G. max*, controlado pelo promotor *uceS8.3*, gerou uma redução de 71-91% do número de ovos g⁻¹ de raiz (GROSSI-DE-SA *et al.*, 2010; FRAGOSO *et al.*, 2020, submetido).

1.3.2 Silenciamento gênico de genes efetores de fitonematoides via RNAi

Fitonematoides possuem possíveis proteínas efetoras, como celulasas e proteases, e diferentes moléculas de função desconhecida (HUANG *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2011). Para

que ocorra a penetração do fitonematoide, o estilete deposita uma série de proteínas (efetores) na raiz da planta, além de executar funções importantes para lidar com as defesas da planta (GHEYSEN; MITCHUM, 2011). Proteases são enzimas proteolíticas universais, que clivam ligações peptídicas internas dentro de proteínas e peptídeos. Estão presentes em um largo espectro de organismos, incluindo bactérias, plantas, invertebrados e vertebrados (NEVEU; ABAD; CASTAGNONE-SERENO, 2003). Um estudo demonstrou, que após uso da tecnologia *soaking* com J2 de *M. incognita* com dsRNAs para dois genes expressos nas glândulas subventrais do fitonematoide, a calreticulina (*Mi-crt*) e poligalacturonase (*Mi-pg-1*), uma redução de seus transcritos em cerca de 92% (ROSSO *et al.*, 2005). Huang *et al.* (2006) demonstraram um modelo de silenciamento gênico, o qual resultou numa redução de 93-97% dos transcritos do gene efector *16D10* em J2. No ensaio, utilizando *soaking* para administrar dsRNAs para os fitonematoides, plantas de *A. thaliana* inoculadas estes J2 apresentaram uma redução na reprodução de *M. incognita* de 74 a 81%. Esses autores constataram também, por meio da avaliação *in planta*, que plantas de *A. thaliana*, expressando dsRNA para o gene *16D10*, reduziram o número de galhas de 63-90%, assim como houve diminuição do tamanho das mesmas. Chen *et al.* (2005), por exemplo, observaram em *G. rostochiensis*, por meio da imersão de J2 em dsRNAs (*soaking*), a redução da proteína secretora anfídial AMS-1 que codifica o mRNA, reduzindo consideravelmente a capacidade dos fitonematoides de localizar plantas hospedeiras.

A inibição do gene efector *Minc00801* em J2 causou a redução no número de galhas. O gene *Minc00801* apresentou expressão forte e específica nas glândulas retais das fêmeas (J4), que são conhecidas por formarem a matriz de massa de ovos. Este gene também exibe uma expressão relativamente baixa durante as primeiras fases de vida do fitonematoide, seguido por uma regulação positiva no J4 adulto. A alta abundância de expressão deste gene sugere um papel na postura de ovos e, eventualmente, no sucesso reprodutivo do fitonematoide (MAGGENTI; ALLEN, 1960; DANCHIN *et al.*, 2013; RUTTER *et al.*, 2014). Esses resultados indicam que *Minc00801* é uma proteína que mantém a capacidade de *M. incognita* de infectar e deve ser mais investigada.

Como as células glandulares do esôfago estão diretamente conectadas através do esôfago ao estilete do fitonematoide, as proteínas secretoras, que são exclusivamente expressas e secretadas pelas células glandulares, têm grande probabilidade de ter funções biológicas nas interações fitonematoide-planta. A proteína *Minc04584*, fortemente expressa nas células glandulares subventrais de *M. incognita*, pertence à família de genes MAP-1 (Proteínas de avirulência de *Meloidogyne* - 1), supostamente desempenha papéis nos estádios iniciais de

interação entre o fitonematoide e sua planta hospedeira (CASTAGNONE-SERENO; SEMBLAT; CASTAGNONE, 2009; RUTTER *et al.*, 2014). Embora a função exata desta família de genes ainda não tenha sido descrita, o transcrito de MAP-1 foi recentemente isolado de doze espécies diferentes de *Meloidogyne*, indicando que tem uma função indispensável para o parasitismo nesse gênero (TOMALOVA *et al.*, 2012). A busca por genes presentes nos fitonematoides, e sua caracterização e aplicação em plantas economicamente importantes, como o algodão, é de suma importância para avaliar novos métodos de controle. Apesar dos esforços extensivos nos últimos anos, a maioria das proteínas efetoras de *Meloidogyne* spp. permanecem desconhecidas e descaracterizadas.

1.4 PROMOTORES GÊNICOS EM PLANTAS

Os promotores gênicos, também conhecido por sequências regulatórias, são responsáveis pela regulação da expressão gênica. Os promotores que controlam a expressão transgênica são componentes essenciais que muitas vezes são negligenciados. Essas sequências regulatórias permitem que a expressão do transgene seja regulada, restrita e sintonizada, fornecendo um controle mais preciso sobre a maneira pela qual os fenótipos são expressos (TWYMAN, 2003). A escolha do promotor correto, é um dos fatores mais importantes para diferentes níveis de expressão do transgene (BRUDERER, 2003).

Na biotecnologia vegetal os promotores são tipicamente divididos em três categorias: primeiramente a constitutiva, que é ativa continuamente na maioria ou em todos os tecidos; seguido pelo promotor do tipo espaço-temporal, no qual a atividade é específica do tecido ou específica do estágio de vida da planta; e, por último, a do tipo induzível, onde é regulada pela aplicação de um sinal químico ou físico externo (POTENZA; ALEMAN; SENGUPTA-GOPALAN, 2004). No entanto, geralmente os promotores incluem um iniciador e TATA-box, bem como motivos de ação *cis* específicos que se ligam a fatores de transcrição, havendo diferenças nos tamanhos e sequências (PEREMARTI *et al.*, 2010).

Na transgenia de plantas, cada transgene adicional requer seu próprio promotor, tornando-se necessário encontrar diferentes promotores que atinjam o mesmo perfil de expressão ou usar um promotor várias vezes na mesma planta transgênica. O uso repetitivo do promotor pode, em alguns casos, ter impactos negativos indesejáveis na expressão e estabilidade do transgene (METTE *et al.*, 2000; MOURRAIN *et al.*, 2007). Sabe-se que há diversos promotores que podem ser utilizados na transformação de plantas. O promotor 35S do vírus mosaico da couve-flor (*CaMV35S*) (ODELL; NAGY; CHUA, 1985), é o promotor

constitutivo mais utilizado na geração de plantas GM, por induzir um nível elevado de expressão de transgenes (principalmente em dicotiledôneas) (GUDYNAITE-SAVITCH; JOHNSON; MIKI, 2009; YOO *et al.*, 2005).

A ubiquitina é uma proteína com funções bastante relevantes para as células eucariontes, dentre elas, o controle transcricional, controle da tradução, regulação da endocitose, tráfego de proteínas e reparo do DNA (HERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2009). Promotores da ubiquitina mostraram conduzir níveis de expressão gênica superiores ao promotor *CaMV35S* em estudos de plantas transgênicas (CALLIS; RAASCH; VIERSTRA, 1990; WANG, 2003; HERNANDEZ-GARCIA; FINER, 2014; MANN *et al.*, 2011; VIANA *et al.*, 2011). Esse fato deve-se ao caráter dos genes de ubiquitina possuírem expressão na maior parte dos tecidos vegetais. A sequência do promotor *uceS8.3* foi isolado de plantas de soja e patentado pelo nosso grupo de pesquisa. Esse possui a capacidade de controlar a expressão do gene constitutivo da proteína de conjugação a ubiquitina da família *Leubc4* de soja (GROSSI-DE-SA *et al.*, 2010). Foi relatado uma alta expressão de genes controlados por esse promotor em raízes em comparação com outros tecidos de *Glycine max* (caule, vagem e folha) (MIRANDA, 2011). Além disso, os níveis de expressão do promotor *uceS8.3* em raiz, caule e tecidos florais são maiores se comparados a expressão do promotor *CaMV35S* otimizado (regiões regulatórias duplicadas e junto com o *enhancer* de AMV (vírus do mosaico da alfafa) (*CaMV35SdAMV*) (GROSSI-DE-SA *et al.*, 2010). O promotor *uceS8.3* pode ser utilizado e aplicado biotecnologicamente para diferentes tipos de estresses bióticos, incluindo fitonematoides (VIANA *et al.*, 2011; ARTICO *et al.*, 2013; LINS, 2015). Sendo assim, por esse promotor possuir alta capacidade de conduzir expressão em tecidos florais e raízes, ele foi utilizado em todas as construções gênicas utilizadas ao nesse trabalho.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes genes com potencial no controle de *M. incognita*, via tecnologia de RNAi, em plantas de interesse econômico e plantas modelo.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1 – PROVA DE CONCEITO EM ALGODÃO: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SILENCIAMENTO DE TRÊS GENES PIRAMIDADOS NO CONTROLE DE *M. incognita*

RESUMO

O nematoide-de-galhas é considerado um dos principais patógenos vegetais, devido aos severos danos causados a várias commodities agrônômicas, incluindo o algodão, gerando grandes perdas econômicas. Com base nas limitações dos métodos de controle atuais, o uso da estratégia de RNAi *in planta* tem se tornado uma abordagem revolucionária. Tal abordagem baseia-se no fornecimento de moléculas de RNA dupla fita (dsRNAs) aos fitonematoides, via alimentação, visando o silenciamento gênico para obtenção de resistência. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi transformar e caracterizar plantas de algodão com dsRNAs, por meio da piramidação de três regiões gênicas alvo, cisteína protease (*Mi-cpl*), isocitrato liase (*Mi-icl*) e fator de *splicing* (*Mi-fs*), denominado *dsMinc1*. Todas essas moléculas são potencialmente envolvidas em processos essenciais do desenvolvimento e processamento de mRNA de *M. incognita*. Eixos embrionários de algodão foram transformados com o vetor de expressão *dsMinc1* e sete eventos primários (T₀) contendo as sequências de dsRNAs foram obtidos, sendo confirmados por análises de PCR. As plantas de algodão T₁ foram, inicialmente, selecionadas por PCR e as progênies T₂ e T₃ foram submetidas ao bioensaio de desafio contra *M. incognita*. O número de cópias do transgene nas plantas GM T₀, estimado pela metodologia de quantificação relativa (qPCR), variando de um a três entre os eventos analisados. As progênies T₂, oriundas de três eventos de transformação, foram desafiadas contra *M. incognita* e comparadas com as plantas não transformadas controle (WT-BRS 372) e com as plantas padrão de resistência (M-315), para a avaliação da reprodução do fitonematoide nas raízes. Os resultados mostraram que houve redução de 33,3 a 87,5% no número de galhas em comparação ao controle de suscetibilidade. No bioensaio da geração T₃, aos 120 dias após a infecção (DAI) por *M. incognita*, o número médio de galhas g raiz⁻¹ e o fator de reprodução (FR) de fitonematoides, formadas no sistema radicular, diferiu significativamente ($p < 0,05$) nos eventos *dsMinc1*-20.39.3 e *dsMinc1*-64.15.1, em relação ao controle WT. O nível de silenciamento dos genes *Mi-cpl*, *Mi-icl* e *Mi-fs* em *M. incognita*, provocados pela ingestão de dsRNA e/ou siRNA, provenientes do *dsMinc1*, presentes nas plantas GM de diferentes linhagens T₃, foi realizado por RT-qPCR. O acúmulo médio de transcritos dos genes *Mi-cpl*, *Mi-icl* e *Mi-fs*, presentes em galhas de raízes de algodão obtidos das plantas expressando *dsMinc1*, mostrou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de 82,8, 95,4 e 70,7%, respectivamente, nas linhagens T₃ em relação ao controle. Portanto, os dados obtidos sugerem que moléculas de dsRNA/siRNA correspondentes aos genes presentes no vetor *dsMinc1* foram ingeridos por *M. incognita* durante o processo parasitário. Este é o primeiro relato que descreve a funcionalidade da técnica de RNAi em planta de algodão resultando no silenciamento de genes essenciais ao nematoide, e demonstrando aumento no nível de resistência a *M. incognita*. Assim, os dados aqui apresentados poderão contribuir para o manejo mais sustentável de fitonematoides, com a redução de agrotóxicos em lavouras de algodão e, conseqüentemente, com o incremento da competitividade do agronegócio brasileiro.

Palavras-chave: *Gossypium hirsutum*. RNA interferente. *Meloidogyne incognita*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO DO ALGODÃO E SUA IMPORTÂNCIA

Existem mais de 50 espécies de *Gossypium* spp. (algodão) distribuídas em regiões áridas a semiáridas dos trópicos e subtropicais. Dentre essas espécies, quatro foram domesticadas na África-Ásia e nas Américas, devido ao alto teor de fibra. As espécies de *Gossypium* spp. exibem uma variação morfológica extraordinária, variando de plantas perenes herbáceas a árvores de 15 m, com uma gama diversificada de características reprodutivas e vegetativas. Um nível paralelo de diversidade citogenética e genômica surgiu durante a radiação global do gênero, levando à evolução de oito grupos de espécies diploides ($n = 13$) (genoma dos grupos A, B, C, D, E, F, G e K). Informações indicam que a origem de *Gossypium* spp. ocorreu por volta de 5 a 10 milhões de anos atrás. Evolutivamente, o algodão alopoliploide parece ter surgido nos últimos 1-2 milhões de anos, como consequência da dispersão transoceânica de um táxon com genoma A para a América, seguido de hibridação com um diploide do genoma D indígena. Após a formação, os alopoliploides diversificaram-se em três linhagens modernas, duas das quais contêm as espécies comercialmente importantes *G. hirsutum* e *G. barbadense* (WENDEL *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2019). Das diversas espécies de algodão, apenas seis são alotetraploides ($2n=2x=52$), dentre estas, o *G. hirsutum* (A_1D_1) (SUN *et al.*, 2006; GROVER *et al.*, 2014), que possui um genoma bastante complexo com tamanho de 2,5 Gb (WANG *et al.*, 2018). O genoma do algodão é altamente complicado devido aos altos níveis de redundância gênica, aos vários eventos de duplicação de genoma, antes e após a alelopoloidização (ADAMS *et al.*, 2003). Foi relatado que uma duplicação total do genoma de algodão diploide, semelhante ao ancestral *G. raimondii* (D_5), ocorreu aproximadamente há 60 milhões de anos atrás com aumento de cinco a seis vezes da ploidia (RENNY-BYFIELD *et al.*, 2014). Em virtude de suas sequências homólogas e grande parte de repetições, dois mapas genômicos preliminares foram realizados até 2015, com as informações do genoma de referência de *G. raimondii* (D_5) e *G. arboreum* (A_2), progenitores diploides (PATERSON *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015). Recentemente, novas análises do genoma de *G. hirsutum* foram disponibilizadas (HU *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019).

O algodoeiro (*G. hirsutum* L.), planta dicotiledônea da família Malvaceae, é cultivado em regiões de todos os continentes, devido ao seu alto rendimento e importância como fornecedor de matéria-prima para indústrias (SOUZA, 1996; WENDEL *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2019). Essa espécie representa a maior fonte de fibras têxteis naturais do mundo,

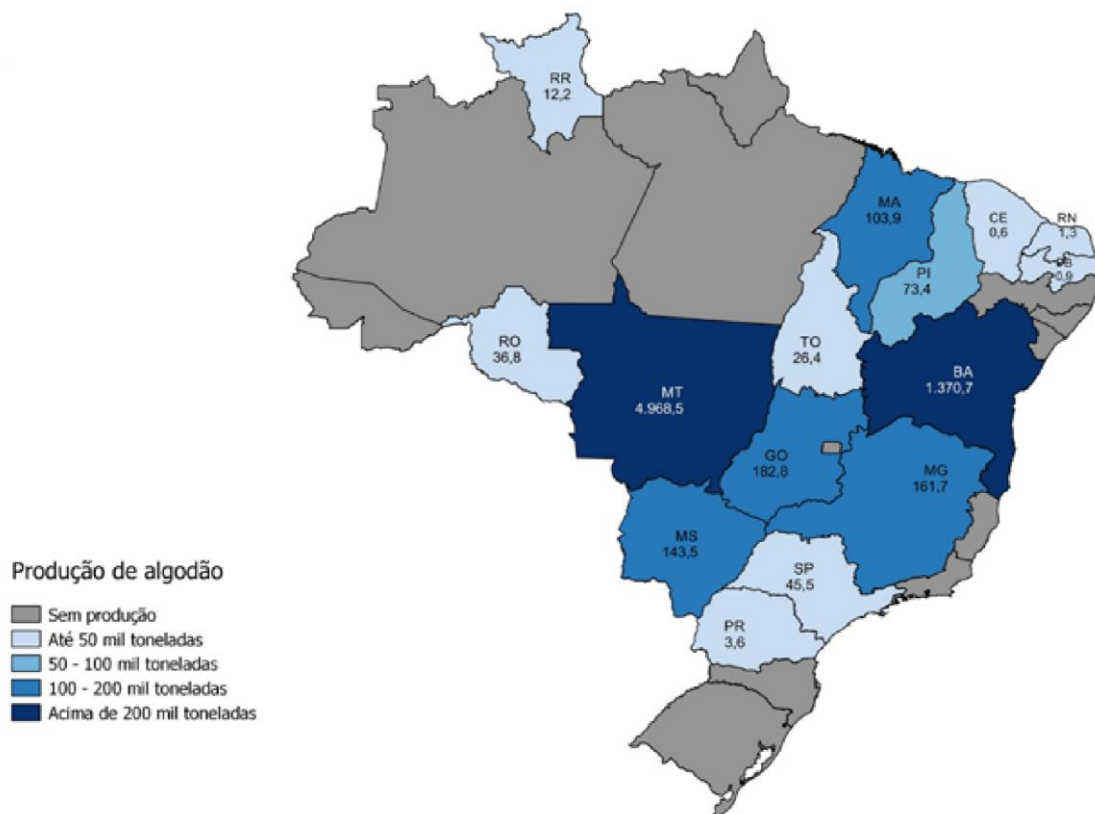
responsável por mais de 90% da produção anual de fibras de algodão (WENDEL *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 2019). Identifica-se geralmente como uma planta perene, produzindo economicamente por aproximadamente 5 anos (SOUZA, 1996), porém, na prática, os agricultores o cultivam como uma planta anual, o que aumentou a produtividade por área (PATERNIANI, 2001). Além disso, existem diversos produtos diretamente derivados que desempenham papéis cruciais na vida cotidiana e geram um grande “*input*” na economia mundial. A produção do algodão fornece renda para 100 milhões de famílias em aproximadamente 150 países e seu impacto econômico anual mundial foi avaliado em, aproximadamente, US\$ 500 bilhões (GUAN; SONG; CHEN, 2014; LI; ZHANG, 2016). O algodão e seus subprodutos são usados para a fabricação de colchões, papel especial, plásticos, creme dental, óleo de salada, ração, fertilizantes, entre outros (WILKINS; RAJASEKARAN; ANDERSON, 2000; GUAN; SONG; CHEN, 2014). Outras utilizações já estudadas para o algodão, referem-se ao composto fenólico gossipol (presente nos tecidos da planta, principalmente na semente), que apresenta atividade anticancerígena, além de propriedades que a caracteriza para uso como anticoncepcional masculino (COUTINHO, 2002; MOON *et al.*, 2008).

O algodão é amplamente distribuído no centro e no norte da América do Sul, no Caribe e chega até a ilhas distantes no Pacífico (Ilhas Salomão e Marquesas). Essa planta já é conhecida há mais de 7 mil anos a.C., e tecidos produzidos com algodão já existiam há aproximadamente, 3 mil anos a.C. na Índia (conhecida como o centro de origem do algodão). Em 1576, no Brasil, os indígenas já usavam o algodão para preparar fios e tecidos, e usavam as sementes para preparar alimentos. Em 1760, o estado do Maranhão já exportava 130 sacas de algodão para a Europa e em 70 anos passou a exportar 78.300 sacas (PORTO, 2016). No ano de 1919, havia 202 fábricas de tecidos de algodão Brasil, distribuídas nos estados de São Paulo (49), Minas Gerais (43), Distrito Federal e Rio de Janeiro (17) e na Bahia (13). Nessa época, a indústria têxtil nacional respondia por 75% a 80% da produção de tecidos de algodão consumidos no Brasil (COSTA; BUENO, 2004). Em 1933, a produção de algodão brasileira era de aproximadamente, 500.000 sacas e, em 1937, essa produção aumentou para quase três milhões, a qual era exportada, principalmente, para Inglaterra, Alemanha e Japão (KIAWU; VALDES; MACDONALD, 2011). Em 1996, o algodão contribuía com cerca de 50% para a indústria têxtil mundial, o que justificou sua importância internacional.

As lavouras de algodão corresponderam a 32.596,10 mil hectares de área plantada no mundo na safra 2018/19, sendo que a Índia possui a maior área plantada (12.250 mil hectares), seguida pelo Estados Unidos (EUA) (4.130 mil hectares), China (3.367 mil hectares) e

Paquistão (2.325 mil hectares). O Brasil ocupa a 5ª posição mundial em área plantada de algodão (1.618,2 mil hectares), destacando-se por ser uma das cultivares agrícolas mais importantes do País (ABRAPA, 2020). No Brasil, a Região Centro-Oeste é a principal produtora de fibra, com cerca de 1.237,6 mil hectares plantados somente na região, sendo mais de 93% produzida no estado do Mato Grosso (Figura 1.1). O Brasil encontra-se como o quarto maior produtor de pluma de algodão do mundo (2.613 mil toneladas), estando abaixo da Índia (6.314 mil toneladas), China (6.042 mil toneladas) e EUA (4.790 mil toneladas). Para a safra de 2019/20, há uma expectativa de produção de 2.850 mil de toneladas de algodão em pluma no Brasil (CONAB, 2020). Esses dados colocam o País no patamar de competitividade, produtor e consumidor de algodão, além da forte participação como exportador no mercado mundial.

Figura 1.1 – Mapa da produção agrícola do algodão no Brasil. Os números dentro do mapa representam o valor absoluto da produção do algodão em mil toneladas.



Fonte: CONAB (2020).

O crescimento e a produtividade da cultura do algodão são muitas vezes dificultados por diferentes estresses bióticos e abióticos. Os estresses bióticos são os mais frequentes, o que resulta na queda da produtividade da cultura e, dentre estes, pode-se citar insetos-praga (37%),

ervas daninhas (36%) e patógenos (9%). Cerca de 30% da produção de algodão é perdida devido ao ataque de insetos-praga, apesar das medidas para o controle pela aplicação de pesticidas químicos (OERKE, 2006; GOUDA *et al.*, 2014).

1.2 FITONEMATOIDES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DO ALGODÃO

Na natureza, as plantas são constantemente submetidas a uma gama dinâmica de insetos-praga e patógenos, que desafiam sua capacidade de crescimento e sobrevivência. Uma importante restrição à produção sustentável é o impacto de pragas de solo e, dentre estas, os fitonematoides configuram como uma das principais pragas agrícolas, causando sérios danos às culturas e acarretando prejuízos econômicos (GOULART, 2010). Perdas devido aos NPPs foram estimadas em US\$ 358,24 bilhões anualmente em todo o mundo (ABD-ELGAWAD; ASKARY, 2015). As espécies de fitonematoides que se destacam por causarem danos significativos à produção mundial de algodão são: *M. incognita*, *R. reniformis*, *P. brachyurus*, *Hoplolaimus columbus* e *Belonolaimus longicaudatus* (BRIDGE, 1992; STARR, 1998; STARR *et al.*, 2007). No Brasil, sabe-se que *M. incognita*, *R. reniformis* e *P. brachyurus* ocorrem em 24,4%, 12,8% e 96,2% no Estado do Mato Grosso, respectivamente (GALBIERI; ASMUS, 2016), principal região produtora de algodão do País.

Nesse cenário, os NFG de raiz (*Meloidogyne* spp.) atacam mais de 2000 espécies de plantas (ELLING, 2013), e representam possivelmente uma das espécies mais danosas do mundo, no qual a informação mais recente diz que esses geram perdas globais de aproximadamente US\$ 157 bilhões anuais (ABAD *et al.*, 2008; SINGH; SINGH; SINGH, 2015). Esse fato ocorre devido à grande variedade de hospedeiros desses fitonematoides, que vão desde as principais culturas agrícolas, como algodão (*Gossypium* spp.), soja (*Glycine max.*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) e arroz (*Oryza sativa*), até plantas lenhosas, incluindo as principais espécies madeireiras (PAN *et al.*, 2019). Isso se deve às características fisiológicas e ecológicas dessas plantas, como o curto período de geração, alta taxa reprodutiva e capacidade de formar complexos com outros patógenos transmitidos pelo solo, como fungos (TRUDGILL; BLOK, 2001; BACK; HAYDOCK; JENKINSON, 2002).

O controle de fitonematoides possui um alto custo para os produtores de algodão, quando comparado com qualquer outra classe de doenças de plantas. Isso ocorre devido aos custos relacionados ao combate químico, danos diretos da alimentação nas raízes, perdas indiretas e maior susceptibilidade às murchas. Esse elevado custo correspondeu a US\$ 464,49 milhões em 2016 e foi apenas parcialmente efetivo (NEVES; PINTO, 2017). Portanto, pode-

se concluir que uma das maneiras mais segura e eficaz de se controlar os fitonematoides é a partir do desenvolvimento de cultivares resistentes. Visto que não há aumento dos custos de produção, não interfere no meio ambiente e não leva a desequilíbrios ambientais (BARBOSA *et al.*, 2009; STARR; BRIDGE; COOK, 2002; DAVIS; STETINA, 2016). Porém, as fontes de resistência existentes não estão sendo usadas pelas empresas obtentoras comerciais, uma vez que a avaliação desse item é muito laboriosa e dispendiosa (COTTON INCORPORATED, 2017).

Em 2006, foram identificados dois principais genes no algodoeiro que conferem resistência a *M. incognita*, a partir do RNR Auburn 623, resultante do cruzamento entre os algodoeiros resistentes Clevevilt 6 e Will Jack Jones (SHEN *et al.*, 2006). A fonte dos genes de resistência está nos cromossomos 11 e 14 e parecem ter diferentes modos de ação, resultando em um mecanismo de resistência com dois estádios. Os genes presentes no cromossomo 11 não impedem a penetração dos J2, contudo, logo após a penetração, o desenvolvimento desses juvenis é inibido. Já no cromossomo 14, esses genes expressam a forma mais tardia da resistência, prevenindo ou reduzindo a produção de ovos, porém, não impede a formação de galhas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2010; HE *et al.*, 2014). Desta forma, esses dois genes são complementares para permitir que o algodão apresente uma resposta de resistência a *M. incognita*. No entanto, depender exclusivamente de apenas dois genes de resistência irá aumentar a pressão de seleção sobre as populações de fitonematoides, ampliando assim a probabilidade do desenvolvimento de populações resistentes. Portanto, a combinação dos atuais genes de resistência com outros novos, que possuam diferentes modos de ação, deve prolongar a competência dos genes (DAVIS; STETINA, 2016).

Até 2017, não existiam no mercado, variedades de algodão que apresentassem características agronômicas rentáveis e um nível de resistência contra *M. incognita*. Dessa forma, é importante identificar e caracterizar as fontes de resistência e incluí-las no germoplasma melhorado (ALVES *et al.*, 2017). Porém, em 2018, foi lançada a variedade de algodão IMA 5801B2RF, que é resistente a *M. incognita* e à ramulária (IMAMT, 2018). Contudo, sabe-se que os fitonematoides possuem uma alta taxa de adaptação e, portanto, uma abordagem para o desenvolvimento de novas metodologias de controle que explorem as diferenças fundamentais entre a biologia dos fitonematoides e a de suas plantas hospedeiras se faz necessário (CHITWOOD, 2003).

1.3 MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO DE ALGODÃO

A transformação de plantas consiste na incorporação de uma molécula de DNA exógena de forma estável no genoma alvo. Atualmente, existem dois principais métodos de transformação para o desenvolvimento de plantas GM: *Agrobacterium* spp. e transformação genética mediada por bombardeamento de partículas. Entre suas etapas, a regeneração das plantas, seja por embriogênese somática ou organogênese é relevantemente necessária (WILKINS; MISHRA; TROLINDER, 2004; SAKHANOKHO *et al.*, 2005; BASSO *et al.*, 2020).

O mecanismo de transferência de genes entre o *Agrobacterium* spp. e plantas facilitou a inserção de genes externos benéficos em diversos genomas vegetais (JOHN, 1997; BARTON *et al.*, 1983). A transformação genética, mediada por *Agrobacterium* spp., tem sido um método amplamente utilizado e preposto para transferir genes para plantas (WILKINS; RAJASEKARAN; ANDERSON, 2000), por possuir baixo custo operacional e elevada reprodutibilidade dos protocolos de transformação (BRASILEIRO; CABRAL; SILVA, 2015).

Firoozabady *et al.* (1987) e Umbeck *et al.* (1987) foram os primeiros a conseguir algodões GM, a partir de hipocótilos e cotilédones, via embriogênese somática. Embora certas variedades de algodão tenham sido transformadas por *Agrobacterium* spp., e as plantas tenham sido subsequentemente regeneradas através da embriogênese, as cultivares comercialmente importantes mostraram-se recalcitrantes para a regeneração. Isso se deve, principalmente, à sua incapacidade de desenvolver tecidos embriogênicos (CHAKRAVARTHY *et al.*, 2014). Esse método é bastante utilizado para realizar a transferência de transgenes de um DNA de transferência (T-DNA) da *A. tumefaciens* para a célula da planta. Essa bactéria possui capacidade de infectar plantas feridas e transferir uma sequência específica de um plasmídeo (Ti, *Tumour inducing*), o T-DNA, para a célula vegetal. A expressão que ocorre nas células vegetais de genes, presentes no T-DNA (chamados oncogenes), interferem na biossíntese de fito-hormônios. Quando as células são infectadas por *A. tumefaciens*, essa expressão leva à formação da galha-da-coroa. A região *vir* do plasmídeo Ti é essencial para a transferência do T-DNA, pois esta contém genes que, quando expressos, irão promover a transferência do T-DNA, que será integrada ao genoma da planta (GELVIN, 2003; HWANG *et al.*, 2017).

Outro método, comumente utilizado para transformar plantas de algodão, é a biobalística. Este método se baseia no uso de partículas de metal, em alta velocidade, para fornecer DNA biologicamente ativo nas células vegetais (CHAKRAVARTHY *et al.*, 2014). Após a penetração das células vegetais pelas partículas, o DNA se desassocia das partículas e

é integrado no genoma da planta, podendo então ser expresso. Finer e McMullen (1990) foram os primeiros a obter plantas de algodão GM por bombardeamento de partículas de culturas, derivadas de calos embriogênicos. Apesar de diversas transformações bem sucedidas (KUMAR; DHINGRA; DANIELL, 2004; LIU *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2017), um certo número de desvantagens, tais como baixa frequência de transformação de explantes, ocorrência de quimeras, alta frequência de transformantes epidérmicos, inserção de cópias fragmentadas de transgenes, co-supressão devido a cópias múltiplas foram encontradas associadas ao sistema de transformação por bombardeamento de partículas (DEBLOCK, 1993; DEPICKER; VAN MONTAGU, 1997; WILKINS; RAJASEKARAN; ANDERSON, 2000).

1.4 ALGODÃO GENETICAMENTE MODIFICADO

O melhoramento clássico de plantas é a melhor maneira de se realizar a domesticação do algodão e, assim, obter variedades resistentes. Com o avanço da engenharia genética foi possível obter plantas geneticamente modificadas (GM), que oferecem a possibilidade de melhorar as culturas existentes (plantas resistentes a estresses bióticos e abióticos), que são na maioria, as principais commodities para exportação em países em desenvolvimento (PICKERSGILL, 2007; NAVARRETE *et al.*, 2016). O conhecimento sobre o genoma do algodão aumentou consideravelmente nas duas últimas décadas, principalmente com a descoberta e aprimoramento de diferentes técnicas de sequenciamento gênico. Com a obtenção do genoma do algodão foi possível selecionar uma série de genes candidatos, para melhorar sua qualidade e sua produtividade (YU *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019). Desde 1996, a tecnologia dos transgênicos instituiu uma reestruturação da cadeia produtiva no mundo, sendo que, em 2018, foram contabilizados 191,7 milhões de hectares plantados com plantas GM (ISAAA, 2019). A crescente conscientização dos problemas, associados ao uso indiscriminado de pesticidas e a falta de características desejadas no germoplasma de algodão, aumentou o interesse em adotar o uso de transgênicos (ISAAA, 2016). Os benefícios econômicos estimados gerados pelas culturas GM de 2003 a 2016 no Brasil foram de US\$ 19,8 bilhões e de US\$ 3,8 bilhões somente em 2016. Essas culturas beneficiam cerca de 300.000 agricultores no País cuja situação econômica melhorou desde que passaram a adotar essa tecnologia (ISAAA, 2017).

Em 2018, a maior área de culturas GM plantadas pertencia ao EUA, Brasil, Argentina, Canadá e Índia, correspondendo a 75, 51,3, 23,9, 12,7 e 11,6 milhões de hectares, respectivamente. Coletivamente, esses países ocupam 91% da área global de culturas GM. A

área plantada mundial de algodão GM alcançou 24,9 milhões de hectares. A área plantada com algodão GM é liderada pela Índia (11,6 milhões de hectares), seguido pelos EUA (5,06 milhões de hectares), China (2,93 milhões de hectares), Paquistão (2,8 milhões de hectares) e Brasil (1 milhão de hectares). A adoção contínua de culturas biotecnológicas por agricultores em todo o mundo (93%) indica que as culturas biotecnológicas continuam a ajudar a atender desafios globais de fome, desnutrição e mudanças climáticas (ISAAA, 2019). Dentre os benefícios da tecnologia GM, os mais importantes, para o agricultor, são os ganhos de produtividade, maior rendimento operacional e menor tempo gasto no manejo da safra, ou seja, facilidade de manejo (CELERES, 2014).

Com o advento de novas tecnologias aplicado ao melhoramento de organismos vivos, a prospecção e caracterização de genes e moléculas que podem conferir características de melhoramento às plantas, tem sido o alvo de diversos grupos de pesquisa (BRASILEIRO; CARNEIRO, 2015), como a tecnologia de RNA interferente (RNAi). Uma das vantagens de plantas transgênicas com resistência mediada por RNAi, é a incapacidade de tradução inerente de dsRNA para produzir uma proteína funcional, além de incluir a probabilidade de uma excelente biossegurança e a possibilidade de empilhamento de vários genes de resistência (essenciais e/ou efetores) (BAKHETIA *et al.*, 2005a; RODERICK; URWIN; ATKINSON, 2018). Esse recurso, combinado com alta especificidade do RNAi, faz desta tecnologia uma estratégia que pode, finalmente, fornecer uma abordagem de controle de pragas segura e abrangente, adequada tanto para produtores orgânicos como não orgânicos (BURAND; HUNTER, 2013).

Tendo em vista o número reduzido de genótipos de algodão resistentes aos NFG e o aumento de áreas contaminadas com este fitonematoide, tornam-se necessários estudos focados na identificação de novas fontes de resistência. Altos níveis de resistência poderão ser alcançados com a piramidação de sequências de dsRNAs de dois ou mais genes potencialmente envolvidos no parasitismo de fitonematoides, já caracterizados individualmente, em plantas modelo. Esta estratégia permitirá a obtenção de linhagens, que poderão ser introduzidas em programas de melhoramento genético convencional, para o desenvolvimento de novos cultivares.

2 HIPÓTESE

Plantas de *G. hirsutum* GM para expressão piramidal de dsRNAs para os genes *Mi-cpl*, *Mi-icl* e *Mi-fs*, dirigidas pelo promotor constitutivo *uceS8.3*, conferirão fenótipo de resistência a *M. incognita*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar prova de conceito em plantas de algodão GM, expressando moléculas de dsRNAs para os genes cisteína protease (*Mi-cpl*), isocitrato liase (*Mi-icl*) e fator de *splicing* (*Mi-fs*), visando obter resistência ao fitonematoide *M. incognita*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Transformar geneticamente embriões da variedade de algodão BRS 372, por meio da técnica de biobalística, com cassete de expressão, contendo o promotor *uceS8.3* e os dsRNAs para os genes *Mi-cpl*, *Mi-icl* e *Mi-fs*;
- Cultivar os eventos de algodão transformados em casa de vegetação;
- Caracterizar as plantas de algodão GM, dentre os indivíduos potencialmente transformados por imunodeteção e PCR;
- Determinar o número de cópias dos transgene por qPCR;
- Realizar bioensaios de infecção das plantas com *M. incognita*, para avaliação do número de galhas, massa de ovos e fator de reprodução;
- Quantificar o silenciamento gênico nas galhas das plantas de algodão GM, por meio da técnica de RT-qPCR;
- Verificar se existem diferenças morfológicas entre as células gigantes das plantas controle e das plantas GM, expressando os dsRNAs, após infecção com *M. incognita*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSTRUÇÃO GÊNICA

O cassete de expressão usado na transformação genética de algodão foi projetado para a expressão de fragmentos *in tandem* de seqüências de cDNAs senso e anti-senso (BASSO *et al.*, 2020) para os genes de *M. incognita* *Mi-cpl* (201 pb) (Nº de acesso: AJ557572), *Mi-icl* (234 pb) (não depositada) e *Mi-fs* (200 pb) (AW828516) sob o controle do promotor constitutivo da proteína conjugada da ubiquitina (*uceS8.3*) da soja (GROSSI-DE-SA *et al.*, 2010; FRAGOSO *et al.*, 2020, submetido), seguido pelo terminador do sinal de poliadenilação da nopalina sintetase (*T-nos*). As seqüências alvo senso e anti-senso foram separadas por uma seqüência de ligação oriunda do *intron* da piruvato desidrogenase quinase (PDK) de 748 bp de comprimento para a formação de dsRNA auto complementar. As seqüências dos genes marcadores do herbicida acetohidroxiácido sintase (*ahas*) (ARAGÃO *et al.*, 2000) e resistência ao bialaphos (*bar*) (THOMPSON *et al.*, 1987) foram incluídas para conferir tolerância ao Imazapir e ao glufosinato de amônio, respectivamente. O cassete de expressão foi sintetizado quimicamente pela Epoch Life Science, Inc. (Texas) e clonada no vetor pCambia 3300 (Figura 1.2). O cassete de expressão *dsMinc1* (10.781 pb) foi excisado do vetor por digestão com a enzima de restrição *Bam*HI, antes da transformação do algodão.

Figura 1.2 – Cassete de expressão *dsMinc1*. Representação esquemática do cassete de expressão *dsMinc1* (10.781 pb) contendo fragmentos de dsRNAs, *in tandem* senso e anti-senso provenientes de três diferentes genes de *M. incognita* (*Mi-cpl*, *Mi-icl* e *Mi-fs*) sob o controle do promotor *uceS8.3*, seguido pelo terminador *Nos* (*T-nos*). Bordas esquerda e direita do vetor binário (LB e RB - *left* e *right* borders), respectivamente. Os marcadores de herbicidas incluíram o gene da aceto-hidroxiácido sintase (*ahas*), controlado por seu promotor e terminador (*ahas-t*), e o gene de resistência ao glufosinato de amônia (*bar*), controlado pelo promotor duplicado *35S 2x* do vírus do mosaico da couve-flor (*35S 2x*) e *T-nos*.



4.2 MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas sementes de algodão (*G. hirsutum*) da cultivar BRS 372 (Embrapa, Brasil), as quais foram deslindadas com ácido sulfúrico (Emsure[®], Cód. 100731) concentrado e

desinfestadas com álcool etílico 70% (Baker[®], Cód. 901402), hipoclorito de sódio 3%, e lavadas com água destilada. Posteriormente, foram acondicionadas em um recipiente estéril, contendo álcool 70%, permanecendo por 1 minuto. Após o descarte do álcool, foi adicionado hipoclorito de sódio 2% em quantidade suficiente para cobrir todas as sementes, durante 20 minutos. O hipoclorito de sódio foi descartado e as sementes lavadas cinco vezes em água estéril. As sementes deslindadas e desinfestadas permanecem no escuro, imersas em água estéril por 18 a 20 horas. Após este período, a água foi retirada e as sementes continuaram no recipiente úmido e escuro, por 48 horas, até a germinação dos embriões.

4.3 TRANSFORMAÇÃO DAS PLANTAS DE ALGODÃO

A transformação dos embriões de algodão foi realizada, por meio da técnica de biobalística, utilizando 5 µg do cassete de expressão, como descrito em Rech, Vianna e Aragão (2008), com modificações. Após o bombardeamento, os eixos embrionários foram transferidos imediatamente para a cultura/seleção (1x meio de sais basais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), glicose a 3%, N-Benzil-9-(2-tetrahidropiranyl)-adenina (BAP) 13,3 mM, Imazapir 300 nM (BASF[®], Germany), carvão ativado 0,1% e ágar 0,6%, pH 5,7) e cultivado a 28 °C sob fotoperíodo de 16 h ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Após 30 dias, os explantes resistentes ao Imazapir foram transferidos para um novo meio de cultura sem Imazapir para alongação de brotos e raízes. Posteriormente, as plântulas foram transferidas individualmente em um copo (0,2 dm³) contendo areia e vermiculita (1:1) e, em seguida, cobertas com saco plástico para aclimação e mantidas em casa de vegetação. Após uma semana, as plantas aclimatadas foram transferidas para recipientes maiores (5 dm³) contendo solo fertilizado para o desenvolvimento natural das plantas e obtenção de sementes. Simultaneamente, cultivaram-se plantas BRS 372 não transformadas (tipo selvagem - WT) como controles negativos para plantas de algodão GM com *dsMincl*, que foram finalmente aclimatadas numa estufa em condições semelhantes às mencionadas acima. As plantas foram testadas com o kit de imunodeteção do gene *bar*, Kit LibertyLink[®] (BASF[®], Germany), de acordo com as orientações do fabricante (ENVIROLOGIX, 2007). Após a seleção dos eventos positivos nesses testes, foi dado o início às análises moleculares para a identificação de plantas transformadas com o gene de interesse.

4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PLANTAS DE ALGODÃO GM

O DNA genômico foi extraído de cerca de 20 mg de tecido foliar fresco dos eventos de transformação primários (T_0) pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987), com modificações, conforme descrito por Zhang e Hong (2013). Após a extração, foi realizado a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para detectar os eventos de algodão com a presença do cassete de expressão *dsMinc1*, utilizando os oligonucleotídeos que amplificam o gene *bar* e o promotor *uceS8.3*, descritos na tabela 1.1. A PCR incluiu uma combinação do Hot Start Taq Master Mix Kit (QIAGEN®, Alemanha), 40 ng de DNA genômico de plantas de algodão (GM e WT) e 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo. O sistema de amplificação por PCR foi configurado no seguinte programa no termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad): desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min e 35 ciclos a 95 °C durante 45 s, 60 °C durante 45 s e 72 °C durante 1 min e uma extensão final a 72 °C durante 5 min. O DNA genômico das plantas WT foi usado como controle negativo, enquanto o cassete de expressão *dsMinc1*, usado para a transformação do algodão, foi utilizado como um controle positivo. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados por coloração com brometo de etídio (0,2 mg mL⁻¹).

Plantas PCR positivas foram mantidas em vasos de 5 L em casa de vegetação a 26 °C e suas flores foram autofecundadas selando as pétalas antes da antese, para o avanço da geração. Após a geração de sementes, essas foram colhidas para extração de DNA para uma nova confirmação. A extração do DNA das sementes foi realizada, de acordo com McDonald, Elliot e Sweeney (1994), com modificações. As flores das plantas T_0 positivas foram submetidas à autofecundação manual para obtenção da geração T_1 , cujas progênies foram caracterizadas posteriormente.

Tabela 1.1 – Oligonucleotídeos utilizados na caracterização molecular de plantas de algodão GM, transformadas com o cassete de expressão *dsMinc1*, e na avaliação do silenciamento de *M. incognita*.

Nome do oligonucleotídeo	Sequências (5' – 3')	T _M (°C)	Tamanho do amplicon (bp)	Ensaio
bar_Fw	GGCCAGCAGATATTCGTAGAG	60	377	Detecção de cassetes de transformação em plantas de algodão GM por PCR
bar_Rv	ATCGTTAGGGAGACCGATCA			
uceS8.3_Fw	GGTATTTGTGAGTGTGTGAGAGAGA	58	257	Detecção de cassetes de transformação em plantas de algodão GM por PCR
uceS8.3_Rv	GACGATACGCGTTCAGATCTGAAAG			
ahas_Fw	GTCACTGGGTAAATATCTCTCGAATCTTGCA	57	479	Determinação do número de cópias em cassete no genoma GM do algodão
ahas_Rv	CCTACTTCCAATGTCTGATTAGTGCTTCTGG			
ghubc1_Fw	TGGCATTATATTGTCATTGTTACTATCC	55	121	Determinação do número de cópias em cassete no genoma GM do algodão
ghubc1_Rv	ACCATGTTATCTTATTCTAAGACAAGCTC			
MincGAPDH_Fw	AGCAATGGAAATTTGGTAGTTGA	60	200	Determinação dos níveis de transcrição de transgene em galhas geradas por <i>M. incognita</i> (RT-qPCR)
MincGAPDH_Rv	GGAGCTGAGATAACCACCTTCTT			
MincACT_Fw	GATGGCTACAGCTGCTTCGT	60	218	Determinação dos níveis de transcrição de transgene em galhas geradas por <i>M. incognita</i> (RT-qPCR)
MincACT_Rv	GGACAGTGTTGGCGTAAAGG			
MincEF1_Fw	TGGGAGTCAAGCAACTTATCG	60	272	Determinação dos níveis de transcrição de transgene em galhas geradas por <i>M. incognita</i> (RT-qPCR)
MincEF1_Rv	GTCAAGGGCTTCCAACAAAGT			
MincICL1_Fw	CGTGACTGGTATGTTCCCATAG	60	95	Determinação dos níveis de transcrição de transgene em galhas geradas por <i>M. incognita</i> (RT-qPCR)
MincICL1_Rv	CCAGCTTCGATATAGGCTTTCA			
MincCLP1_Fw	AAAGCATCAACGGGACTATAACC	60	92	Determinação dos níveis de transcrição de transgene em galhas geradas por <i>M. incognita</i> (RT-qPCR)
MincCLP1_Rv	GCTTGCGGTATTGGTTGAAAG			
MincSPL_Fw	GCTTCCGCTGCAAAGAAAT	60	107	Determinação dos níveis de transcrição de transgene em galhas geradas por <i>M. incognita</i> (RT-qPCR)
MincSPL_Rv	GTATGTGGTGTGCTCAACTTTAC			

4.5 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO CASSETE DE EXPRESSÃO *dsMinc1* NO GENOMA DE PLANTAS DE ALGODÃO GM POR MEIO DE qPCR

O número de cópias do cassete de expressão do transgene *dsMinc1* no genoma de plantas de algodão GM foi determinado de acordo com Yang *et al.* (2012) em plantas de eventos T₀ de algodão, por meio da técnica de qPCR $2^{\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para este propósito, o DNA genômico de plantas de algodão WT e *dsMinc1* foi extraído a partir de 100 mg de folhas frescas, utilizando o kit DNeasy Planta Maxi (Qiagen®), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do DNA foi determinada tanto por espectrofotometria em comprimento de onda de 260 nm, quanto em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio (0,2 mg mL⁻¹). O DNA genômico (20 ng) das plantas GM T₀ foram utilizados como molde para a amplificação do gene *ahas* e do gene endógeno do algodão ubiquitina (*ghubc1*), presentes no cassete de DNA pBSK::*ghubc1*::*ahas*, usadas para calcular o número de cópias do transgene, utilizando os oligonucleotídeos *ahas_Fw* e *ahas_Rv*.

Primeiramente, a quantidade absoluta dos dois genes foi determinada em relação a curvas padrão. Duas curvas padrão foram obtidas através da representação gráfica dos valores de Ct em relação a diluições em série do plasmídeo pBSK::*ghubc1*::*ahas* (10¹, 10², 10³, 10⁴ e 10⁵). O número de cópias do plasmídeo foi calculado com os valores de Ct com base nas curvas de normalização. O número relativo de cópia do gene alvo foi obtido pela relação entre a quantidade absoluta de gene alvo e do gene endógeno na mesma amostra.

4.6 MULTIPLICAÇÃO DE FITONEMATOIDES E EXTRAÇÃO DOS OVOS

Os fitonematoides (*M. incognita*, raça 3) foram propagados e mantidos em plantas de tomateiro (*S. lycopersicum* L. cv. Santa Clara) cultivadas em casa de vegetação por três meses. A coleta dos fitonematoides foi realizada em diferentes estádios de desenvolvimento (28 a 90 dias após a inoculação). Os ovos foram extraídos de acordo com Hussey e Barker (1973), com modificações. Raízes de tomateiro foram trituradas no liquidificador por um minuto em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5%. Em seguida, o material foi peneirado e lavado em um conjunto de peneiras de 100, 200 e 500 mesh, até completa retirada do hipoclorito. Os ovos retidos na peneira de 500 mesh foram contados com o auxílio de uma Câmara de Peters (VRAIN, 1977) e, após ajuste da concentração (5.000 ovos mL⁻¹) foram inoculados nas plantas.

4.7 BIOENSAIOS DE INFECÇÃO DE *M. incognita* EM PLANTAS DE ALGODÃO GM

Para o desafio das plantas de algodão GM ao *M. incognita*, foram obtidas sementes da geração T₂ e T₃, para cada bioensaio subsequente, por meio da autofecundação das flores das progênes selecionadas. Para a geração das plantas T₂, foram selecionadas dez sementes PCR positivas de cada evento GM e para a geração T₃, foram escolhidas dez sementes aleatoriamente de três eventos GM e, dos controles de resistência e susceptibilidade. As sementes foram germinadas em papel Germitest e, após 5 dias, as plântulas foram transferidas para sacos plásticos, contendo 2 L de substrato composto por areia, solo estéril e matéria orgânica (1:1:1) (Bioplant, Brasil). Esta etapa foi conduzida em casa de vegetação e a avaliação foi realizada no Laboratório de Nematologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Após 15 dias da semeadura, cada planta foi inoculada com aproximadamente 8.000 ovos, distribuídos em três orifícios de 2 cm de profundidade adjacentes ao caule da planta. Após 120 dias da inoculação (DAI), cada planta teve seu sistema radicular lavado cuidadosamente para a remoção do substrato, mantendo a parte aérea intacta, e submetida à avaliação quanto a infecção pelo fitonematoide.

As plantas das gerações T₂ e T₃ de três eventos GM independentes (T₀) foram analisadas e organizadas em um delineamento inteiramente ao acaso. A triagem das progênes T₂ e T₃ foi composta por 10 plantas em uma única linha. Tendo em vista o elevado número de indivíduos (plantas), foi realizado um *screening*, no qual, cada progênie foi pontuada individualmente quanto ao índice de galhas (IG) (TAYLOR; SASSER, 1978), nota 1 = altamente suscetível (> 51 a 100% de galhas); nota 2 = moderadamente suscetível (> 31 a 50% de galhas); nota 3 (< 30% de galhas) = resistente. As notas foram atribuídas em comparação com as plantas suscetíveis (WT) e com o padrão de resistência (genótipo de algodão M-315). O genótipo de algodão correspondente ao padrão de suscetibilidade (FM 966) foi adicionado ao bioensaio apenas como controle da multiplicação do fitonematoide. As plantas resistentes foram replantadas para obtenção das sementes por autofecundação.

Para a avaliação das progênes T₃ resistentes, primeiramente, as plantas foram classificadas pela seleção, descrita acima. Como a análise das raízes das plantas de algodão não poderia ser destrutiva, as raízes classificadas com nota 3 foram distribuídas em uma bancada para a excisão de 50% da raiz, preservando a raiz primária, cuja amostra teve o peso fresco determinado individualmente. Essas raízes foram mantidas em câmara fria para análises posteriores. As plantas com notas 3, e PCR positivas para o gene *bar*, foram replantadas para obtenção das sementes por autofecundação, e as com notas 1 e 2, e PCR positivas ou negativas,

foram descartadas (Figura 1.3). As raízes nota 3 foram coradas com Floxina B (TIHOHOD, 1993) e avaliadas quanto ao número de galhas, massa de ovos e número de ovos. Foram selecionadas, aleatoriamente, três raízes nota 1 e 2 de cada evento GM e três raízes de cada controle para as contagens. O fator de reprodução (FR) foi calculado como $FR = Pf/Pi$ (Pf: População Final; Pi: População Inicial). As três plantas selecionadas foram, então, replantadas e autofecundadas para gerar progênie T₄.

4.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS GIGANTES NAS PLANTAS EXPRESSANDO *dsMinc1*

Para verificar possíveis modificações morfológicas nas galhas de raízes de algodão expressando as moléculas de dsRNA do cassete de expressão *dsMinc1*, foram coletadas galhas do algodão WT (BRS 372), de plantas do controle de resistência (genótipo M-315) e de plantas de algodão GM geradas, 120 DAI. As galhas coletadas das raízes de algodão foram colocadas imediatamente em glutaraldeído 2% e submetidas a 20 minutos de vácuo para facilitar a penetração do fixativo no tecido. A fixação das galhas foi feita durante 15 dias, a 4 °C, sob agitação constante. O fixativo foi trocado a cada dois dias. As galhas já fixadas foram, então, submetidas ao processo de desidratação nas seguintes condições: 2 horas em etanol 15%; 2 horas em etanol 30%; 2 horas em etanol 50%, 16 horas em etanol 70%. No dia seguinte, seguiu-se com a desidratação: 2 horas em etanol 85% e pelo menos 6 horas em etanol 100%, trocando o etanol a cada 2 horas. Todo esse processo foi realizado no gelo para que a ação do álcool no tecido ocorresse lentamente. Depois de desidratadas, as galhas foram colocadas em solução de 50% Technovit® (Heraeus Kulzer), 50% etanol e mantidas a 4 °C, durante pelo menos 12 horas. Posteriormente, as galhas foram transferidas para 100% Technovit® líquido e mantidas nessa solução por sete dias a 4 °C. Após esse processo, as galhas foram embebidas em Technovit® sólido (0,1 g de Hardner I em 10 mL de Technovit®, adicionando-se 333 µL de Hardner II, para cada 5 mL dessa solução, para se obter a polimerização). Os blocos polimerizados de Technovit® foram cortados em micrótomo na espessura de 3 µm e os cortes distribuídos em lâminas de vidro tratadas com polilisina, como selante. As lâminas foram mantidas a 45 °C, por 16 h, para que os cortes ficassem perfeitamente aderidos à lâmina. Após a secagem, as lâminas foram coradas com azul de toluidina, por 5 minutos, e observadas em microscópio óptico (Axiocam, Zeiss) para análise morfológica das galhas.

4.9 AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO DOS GENES *Mi-cpl*, *Mi-icl* E *Mi-fs* EM FITONEMATOIDES EXTRAÍDOS DAS RAÍZES DE PLANTAS DE ALGODÃO GM POR PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

Para a extração do RNA total, foram selecionadas cinco galhas geradas por *M. incognita* em raízes de plantas de algodão T₃ com características semelhantes, a fim de otimizar a quantidade de nematoides coletadas que foi extraído, utilizando o PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen™, EUA). A integridade do RNA total extraído foi confirmada em gel de agarose 1% e visualizados por coloração com brometo de etídio (0,2 mg mL⁻¹). O RNA foi tratado com DNase I Turbo (Ambion®, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A síntese de cDNAs foi realizada utilizando o oligo NVd₃₀ e 1U da enzima *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT) (Sigma®), utilizando 820 ng de RNA total. As extrações de RNA e síntese de cDNAs foram realizadas em triplicadas biológicas, seguindo as recomendações dos fabricantes, e a quantificação foi realizada com o fluorímetro Qubit® (Invitrogen®, EUA).

Para análise da expressão relativa dos genes alvo do fitonematoide *Mi-cpl*, *Mi-icl* e *Mi-fs* foi utilizada a técnica de RT-qPCR, normalizada pela expressão dos genes endógenos, fator de alongação (*EFL*), actina (*ACT*) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) previamente identificados como genes de referência estável para análise RT-qPCR em *M. incognita* (RUTTER *et al.*, 2014; LOURENÇO-TESSUTTI *et al.*, 2015). Os oligonucleotídeos utilizados para os experimentos de RT-qPCR foram desenhados a partir de uma sequência de *M. incognita*, disponibilizada pelo INRA (<https://meloidogyne.inrae.fr/Credits>) (Tabela 1.1). As quantificações por RT-qPCR foram realizadas no equipamento QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). O mix utilizado para reação foi composto por SYBR® Green (PROMEGA®), água destilada, 500 mM de cada oligonucleotídeo e 2 µL do cDNA (1:10), totalizando um volume final de 10 µL para cada reação. Todas as reações foram realizadas em triplicadas biológicas e técnicas. As condições dos ciclos de PCR foram: 95 °C durante 10 min para ativar a hot-start Taq DNA polimerase, 40 ciclos a 95 °C durante 15 s (passo de desnaturação), 60 °C durante 1 min (etapa de anelamento dos oligonucleotídeos e extensão). Finalmente, a curva de dissociação foi criada após a amplificação para verificar a presença de produtos não específicos ou dímeros de oligonucleotídeos. Os controles negativos (NTC – *No template control*) foram preparados contendo somente água destilada e mix da reação para averiguar a possibilidade de amplificação inespecífica da reação. Os dados brutos de fluorescência para todas as corridas foram importados para o software de RT-qPCR, Miner

(ZHAO; FERNALD, 2005), a fim de determinar a eficiência da amplificação para cada gene. Os valores de Cq utilizados foram gerados pelo QuantStudio™ Design & Analysis Software (Applied Biosystems). A expressão gênica relativa foi determinada pelo método $\Delta\Delta Cq$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando o software SATqPCR, também utilizado para a análise estatística (teste de Tukey ($p < 0,05$)) (RANCUREL *et al.*, 2019). Os valores relativos de expressão foram determinados tendo como amostra referência plantas WT.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de número de galhas, massa de ovos e o fator de reprodução foram analisados estatisticamente utilizando o software R (R CORE TEAM, 2017), pacote *Easynova* (ARNHOLD, 2013). A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram confirmadas pelos testes Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. As diferenças entre médias foram determinadas pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 TRANSFORMAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PLANTAS DE ALGODÃO GM

Eixos embrionários de plantas de algodão da cultivar BRS 372 foram transformados com o cassete *dsMinc1*, contendo dsRNAs *in tandem* para os genes *Mi-cpl*, *Mi-icl* e *Mi-fs*, sob o controle do promotor *uceS8.3*, patenteado pelo nosso grupo de pesquisa (GROSSI-DE-SA *et al.*, 2010) (Figura 1.2), por bombardeamento de micropartículas (biobalística). Foram bombardeados 7.050 embriões com o vetor *dsMinc1*. Desses, 299 plântulas foram selecionadas *in vitro* e aclimatadas em casa de vegetação. Após o teste de imunodeteção, 52 plantas mostraram expressão do gene *bar*, indicando uma eficiência de transformação de 0,7%.

Todos os eventos primários (T_0) foram férteis e exibiram crescimento e fenótipo normais em comparação com as plantas de algodão WT. A análise por PCR confirmou a integração completa do T-DNA exógeno (gene específico e marcador *bar*) nos eventos independentes (T_0), bem como nas progênies T_1 , T_2 e T_3 . No total, foram obtidos sete eventos T_0 , os quais foram autofecundadas para obtenção das progênies T_1 .

Para avaliar o número de cópias do cassete de expressão do transgene *dsMinc1* no genoma de plantas de algodão GM T_0 foi aplicado o método $2^{\Delta\Delta C_t}$, baseado em qPCR. Para isso,

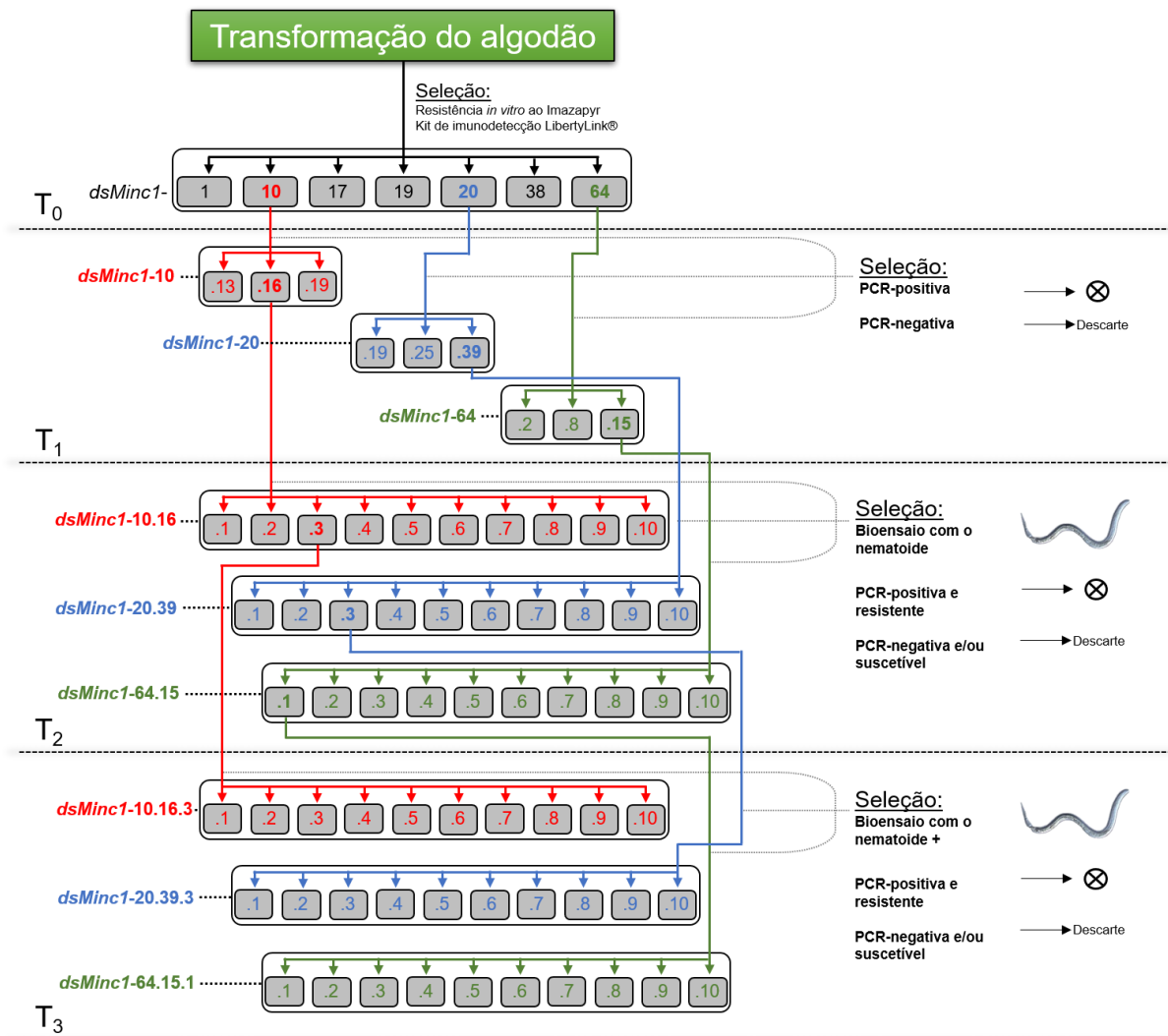
o nível de transcrição da cassete transgene foi determinado por qPCR em relação à expressão do gene de controle endógeno de uma planta para normalizar todas as variações de reação em relação às diferenças iniciais na concentração de DNA do molde. Assim, o DNA genômico dos eventos de algodão GM T₀ foi usado como molde para a amplificação por qPCR do gene *ahas*, presente no cassete de transgene *dsMinc1* e do gene endógeno do algodão *ghubc1* (ubiquitina). As curvas de amplificação para os genes *ahas* e *ghubc1* mostraram boa reprodutibilidade. Foi observada uma cópia para os eventos *dsMinc1-1* e *dsMinc1-10*, duas cópias para *dsMinc1-9*, *dsMinc1-17* e *dsMinc1-64* e três cópias *dsMinc1-38* e *dsMinc1-20* (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 – Relação das progênes T₀ de algodão transformado com o cassete de expressão *dsMinc1* e seus respectivos números de cópias do transgene estimado pela técnica de qPCR.

ID da planta	Número de cópias estimada
<i>dsMinc1-1</i>	1
<i>dsMinc1-10</i>	1
<i>dsMinc1-17</i>	2
<i>dsMinc1-19</i>	2
<i>dsMinc1-20</i>	3
<i>dsMinc1-38</i>	3
<i>dsMinc1-64</i>	2
WT	0

Os indivíduos T₁ foram selecionados por PCR, no qual as plantas positivas foram autofecundadas para obtenção das progênes T₂, as quais foram submetidas ao primeiro bioensaio de desafio contra *M. incognita*. Plantas que apresentaram fenótipo suscetível ao fitonematoide, mesmo sendo PCR positivas, foram descartadas. Sendo assim, apenas os eventos de transformação resistentes a *M. incognita* que exibiam o transgene foram selecionadas para a geração T₃, que, semelhantemente, foi desafiada contra *M. incognita*. Dez progênes T₃ resistentes, oriundas de cada um dos três eventos de transformação independentes T₀, foram selecionados para confirmação do transgene *dsMinc1*. O *pipeline* experimental usado para identificar e caracterizar os eventos de transformação de algodão GM é mostrado na figura 1.3.

Figura 1.3 – Pipeline experimental utilizado para identificar e caracterizar eventos de algodão GM expressando as moléculas de dsRNAs da construção *dsMinc1*. Após bombardear embriões de algodão (cultivar BRS 372) com cassetes linearizados da construção *dsMinc1*, as plantas de algodão transformadas foram selecionadas por resistência ao Imazapir, conferida pelo gene *ahas*. Uma vez aclimatados em casa de vegetação, as plantas T₀ foram caracterizadas pela expressão do gene *bar*, imunodetectação pelo Kit LibertyLink® e também selecionadas pela amplificação do gene *bar* por PCR (377 pb). Dessa forma, foram selecionados sete eventos de transformação de algodão T₀. Aleatoriamente, foram selecionados 3 eventos para o avanço de geração (*dsMinc1*-10, *dsMinc1*-20 e *dsMinc1*-64). A geração de algodão GM T₁ foi caracterizada por PCR, como na geração T₀. Dessa forma, foram selecionadas três plantas PCR positivas para cada evento de transformação T₀ selecionado (*dsMinc1*-10.13, *dsMinc1*-10.16 e *dsMinc1*-10.19; *dsMinc1*-20.19, *dsMinc1*-20.25 e *dsMinc1*-20.39; *dsMinc1*-64.2, *dsMinc1*-64.8 e *dsMinc1*-64.15) para constituir a geração T₁. Foi escolhido aleatoriamente um evento de cada planta de algodão GM (*dsMinc1*-10.16, *dsMinc1*-20.39 e *dsMinc1*-64.15) para o avanço de geração. Foram semeadas dez sementes de algodão T₂, as quais foram caracterizadas fenotipicamente em relação à resistência ao fitonematoide *M. incognita* e pela amplificação do gene *bar*, por PCR (377 pb). As plantas que apresentaram fenótipos com maior nível de resistência (*dsMinc1*-10.16.3, *dsMinc1*-20.39.3 e *dsMinc1*-64.15.1), quando comparados aos controles de susceptibilidade (BRS 372 e FM 966), foram selecionados para obtenção da geração T₃. Foram semeadas dez plantas de algodão T₃, que foram caracterizadas da mesma maneira que a geração T₂. Legenda: ⊗: autofecundação.



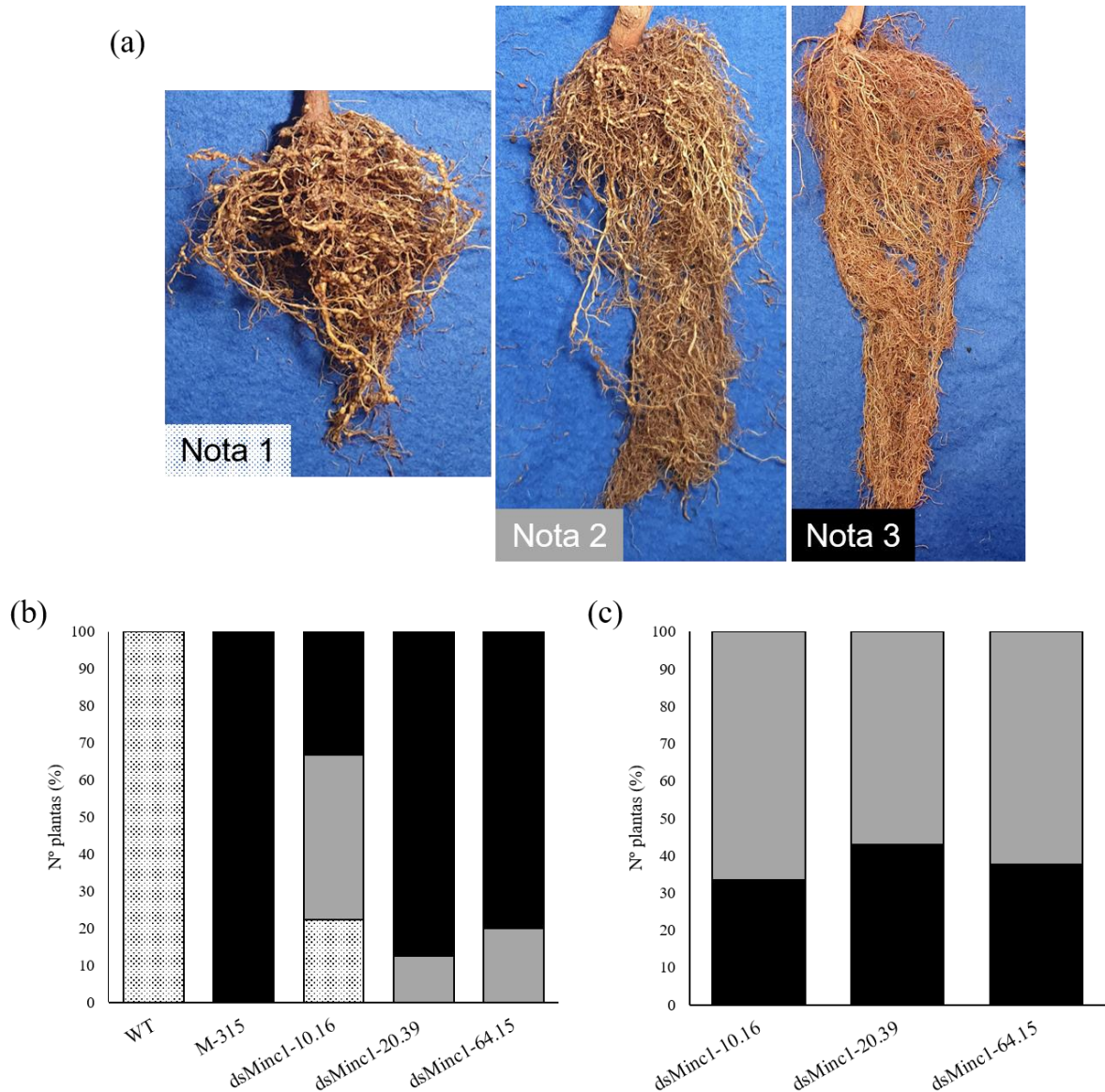
5.2 A PRESENÇA DE dsRNAs PIRAMIDADOS NAS GERAÇÕES T₂ E T₃ DO ALGODÃO REDUZEM A REPRODUÇÃO DE *M. incognita*

5.2.1 Avaliação das progênies T₂

Dez progênies T₂, oriundas da geração T₁ (*dsMinc1*-10.16, *dsMinc1*-20.39 e *dsMinc1*-64.15), representando três eventos de transformação, foram desafiadas contra *M. incognita* e comparadas com os controles de suscetibilidade (WT) e de resistência (M-315) para a avaliação da reação nas raízes provocadas pelos fitonematoides. Observou-se que na média geral, 66,7% das plantas apresentaram redução no número de galhas igual ou superior a 70% (nota 3) em comparação às plantas WT. Os eventos GM *dsMinc1*-10.16, *dsMinc1*-20.39 e *dsMinc1*-64.15 obtiveram 33,3%, 87,5% e 80% de plantas resistentes, respectivamente (Figura 1.4a). Esses resultados sugerem a estabilidade do transgene no avanço das gerações do algodão.

Após a avaliação do bioensaio e a recuperação das plantas T₂ que obtiveram nota 3, foi realizada a PCR para confirmar a presença do cassete gênico *dsMinc1*. Na média geral, 38,9% das plantas avaliadas apresentaram resultado positivo para a amplificação do gene *bar* por PCR (377 pb). Os eventos GM *dsMinc1*-10.16, *dsMinc1*-20.39 e *dsMinc1*-64.15 obtiveram 33,3%, 42,9% e 37,5% de plantas positivas para PCR, respectivamente (Figura 1.4b). As progênies que obtiveram nota 3, mas que não foram confirmadas por PCR, foram descartadas, e isso demonstra a segregação do transgene dentro da população.

Figura 1.4 – Caracterização de plantas de algodão da geração T₂ transformadas com *dsMinc1* e desafiados contra *M. incognita*. Cada barra representa um total de 10 plantas avaliadas. (a) padrão de galhas observado nas raízes de plantas de algodão e suas respectivas notas. (b) Porcentagem de plantas suscetíveis (nota 1, pontilhado), moderadamente suscetíveis (nota 2, cinza escuro) e resistentes (nota 3, preto) de acordo com o índice de galhas. As progênes T₂, oriundas de três eventos de transformação, foram avaliadas quanto ao índice de galhas em relação aos controles de suscetibilidade (WT – BRS 372) e de resistência (M-315). (c) Porcentagem de plantas selecionadas por amplificação do gene *bar* por PCR (377 pb) das progênes T₂ resistentes (nota 3) no bioensaio contra *M. incognita*; PCR positivo para plantas (preto); plantas PCR negativo (cinza escuro).

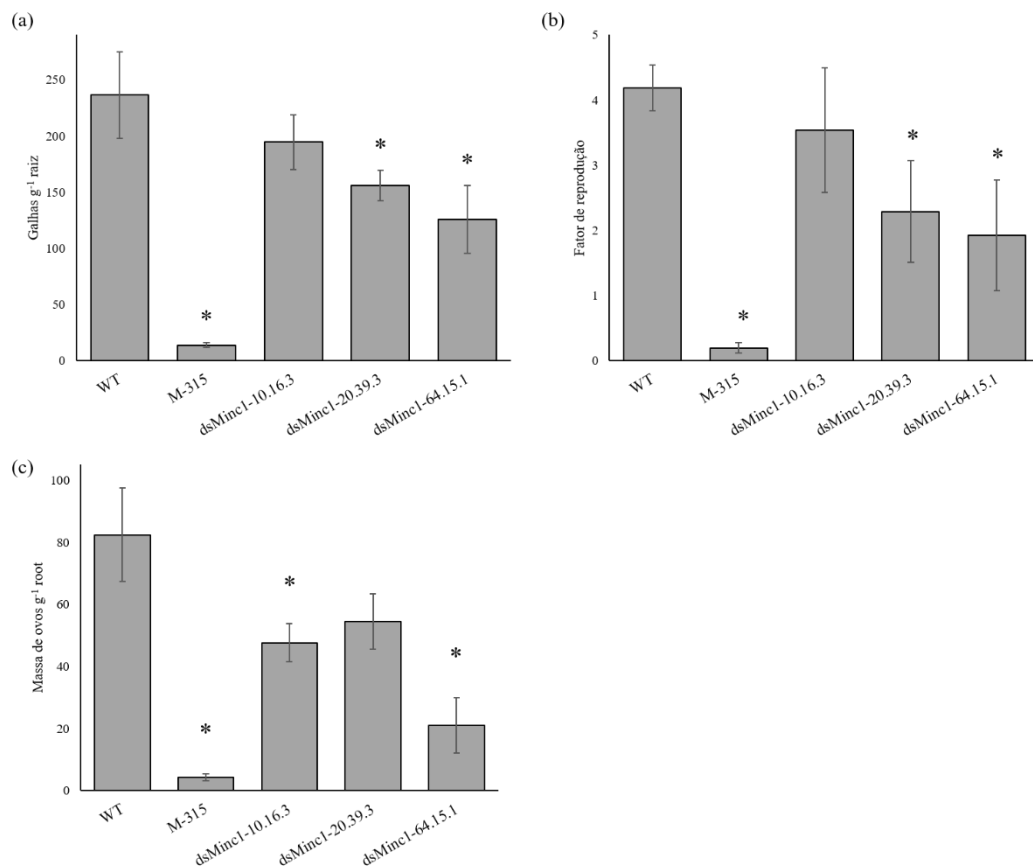


5.2.2 Avaliação das progênes T₃

Após 120 dias de infecção por *M. incognita*, o número médio de galhas de fitonematoides formadas no sistema radicular diferiu significativamente ($p < 0,05$) em alguns eventos GM (*dsMinc1-20.39.3* e *dsMinc1-64.15.1*) em relação ao controle WT. As plantas WT apresentaram uma média de 237 galhas g⁻¹ de raiz, enquanto os eventos de transformação de

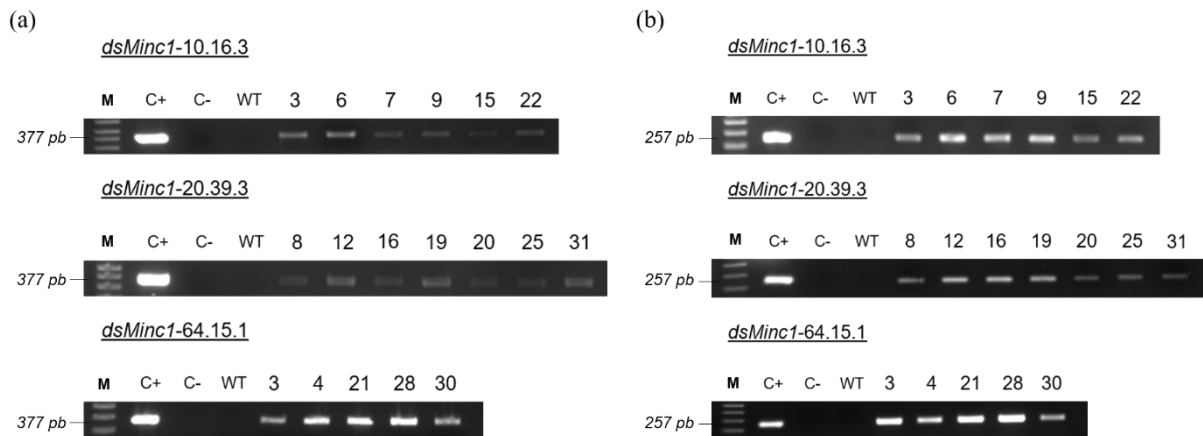
algodão GM *dsMinc1*-20.39.3 e *dsMinc1*-64.15.1 mostraram uma redução significativa de 34,1 e 46,9%, respectivamente (Figura 1.5a). Por outro lado, a redução do número de galhas g^{-1} raiz na linhagem *dsMinc1*-10.16.3 foi de apenas 17,7%, não diferindo significativamente em relação ao controle. As plantas WT tiveram um FR dos fitonematóides consideravelmente alto (média do FR = 4,2), sendo significativamente ($p < 0,05$) maior quando comparado com os eventos de transformação GM *dsMinc1*-20.39.3 (média do FR = 2,3, 45,3% menor que a planta WT) e *dsMinc1*-64.15.1 (média = 1,9, 54% menor que a planta WT) (Figura 1.5b). O evento *dsMinc1*-10.16.3 apresentou uma média do FR semelhante à WT (média do FR = 3,5). As massas de ovos foram coradas com Floxina B e contabilizadas. O número médio de massa de ovos g^{-1} de raiz de *M. incognita* é significativamente ($p < 0,05$) maior no algodão WT ($n^{\circ} = 82$) em comparação aos eventos de transformação GM *dsMinc1*-10.16.3 ($n^{\circ} = 48$) e *dsMinc1*-64.15.1 ($n^{\circ} = 21$) (Figura 1.5c). Houve uma redução de 33,9-74,5% do número de massa de ovos dos eventos GM comparadas à planta WT.

Figura 1.5 – Efeito das moléculas de dsRNAs do cassete de expressão *dsMinc1* no desenvolvimento e reprodução de *M. incognita* em plantas de algodão GM. (a) Número de galhas g^{-1} de raiz induzidas; (b) FR (fator de reprodução) e (c) o número de massas de ovos g^{-1} de raiz de *M. incognita* em diferentes linhagens T₃ (*dsMinc1*-10.16, *dsMinc1*-20.39 e *dsMinc1*-64.15), controle de suscetibilidade BRS 372 (WT) e de resistência (M-315) são mostrados aos 120 DAI. Barras indicam os erros padrão dos dados médios ($n = 3-7$) e os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste t de Student ($p < 0,05$), em comparação com plantas de controle não GM (WT).



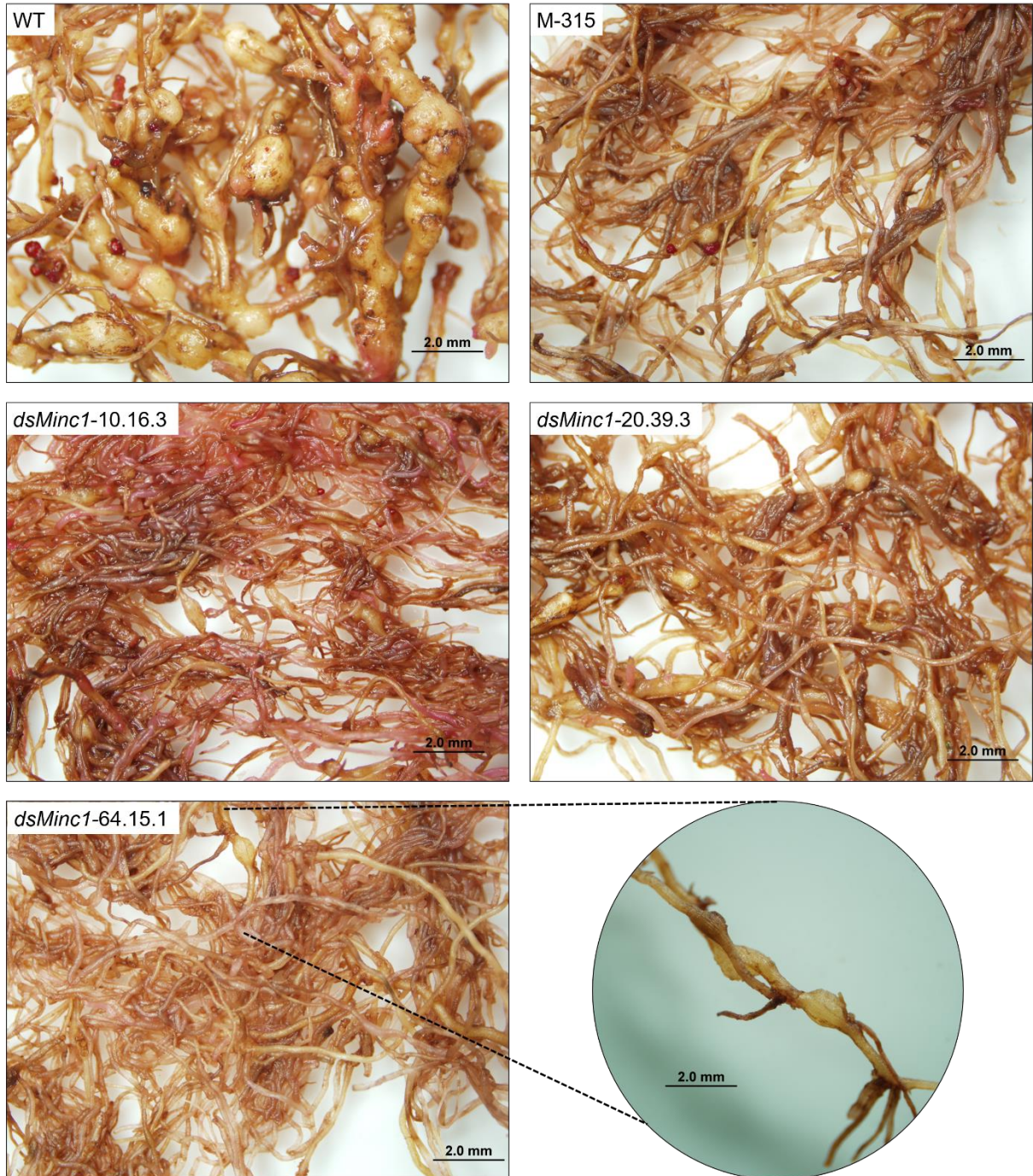
Após a caracterização fenotípica das plantas desafiadas com *M. incognita*, foi realizada a PCR das plantas selecionadas como resistentes (nota 3) para confirmar a presença do cassete gênico *dsMinc1* e posterior avanço de geração. Além da amplificação do gene de seleção *bar* (377 pb), foi realizada a caracterização molecular para a amplificação do promotor *uceS8.3* (257 pb) (Figura 1.6). As progênes classificadas inicialmente com a nota 3, porém não confirmadas por PCR, foram descartadas.

Figura 1.6 – Amplificação de regiões gênicas no cassete de expressão *dsMinc1* em algodão T₃. Gel de agarose 1% contendo amplificação do fragmento do gene de seleção *bar* de 377 pb (a) e do promotor *uceS8.3* de 257 pb (b). (WT): planta não transformada utilizada como controle negativo; (-): água usada como controle negativo da reação de PCR; (+): controle positivo – cassete de expressão *dsMinc1*; M: marcador em pares de bases (pb) (*Ladder 1kb plus* (Invitrogen®)).



A figura 1.7 mostra uma avaliação visual das raízes das plantas de algodão WT, GM e do genótipo de algodão resistente (M-315), revelando a diferença no padrão da reação provocada pelo fitonematoide em cada genótipo. O sistema radicular do algodão WT é caracterizado pela presença de galhas unificadas, grandes e múltiplas. Diferentemente, as galhas encontradas nas plantas de algodão GM geradas e do genótipo M-315, são simples, menores e isoladas. Estes dados corroboram com a avaliação do número de galhas identificadas em cada raiz analisada, conforme demonstrado na figura 1.5a.

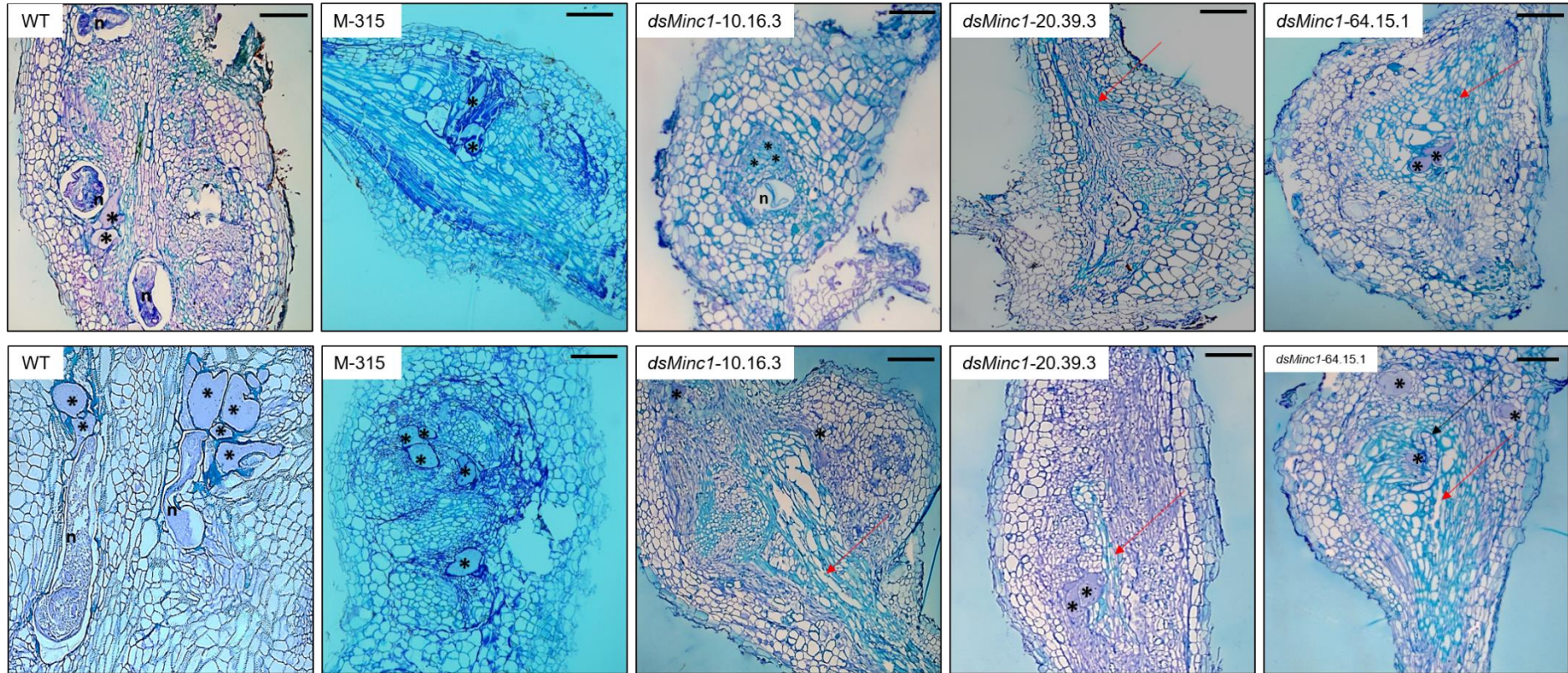
Figura 1.7 – Análise macroscópica de raízes de plantas de algodão mostrando que a intensidade de galhas provocadas por *M. incognita* foi comparativamente maior nas plantas controle do que nas progênies das plantas GM T₃, aos 120 DAI. As setas amarelas indicam a posição das galhas na raiz de cada planta avaliada. WT, algodão não transformado (BRS 372), M-315, genótipo de algodão utilizado como padrão de resistência.



5.3 RAÍZES DE PLANTAS DE ALGODÃO EXPRESSANDO MOLÉCULAS DE dsRNAs DO CASSETE DE EXPRESSÃO *dsMinc1* INDUZEM ALTERAÇÕES NAS CÉLULAS GIGANTES INDUZIDAS POR NFG

Para verificar a presença de diferenças na formação das células gigantes entre as plantas GM expressando *dsMinc1* e plantas controle, foi realizada uma análise morfológica das secções dos tecidos radiculares infectados com fitonematoides. A planta WT mostrou tipicamente múltiplos sítios de alimentação bem desenvolvidos e nematoides maduros em seu interior, assim como desorganização e assimetria celular e ruptura do córtex radicular causada pelo aumento da região do cilindro vascular. Todas as linhagens GM (*dsMinc1-10.16.3*, *dsMinc1-20.39.3* e *dsMinc1-64.15.1*) apresentaram galhas menos desenvolvidas, tornando as células gigantes, assim como os fitonematoides, menos visíveis, quando comparado com as plantas não transformadas. De forma semelhante ao genótipo de algodão resistente (M-315), cada galha das linhagens transgênicas apresentou menor número de sítios de alimentação, aparentemente bloqueados em seu desenvolvimento, e células gigantes menos expandidas em relação ao controle. As plantas de algodão GM apresentaram mais elementos de xilema em comparação com a WT. No evento de transformação *dsMinc1-10.16.3*, algumas células gigantes estavam malformadas, apresentando parede celular com coloração diferente, sugerindo tentativa de mitose (Figura 1.8).

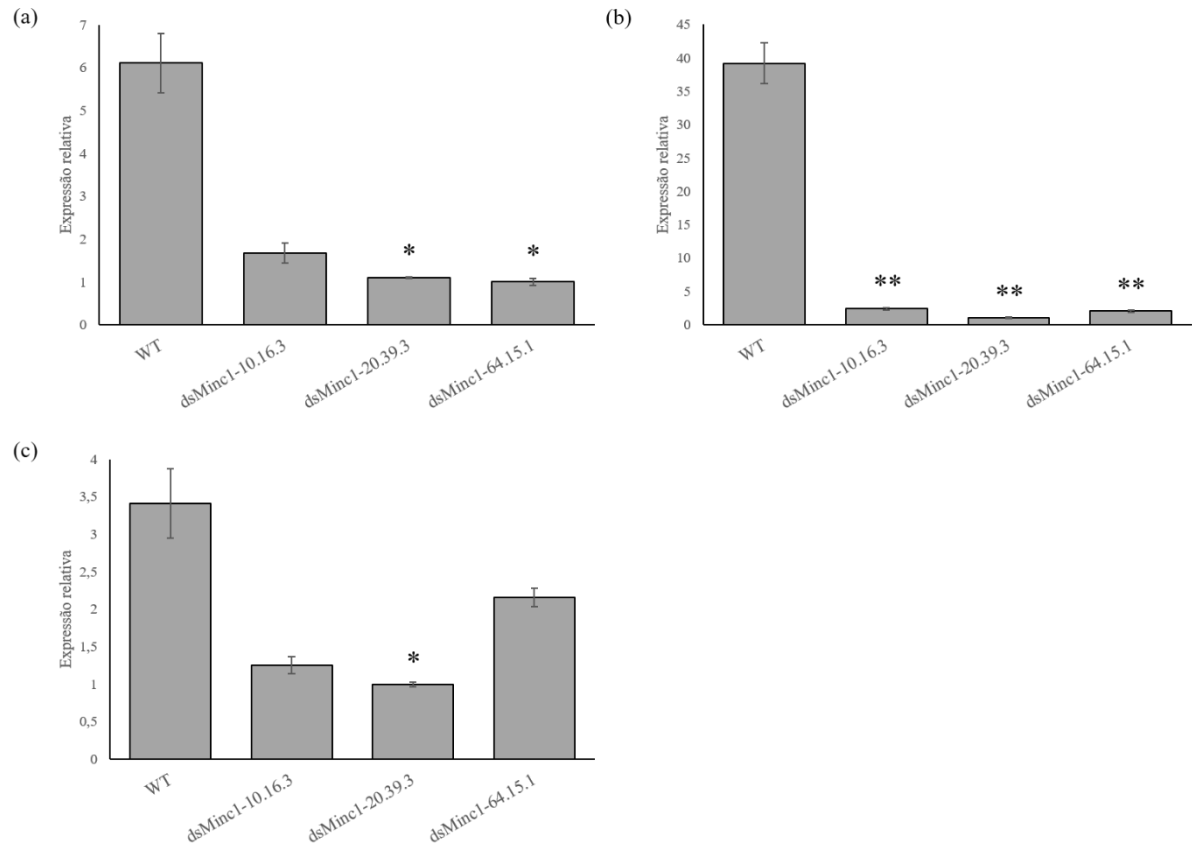
Figura 1.8 – Análise histológica de tecidos de galhas de linhagens de algodão WT (BRS 372) e GM em imagens de campo claro de seções longitudinais de galhas de algodão coradas com azul de toluidina. Controle WT (BRS 372); controle de resistência (M-315). (*) células gigantes e locais de alimentação; (n) fitonematoide. As setas vermelhas indicam elementos do xilema. As setas pretas indicam células gigantes malformadas apresentando parede celular como material manchado, sugerindo tentativa de mitose. Barras = 50 μ m.



5.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES PRESENTES NO *dsMinc1* EM FITONEMATOIDES EXTRAÍDOS DE RAÍZES DE PLANTAS DE ALGODÃO GM

Para analisar o potencial dos genes *Mi-cpl*, *Mi-icl* e *Mi-fs* em *M. incognita* provocados pela ingestão de dsRNAs e/ou siRNAs, provenientes do *dsMinc1* presentes nas plantas GM de diferentes linhagens T₃ (*dsMinc1-10.16.3.3*, *dsMinc1-10.16.3.7*, *dsMinc1-10.16.3.15*, *dsMinc1-20.39.3.12*, *dsMinc1-20.39.3.16*, *dsMinc1-20.39.3.20*, *dsMinc1-64.15.1.21* e *dsMinc1-64.15.1.28*), foi realizado RT-qPCR. Os resultados obtidos na avaliação do acúmulo de transcritos do gene *Mi-cpl* em fitonematoides, presentes em galhas de raízes de algodão, obtidos das plantas expressando *dsMinc1* mostrou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de 82 e 83,6% na expressão nas linhagens T₃ dos eventos de transformação *dsMinc1-20.39.3* e *dsMinc1-64.15.1*, respectivamente, em relação ao controle (Figura 1.9a, Figura S1a). A transcrição do gene ICL também foi drasticamente suprimida pelo dsRNA *Mi-icl* derivado de plantas de algodão GM *dsMinc1*, resultando em uma supressão significativa ($p < 0,01$) nas linhagens GM *dsMinc1-10.16.3* (94%), *dsMinc1-20.39.3* (97,4%) e *dsMinc1-64.15.1* (94,9%), em relação ao controle (Figura 1.9b, Figura S1b). Em relação à transcrição do gene envolvido no processamento de RNA de fitonematoides, fator de *splicing* (*Mi-fs*), houve redução significativa ($p < 0,05$) apenas na linhagem *dsMinc1-20.39.3* (70,7%), em relação ao controle. Os eventos de transformação *dsMinc1-10.16.3* e *dsMinc1-64.15.1* apresentaram redução de 63,2 e 36,8%, respectivamente, porém não significativa em comparação com a WT (Figura 1.9c).

Figura 1.9 – Caracterização média dos níveis relativos de acúmulo de transcritos por RT-qPCR dos genes presentes no *dsMinc1* de galhas em plantas de algodão infectados por *M. incognita*, coletados de plantas de algodão GM T₃ (*dsMinc1*-10.16.3, *dsMinc1*-20.39.3 e *dsMinc1*-64.15.1) e WT. (a) Expressão relativa do gene *Mi-cpl*; (b) expressão relativa do gene *Mi-icl*; (c) expressão relativa do gene *Mi-fs*. As barras indicam os erros padrão dos dados médios (n = 3). Diferenças significativas foram avaliadas pelo teste de Turkey, no qual a expressão gênica de *Mi-cpl*, *Mi-icl* e *Mi-fs* em galhas de diferentes eventos de transformação de plantas de algodão foram comparadas às plantas controle WT (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).



6 DISCUSSÃO

Uma das principais vantagens em utilizar a tecnologia do RNAi, utilizando dsRNAs específico para controlar pragas agrícolas, como fitonematoides, é a alta especificidade ao gene alvo, sendo benéfico para o meio ambiente e diminuindo efeito em organismos não alvos (ROSSO; JONES; ABAD, 2009; DUTTA; BANAKAR; RAO, 2015). Análises do transcriptoma de fitonematoides pode ser realizada para identificar genes que são diferencialmente expressos no seu ciclo de vida e que podem estar envolvidos no parasitismo das plantas. Com isso, a partir de informações do transcriptoma, a metodologia de RNAi representa um avanço no melhoramento genético de plantas, conferindo resistência a fitonematoides (DANCHIN *et al.*, 2013). Dependendo do gene alvo, a regulação negativa da transcrição pode produzir efeitos letais nesses fitoparasitas e reduzir a infecção ou multiplicação

nas plantas (FAIRBAIRN *et al.*, 2007). Desse modo, identificar genes com potencial valor para controlar fitonematoides, por meio do silenciamento de mRNA, é importante para a agricultura sustentável.

Nos estudos iniciais, as moléculas de dsRNAs foram, na maioria dos experimentos, administradas por ingestão para validar potenciais moléculas no controle de fitonematoides (URWIN; LILLEY; ATKINSON, 2002). Essa metodologia, conhecida como *soaking*, realizada por imersão com dsRNAs sintetizados *in vitro* para fornecer moléculas de dsRNAs específicas aos fitonematoides, possui potencial para o controle do patógeno, visto que o dsRNA regula especificamente a expressão de genes alvo por meio do silenciamento da expressão destes genes. No entanto, a eficiência desse método pode não gerar um silenciamento suficiente devido à instabilidade do dsRNA quando exposto a diversos ambientes (LI *et al.*, 2017). Como alternativa para o controle, a alimentação dos fitonematoides com plantas GM, que expressam moléculas de dsRNAs específica para o organismo alvo foi desenvolvida como um método eficaz para fornecer moléculas de dsRNAs e controlar esses relevantes fitoparasitas na agricultura. Assim, as plantas GM fornecem aos fitonematoides um estresse contínuo, por possuírem um nível de expressão de dsRNAs relativamente estável. O uso de RNAi *in planta* contra fitonematoides foi descrito pela primeira vez por Huang *et al.* (2006), Steeves *et al.* (2006) e Yadav, Veluthambi e Subramaniam (2006). No entanto, não há estudos utilizando a piramidação de genes alvo a fitonematoides, como o *M. incognita*, em plantas de interesse comercial. Neste estudo, foram selecionados três genes, caracterizados por nosso grupo de pesquisa, incluindo o gene que codifica para uma cisteína protease (*Mi-cpl*), envolvida no processo de digestão do fitonematoide (SOUZA JÚNIOR *et al.*, 2013), do gene para isocitrato liase (*Mi-icl*), enzima presente na via do glioxilato (LOURENÇO-TESSUTTI *et al.*, 2015) e do gene envolvido no processamento de RNA de fitonematoides, fator de *splicing* (*Mi-fs*) (GROSSI-DE-SÁ *et al.*, 2014; FRAGOSO *et al.*, 2020 submetido), de *M. incognita* para a construção do vetor de dsRNAs piramidado (*Mi-cpl* (201 pb), *Mi-icl* (234 pb) e *Mi-fs* (200 pb)), que foi inserido em plantas de *G. hirsutum* por biobalística.

Em nossos dados, os eventos de transformação de algodão GM *dsMinc1-20.39.3* e *dsMinc1-64.15.1* apresentaram uma redução significativa no número de galhas g⁻¹ de raiz de 34,1 e 46,9%, respectivamente (figura 1.5a). Redução semelhante (45%) do número de galhas foi observada em plantas de tabaco expressando dsRNA para o gene *Mi-cpl* (SOUZA JÚNIOR *et al.*, 2013). Plantas de tabaco, expressando dsRNAs do gene *Mi-icl*, não apresentaram redução no número de galhas em comparação a WT (LOURENÇO-TESSUTTI *et al.*, 2015). Por outro lado, avaliando o silenciamento do mesmo gene alvo (*Mi-icl*), Yadav, Veluthambi e

Subramaniam (2006) observaram redução de 92% no número de galhas em raízes de tabaco GM em comparação a WT. Outros estudos também mostraram redução no número de galhas em plantas expressando dsRNAs de genes alvo de fitonematoides, semelhante aos dados aqui descritos (32-50,8%) (Tabela 1) (DANCHIN *et al.*, 2013; NIU *et al.*, 2016; KAKRANA *et al.*, 2017; CHAUDHARY *et al.*, 2019; CHUKWURAH *et al.*, 2019). De acordo com Dong *et al.* (2007) e Coyne e Ross (2014), a redução no número de galhas reflete a capacidade de uma planta em diminuir ou superar o ataque de fitonematoides, como *M. incognita*. Sendo assim, os três potenciais genes utilizados na construção *dsMinc1* podem possuir papel importante no parasitismo de *M. incognita*, por apresentar redução no número de galhas. Foi observado que todos os eventos de transformação apresentaram um pequeno número de galhas nas raízes (Figura 1.5 e 1.7); entretanto, a forma das galhas presentes em raízes de algodão expressando o *dsMinc1* são simples, menores e isoladas, além de frequência de galhas bem menor. Chaudhary *et al.* (2019) também relataram uma menor frequência de galhas nas plantas expressando dsRNA para o gene *Mi-msp-1* em comparação com as plantas WT, indicando que o silenciamento de algum dos genes alvo desfavorece a infecção do fitonematoide e, portanto, o silenciamento foi eficiente.

De acordo com Coyne e Ross (2014), o número de massa de ovos fornece um nível mais alto de indicação de resistência. Sendo esse, um parâmetro relacionado à reprodução útil para avaliar o número de fitonematoides capazes de atingir a maturidade em uma determinada planta. Comparadas às plantas controle WT, as plantas de algodão GM *dsMinc1*-10.16.3 e *dsMinc1*-64.15.1 apresentaram redução de 42% e 74,5%, respectivamente, no número médio de massa de ovos g⁻¹ de raiz. Souza Júnior *et al.* (2013) obtiveram resultado semelhante no silenciamento do gene *Mi-cpl*, também presente na construção aqui apresentada, em plantas de tabaco, no qual observaram redução de 32% no número de massa de ovos. Esses dados são indicativos que os fitonematoides fêmeas jovens podem ter tido o desenvolvimento atrasado e, assim, não alcançaram a maturidade. Como as fêmeas adultas NFG produzem sua progênie em uma única massa de ovos, o número de massa de ovos implica o número semelhante de fêmeas reprodutoras. Portanto, o silenciamento de genes induzido pelo hospedeiro (SGIH) do *dsMinc1* resultou na redução da formação de galhas nas raízes (Figura 1.7), presumivelmente porque atenuou o desenvolvimento de NFG J2 para as fêmeas em eventos de transformação GM. Pode-se esperar um desenvolvimento atrasado de fitonematoides com a degradação da transcrição de importantes genes de manutenção, como os genes alvo aqui utilizados. A produção reduzida de massa de ovos é uma observação consistente em trabalhos onde importantes genes efetores

relacionados ao parasitismo (DUTTA *et al.*, 2015) e genes essenciais (PAPOLU *et al.*, 2013) em fitonematoides que foram silenciados.

Em uma interação do tipo compatível, a relação entre o número de massa de ovos e galhas pode representar valores maiores do que 1 (mais de uma massa de ovos por galha desenvolvida) (ARGUEL *et al.*, 2012). Portanto, essa relação pode apresentar resultados distintos quando há o silenciamento de genes importantes na formação de alguma dessas estruturas (galhas e massas de ovos). Isso foi observado em nosso trabalho, no qual a planta de algodão GM *dsMinc1*-10.16.3 não apresentou redução significativa no número de galhas g⁻¹ de raiz em relação a WT, porém apresentou redução significativa no número de massas de ovos g⁻¹ de raiz quando comparada a WT. Isso indica que o fitonematoide conseguiu infectar a raiz da planta dessa linhagem, porém não conseguiu completar o ciclo reprodutivo (GUIMARAES *et al.*, 2017), provavelmente provocada pelo silenciamento de algum dos genes alvo presentes no *dsMinc1*.

A contagem de ovos é útil no estabelecimento do fator de reprodução (FR), que indica a aptidão reprodutiva dos fitonematoides e o sucesso parasitário em uma planta hospedeira. O FR calculado de *M. incognita* foi significativamente reduzido nas linhagens GM *dsMinc1*-20.39.3 e *dsMinc1*-64.15.1, que apresentaram redução de 45,3 e 54%, respectivamente (Figura 1.5b) em comparação ao WT. Souza júnior *et al.* (2013), Lourenço-Tessutti *et al.* (2015) e Fragoso *et al.* (submetido) observaram redução de 42, 65 e 92% no número de ovos em plantas de tabaco expressando dsRNA dos genes *Mi-cpl*, *Mi-icl* e *Mi-fs*, respectivamente. Essa capacidade reprodutiva reduzida também foi relatada por Chaudhary *et al.* (2019) em fitonematoides que se alimentam de *S. melongena* expressando dsRNA para o gene efetor *Mi-msp-1* de *M. incognita*, embora em maior grau, reduzido em 62,4-70,6% em linhagens GM em comparação com as plantas WT. Plantas de tomate GM expressando dsRNAs do gene *MiPA* reduziram significativamente (28,3-37,2%) a reprodução de *M. incognita*, em comparação às plantas WT (CHUKWURAH *et al.*, 2019). A supressão na reprodução de fitonematoides é considerada um atributo da resistência das plantas a esses parasitas (BOERMA; HUSSEY, 1992). Como os NFGs completam três ciclos em uma safra anual, uma redução de 60% na multiplicação de NFGs por ciclo é suficiente para minimizar a população de fitonematoides abaixo do limiar econômico (FULLER; LILLEY; URWIN, 2008; SHIVAKUMARA *et al.*, 2017).

Neste estudo, o nível da expressão de *Mi-cpl*, *Mi-icl* e *Mi-fs* em *M. incognita* alimentados com plantas GM de algodão foi reduzido em 72-83,6, 94-97,4 e 36,8-70,7%, respectivamente, em comparação com o grupo controle. A regulação negativa dos transcritos

dos genes alvo em fitoparasitas normalmente indica a eficácia do RNAi induzido pelo hospedeiro (PAPOLU *et al.*, 2013). Nossos resultados de RT-qPCR, portanto, fornecem evidências de silenciamento dos genes *Mi-cpl*, *Mi-icl* e *Mi-fs* em *M. incognita* e corrobora com a multiplicação reduzida de fitonematoides observada nas linhagens de algodão GM durante a avaliação fenotípica. Apesar da elevada redução, principalmente dos genes *Mi-cpl* e *Mi-icl*, o RNAi mediado pelo dsRNA do hospedeiro não eliminou completamente a expressão dos produtos gênicos, ou seja, os genes alvo foram silenciados, mas não eliminados. Esses dados são consistentes com os resultados observados por meio do silenciamento desses genes, individualmente, mediado por RNAi (SOUZA JÚNIOR *et al.*, 2013; LOURENÇO-TESSUTTI *et al.*, 2015; FRAGOSO *et al.*, 2020, submetido). Souza júnior *et al.* (2013) observaram uma redução de 50% nos níveis de transcrito de *Mi-cpl* em ovos de *M. incognita* que se alimentaram de plantas de tabaco expressando o dsRNA desse gene. Além disso, também foi observado que ao silenciar os genes de proteases alvo, a expressão das proteases não alvo foi aumentada, sugerindo a existência de uma resposta natural dos organismos para compensar a falta de algumas proteases (regulação positiva).

Lourenço-Tessutti *et al.* (2015) não conseguiram realizar a análise do silenciamento gênico de *Mi-icl* em *M. incognita*, visto que a quantidade de ovos obtidos foi muito reduzida, impossibilitando a extração de RNA e a análise de RT-qPCR. No presente estudo, a redução da expressão do gene *Mi-icl* foi altamente significativa em todas as linhagens de algodão GM (Figura 1.9c), indicando a alta importância dessa enzima para o fitonematoide. A enzima ICL está presente no ciclo do glioxilato (mecanismos de tolerância ao estresse), uma derivação do ciclo do ácido cítrico (ROTHSTEIN; MAYOH, 1964 COLONNA; MCFADDEN, 1975; PATEL; MCFADDEN, 1977). Sabe-se que os nematoides utilizam o ciclo do glioxilato para gerar carboidratos a partir da β -oxidação dos ácidos graxos (BARRETT; WRIGHT, 1998), e assim, supõe-se que os ppJ2 do gênero *Meloidogyne* utilizam essa via para produção de energia quando estão fora da planta hospedeira (OPPERMAN *et al.*, 2008).

Os resultados de expressão relativa para o gene *Mi-fs*, apresentou redução significativa apenas para a planta de algodão GM *dsMinc1-20.39.3*. Em *G. max* expressando dsRNA de um gene relacionado ao fator de *splicing* (*HgPrp-17*), de *H. glycines* foi relatada uma redução de 5,5 vezes dos transcritos em relação ao controle (TIAN *et al.*, 2019). Yadav, Veluthambi e Subramaniam (2006) não conseguiram verificar os níveis de expressão do gene *Mi-fs* a partir dos fitonematoides isolados de plantas GM que expressam o dsRNA desse gene, o que pode ser explicado, provavelmente, devido à ausência, por silenciamento, desses mRNAs nos fitonematoides. Nossos resultados podem se fundamentar no fato da existência de vias

metabólicas de energia que compensam os genes alvo do RNAi (LI *et al.*, 2017). Além disso, menos dsRNA/siRNA expressos pela planta resulta em um silenciamento menos eficaz (DALZELL *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2017), o que também poderia explicar o ocorrido para esse gene nas plantas GM. Enzimas do tipo DICER em plantas podem ter diminuído os níveis de expressão do dsRNA produzidos nas linhagens de algodão GM *dsMinc1*-10.16.3 e *dsMinc1*-64.15.1. Em insetos, sabe-se que quanto maiores as concentrações de dsRNA intacto produzidas em plantas GM, maiores os efeitos inibitórios do RNAi (BOUCHÉ *et al.*, 2006; GORDON; WATERHOUSE, 2007; LIU *et al.*, 2015), porém esse fato não é relatado em nematoides. Estudos anteriores mostraram que os NFG são capazes de ingerir moléculas de 28 a 140 kDa, incluindo a proteína fluorescente verde e as proteínas cristalinas formadas pela bactéria *Bacillus thuringiensis* (URWIN *et al.*, 1997a; LI *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2012). Se o dsRNA for ingerido de forma intacta, prevê-se que o dsRNA passe para as células intestinais, seja processado pelo complexo DICER do fitonematoide e siga a via RNAi normal. Os siRNAs processados pela maquinaria do RNAi da planta são apresentados ao tubo de alimentação. Porém, após o processamento do dsRNA na célula da planta, posterior a ação da DICER, os siRNAs são imediatamente incorporados ao complexo RISC, dando origem à outra conformação da molécula. Esse complexo proteína-ácido nucleico seria muito grande para atravessar até os maiores poros do tubo de alimentação do fitonematoide (LILLEY *et al.*, 2007), o que pode reduzir a eficiência do silenciamento. Entretanto, Huang *et al.* (2006) demonstraram que a captação pelo fitonematoide de dsRNA intacto ou de siRNAs processados pode ocorrer e é suficiente para induzir um fenótipo de RNAi. No presente estudo, nenhuma evidência foi apresentada para saber se os NFG ingeriram dsRNAs diretamente e os processaram em siRNAs (via DICER), ou se ingeriram diretamente os siRNAs processados pela planta. Portanto, não é possível deduzir a rota pela qual o silenciamento ocorreu. Existe a possibilidade de um ou ambos os eventos ocorrerem, pois os NFG podem ingerir, de maneira geral, grandes biomoléculas através dos poros do estilete (LI *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2012).

O tamanho e número reduzido dos sítios de alimentação do fitonematoide em galhas de raízes de algodão expressando o *dsMinc1* demonstram o efeito do silenciamento dos genes alvo em *M. incognita* (Figura 1.9). Esse efeito está diretamente relacionado a redução da capacidade do fitonematoide em estabelecer seu sítio de alimentação (GHEYSEN; MITCHUM, 2011). Além disso, a ausência de fitonematoides nas galhas das plantas GM demonstram a incapacidade desses organismos em sobreviver. A presença de mais elementos do xilema, em comparação com a WT, nas linhagens GM demonstram menor interferência do fitonematoide no desenvolvimento radicular. Em cultivares suscetíveis, os sítios de alimentação ocupam o

espaço do floema no cilindro vascular, provocando o deslocamento dos elementos de vaso e, por conseguinte, inibindo o transporte de metabólitos (BECKER; FERRAZ; SILVA, 1999). O mesmo fenótipo foi observado por Cabral *et al.* (2020) em plantas de *Arabidopsis* na ausência do gene *WEE1*, onde a infecção do NFG induziu as células a um estado mitótico resiliente. Lourenço-Tessutti *et al.* (2015), ao compararem o sítio de alimentação de *M. incognita* em raízes de tabaco expressando dsRNA do gene *Mi-icl* com as plantas WT, mostraram que as células gigantes não diferiram em tamanho ou morfologia das galhas. O fato de as células gigantes serem malformadas na linhagem *dsMinc1-10.16.3*, sugere tentativa de mitose completa, o que normalmente é impedido pelo fitonematoide em uma relação parasítica completa (GRUNDLER; SCHNIBBE; WYSS, 1991; DAVIS *et al.*, 2000, 2008; WILLIAMSON; GLEASON, 2003; KYNDT; FERNANDEZ; GHEYSEN, 2014; MEDINA *et al.*, 2017).

Com a redução do número de galhas g^{-1} de raiz, massa de ovos g^{-1} de raiz, FR e na expressão relativa dos genes alvo em *M. incognita*, supõe-se que o efeito do RNAi foi perpetuado através dos estádios de desenvolvimento dos nematoides até a maturidade e, especulativamente, uma prole deficiente de *M. incognita* com dsRNA/siRNA do *dsMinc1* seria produzida. Embora não tenhamos realizados experimentos de herança dos fitonematoides que infectaram as plantas GM, a natureza herdável do RNAi é bem estudada em *C. elegans* (GRISHOK; TABARA; MELLO, 2000), *M. javanica* (GLEASON; LIU; WILLIAMSON, 2008), *M. incognita* (SOUZA JÚNIOR *et al.*, 2013) e *M. chitwoodi* (DINH *et al.*, 2014a). Dinh *et al.* (2014b) comprovaram que o efeito RNAi do gene *Mc16D10L* do fitonematoide é sistêmico e que prolifera após a ingestão inicial de dsRNA/siRNA derivados das plantas, a partir do esôfago, espalhando-se por todo o corpo da fêmea, incluindo as gônadas e os ovos em desenvolvimento, transmitindo, assim, o efeito do RNAi para a prole.

As cultivares de algodão são alotetraploides ($2n=2x=52$), o que torna os procedimentos de genética clássica complicados e longos, principalmente se o alto nível de heterozigose relacionado à herança alotetrassômica for considerado (WRIGHT; NIU; NGUYEN, 2009). Devido à recente evolução do algodão alotetraploide, combinada com a seleção intensiva de algodão cultivado, houve a redução da diversidade genética do algodão. Isso dificulta os esforços de melhoramento tradicional na obtenção de características agrônômicas e limita a aplicação de ferramentas genéticas moleculares para a melhoria do germoplasma de algodão (AULD *et al.*, 2009). Características introgressivas, como os genes de resistência a fitonematoides, compõem estratégias de reprodução já desafiadoras e precisam superar complicações adicionais, como barreiras de incompatibilidade pré e pós-zigóticas (HERMSEN,

1994; KONAN *et al.*, 2009). Dados os desafios associados ao melhoramento clássico, as estratégias transgênicas descritas aqui representam uma alternativa atraente para a criação de cultivares de algodão resistentes a *M. incognita*. Uma das vantagens de desenvolver plantas transgênicas com resistência mediada por RNAi contra fitonematoides é que, em princípio, nenhuma proteína estranha é expressa na planta, tornando o produto final potencialmente mais desejável do que as culturas transgênicas que expressam peptídeos ou proteínas nematicidas, como cistatinas ou antagonistas dos neurotransmissores (ATKINSON; LILLEY; URWIN, 2012; ELLING; JONES, 2014). Além disso, as plantas GM expressando dsRNAs garantem a entrega contínua de moléculas de dsRNA/siRNA para captação pelos fitonematoides (CHAUDHARY *et al.*, 2019). Sendo assim, estratégias duráveis para controlar a virulência de fitonematoides dependem do silenciamento de diferentes genes alvo de fitonematoides bem escolhidos, pertencendo preferencialmente a diferentes classes de genes e expressos coordenadamente em uma única planta hospedeira (CHARLTON *et al.*, 2010), como descrito nesse estudo.

7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A transformação genética do algodoeiro com o cassete de expressão contendo sequências piramidadas de dsRNA dos três genes essenciais (*Mi-cpl*, *Mi-icl* e *Mi-fs*) de *M. incognita*, reguladas pelo promotor *uceS8.3*, foi eficiente, tendo em vista a taxa de transformação obtida e o baixo número de cópias do transgene constatado nas plantas T₀. Os resultados aqui apresentados reforçam a ideia de que esses genes possuem papel fundamental no metabolismo, desenvolvimento e reprodução do fitonematoide. Uma vez que, foi verificado que a interferência na expressão desses genes provocou significativa redução no sucesso reprodutivo do fitonematoide (redução de galhas g⁻¹ de raiz, massa de ovos g⁻¹ de raiz e FR). Os dados gerados sugerem que moléculas de dsRNAs/siRNAs correspondentes aos genes presentes no *dsMinc1* foram ingeridos por *M. incognita* durante o processo parasitário. Assim, foram identificadas três progênies T₃, oriundas de três eventos de transformação independentes (*dsMinc1-10.16.3*, *dsMinc1-20.39.3* e *dsMinc1-64.15.1*), com grande potencial para controle deste fitonematoide.

Outra informação relevante é que esse é o primeiro relato sobre silenciamento gênico *in planta* de três genes piramidados em plantas de algodão. Assim, nas próximas etapas será possível fazer a hibridização dessas plantas com outras cultivares de algodão, contendo outras características de interesse, como a tolerância a fitonematoides, para aumentar o nível de

resistência. Pretende-se ainda, realizar novos bioensaios com as gerações transgênicas T₄ para avaliar a estabilidade da resistência dessas progênies e avaliações a campo. Em resumo, os experimentos descritos aqui, demonstram que o silenciamento dos genes *Mi-cpl*, *Mi-icl* e *Mi-fs* levam à resistência a *M. incognita* não apenas em plantas modelo, como demonstrado em estudos anteriores, mas também em plantas algodão de GM, ampliando, assim, novas estratégias de melhoramento molecular para resistência a fitonematoides.

Portanto, os dados obtidos neste estudo, juntamente com outros estudos que utilizam a tecnologia RNAi para avaliar o silenciamento de genes relevantes para *M. incognita*, poderão contribuir a melhor compreensão da função de genes importantes para a interação fitonematoide-planta. Os dados aqui gerados confirmaram a importância do uso de genes piramidados para se obter plantas que sejam tolerantes/resistentes a fitonematoides. Esses resultados poderão, num futuro próximo, contribuir para maior competitividade do agronegócio brasileiro e para o meio ambiente, evitando o uso de controles químicos na cotonicultura e, conseqüentemente, praticando uma agricultura ambientalmente sustentável.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2 – VALIDAÇÃO DE POTENCIAIS MOLÉCULAS EFETORAS NO CONTROLE DE *M. incognita* EM PLANTA MODELO

RESUMO

O silenciamento de genes induzido pelo hospedeiro (SGIH), baseado no uso da tecnologia RNAi, vem emergindo como uma nova ferramenta, eficiente e específica de um alvo para combater a infecção por fitonematoides em plantas de importância econômica. Genes efetores, expressos nas células subventrais da glândula esofágica de *M. incognita*, desempenham um papel importante no processo parasitário e representam uma estratégia valiosa para investigar a contribuição de efetores individuais para a virulência do patógeno durante a infecção. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi compreender o papel biológico dos potenciais efetores *Minc3s01206g21700*, *Minc3s00292g09561*, *Minc3s00280g09294*, *Minc3s01217g21793* e *Minc3s01635g25253*, por meio da expressão de dsRNAs para os referidos genes em plantas de tabaco e avaliar o efeito do silenciamento gênico na reprodução dos fitonematoides. Desta forma, fragmentos gênicos foram isolados e inseridos em um vetor binário, sob o controle do promotor *uceS8.3*, para expressão dos dsRNAs *in planta*. As plantas de *N. tabacum* (T₀) foram transformadas via *A. tumefaciens* e os eventos obtidos foram selecionados em meio contendo Canamicina (100 µg mL⁻¹) e confirmados por PCR. As plantas positivas foram autofecundadas para obtenção da geração T₁. Progênes T₁ transformadas com os genes *Minc3s01206g21700*, *Minc3s00292g09561*, *Minc3s00280g09294* e *Minc3s01217g21793* foram inoculadas com 1.000 J2 de *M. incognita* e avaliadas após 60 dias quanto ao desenvolvimento da doença. O número médio de galhas g⁻¹ de raiz, assim como o fator de reprodução (FR) não diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre as plantas de tabaco GM e as plantas de tabaco WT. No entanto, houve aumento significativo ($p < 0,05$) de FR nas plantas GM do evento 9294.4 em relação às progênes GM dos eventos 9561.11, 9294.2, 9294.3 e 21793.3. Devido ao pouco tempo, não foi possível validar a funcionalidade desses genes no parasitismo e/ou reprodução do fitonematoide na geração T₁. Para tanto, a continuidade dos experimentos será realizada para as gerações T₁ e T₂, que possui maior nível de homozigose, a fim de avaliar o controle de *M. incognita*.

Palavras-chave: RNAi. Nematoides formadores de galhas. dsRNAs. Silenciamento gênico.

8 INTRODUÇÃO

Dentre os principais fitonematoides, as formas sedentárias (*Meloidogyne* spp. - NFG, *Heterodera* spp. e *Globodera* spp.) e migratórias (*Radopholus* spp. e *Pratylenchus* spp.) são os que mais geram prejuízos na agricultura mundial (CHITWOOD, 2003; PERRY; MOENS, 2011). Os dados mais recentes encontrados, informam que somente as espécies de *Meloidogyne* spp. representam perdas globais de mais de US\$ 157 bilhões anualmente (ABAD *et al.*, 2008; SINGH; SINGH; SINGH, 2015), sendo considerada a espécie mais prejudicial à agricultura. Isso se deve, principalmente, ao seu hábito polífago, alta taxa reprodutiva e ampla distribuição

em todo o mundo, afetando as principais culturas agrícolas, como algodão (*Gossypium* spp.), soja (*G. max.*), tomate (*L. esculentum*) e arroz (*Oriza sativa*) (PAN *et al.*, 2019).

Os NFG são parasitas obrigatórios, altamente especializados em infectar seus hospedeiros. Para manter seu ciclo de vida sedentário, estes fitonematoides injetam moléculas efetoras de parasitismo dentro de células do hospedeiro, manipulando as defesas das plantas. Assim, essas proteínas alteram a taxa de divisão da célula da raiz, resultando na reprogramação celular, resultando em sítios de alimentação multinucleados e metabolicamente ativos, também conhecidos como células gigantes (DAVIS *et al.*, 2000, 2008; WILLIAMSON; GLEASON, 2003; GHEYSEN; MITCHUM, 2011). Nos estádios iniciais do parasitismo (penetração nos tecidos das plantas hospedeiras e estabelecimento do sítio de alimentação), as glândulas subventrais dos NFG são mais ativas em relação à glândula dorsal. Este fato pode ser comprovado também pelas alterações morfológicas nas células desta glândula, que se tornam menores e com menor número de grânulos secretores nos estádios posteriores de desenvolvimento do fitonematoide, durante o ciclo parasitário. Os genes envolvidos no parasitismo, expressos nas células da glândula subventral codificam, principalmente, as enzimas digestivas da parede celular utilizadas pelo fitonematoide durante a migração nas raízes, além de proteínas secretoras de função desconhecida e da corismato mutase. Após o início do parasitismo, a célula da glândula dorsal é estimulada a aumentar a síntese de proteínas secretoras para se tornar a glândula predominante nos estádios parasitários (HUSSEY; DAVIS; BAUM, 2002).

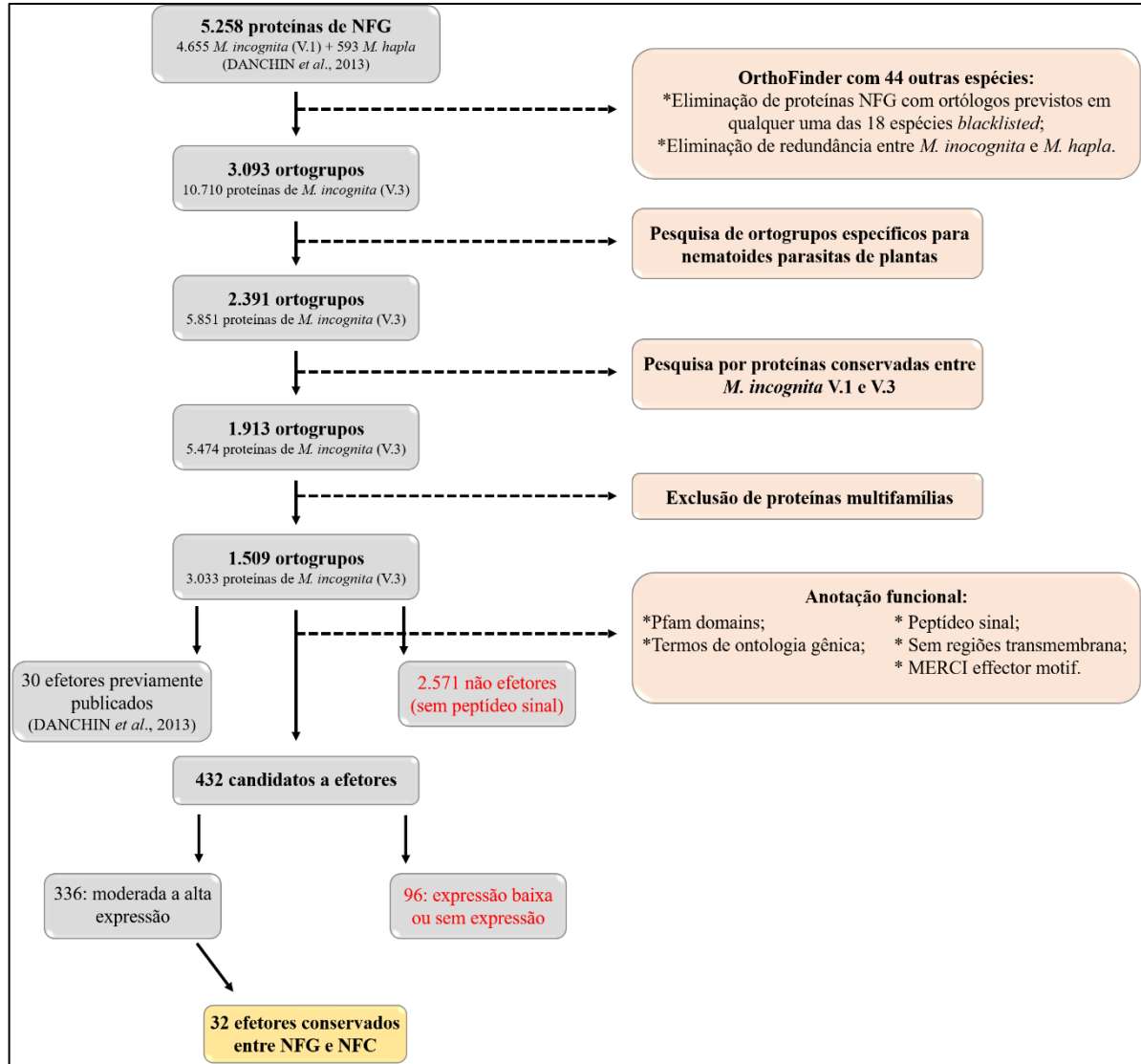
O controle desses fitonematoides, baseado em nematicidas químicos, tem demonstrado pouca eficácia, além de ser altamente prejudicial à saúde humana e ao meio ambiente (IBRAHIM *et al.*, 2014; NTALLI *et al.*, 2016). Considerando que a rotação de cultura é ineficaz para administrar NFG polífagos, o cenário da produção global de culturas ainda está ameaçado (RODERICK; URWIN; ATKINSON, 2018). Devido à pouca disponibilidade de genes de resistência utilizado no manejo tradicional de plantas, uma abordagem transgênica da resistência a fitonematoides aponta como uma alternativa necessária (RODERICK; URWIN; ATKINSON, 2018). Diversos institutos de pesquisas e empresas estão desenvolvendo diferentes métodos para o controle de NFG, utilizando modernas ferramentas biotecnológicas (CHAVAS; MITCHELL, 2018). Nesse contexto, vários estudos demonstraram que os fitonematoides são suscetíveis ao silenciamento gênico, mediado por RNAi, induzida pelo hospedeiro, ou seja, *in planta* (HUANG *et al.*, 2006; YADAV; VELUTHAMBI; SUBRAMANIAM, 2006; SOUZA JÚNIOR *et al.*, 2013; LOURENÇO-TESSUTTI *et al.*, 2015; NIU *et al.*, 2016). Para tanto, é necessário sintetizar moléculas de dsRNAs, envolvendo

um gene específico do fitonematoide. Além disso, essa estratégia minimiza os obstáculos regulatórios, pois não envolve nenhuma expressão de uma nova proteína/peptídeo, reforçando sua biossegurança nativa (BANERJEE *et al.*, 2017).

Os efetores de fitonematoides são genes candidatos à estratégia de silenciamento gênico, via RNAi, por não possuírem, geralmente, homologia com genes de organismos pertencentes a outros táxons (DANCHIN *et al.*, 2013). Dessa forma, os siRNAs, produzidos a partir dos dsRNAs, possivelmente, não causarão o silenciamento de genes não alvo em organismos não alvo (ROSSO; JONES; ABAD, 2009; DUTTA; BANAKAR; RAO, 2015), devido à alta especificidade. Diversos genes efetores de *M. incognita* foram identificados por mineração, baseado em ferramentas de bioinformática (HUANG *et al.*, 2003; DANCHIN *et al.*, 2013) e utilizados por meio da tecnologia de RNAi, incluindo *Mi-cpl-1* (SOUZA JÚNIOR *et al.*, 2013), *Minc04584* (RUTTER *et al.*, 2014), *Mi-msp-1* (CHAUDHARY *et al.*, 2019), dentre os quais mostraram desempenhar papel relevante no sucesso parasitário dos NFG em diferentes plantas hospedeiras, como tabaco, tomate e arroz.

Por meio de análise genômica comparativa entre quatro espécies de fitonematoides, cinco de insetos, nove de vertebrados, quatro de fungos e uma de planta, Danchin *et al.* (2013) selecionaram 15 proteínas candidatas a efetores e um fator de transcrição de *M. incognita*, possivelmente envolvidos no parasitismo. Posteriormente, foi feita uma mineração na terceira versão (V.3) desse banco de dados (genoma de *M. incognita*) pela equipe da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em parceria com o INRA (Institut National de la Recherche Agronomique - França), com o objetivo de buscar novas proteínas efetores potenciais (dados não publicados). Após selecionar grupos ortólogos específicos de fitonematoides parasitos de plantas, foram identificados 333 candidatos a efetores, sendo que 37 são conservados entre os gêneros *Globodera* spp. e *Meloidogyne* spp. A figura 2.1 ilustra os filtros aplicados para a seleção de genes de interesse. Ao todo, 20 genes candidatos a efetores foram selecionados pelo *pipeline* abaixo (Figura 2.1), com base nas suas funções putativas e no seu perfil de expressão *in silico* em diferentes estádios de desenvolvimento (J2, J3, fêmea). Foi realizada a quantificação do acúmulo dos transcritos desses genes por RT-qPCR, a fim de determinar em qual estágio de vida o fitonematoide *M. incognita* acumula um maior número de transcritos. Dentre estes, foram selecionados para o presente estudo dois genes candidatos a efetores que apresentaram maior expressão em J2 parasita, J3 e J4 (*Minc3s01206g21700* e *Minc3s00292g09561*), principais estádios no qual o parasita se alimenta e três genes com maior expressão na fêmea (*Minc3s00280g09294*, *Minc3s01217g21793* e *Minc3s01635g25253*) (dados não publicados).

Figura 2.1 – Pipeline de filtragem de proteomas de NFG para identificação de novos candidatos a efetores. O pipeline ilustra as principais etapas de seleção *in silico*, a partir dos dois conjuntos completos de proteínas (*M. incognita* e *M. hapla*), que permitiu a identificação de novos alvos não redundantes para o desenvolvimento de métodos de controle específicos e mais seguros. NFG: nematoide formador de galha; NFC: nematoide formador de cisto; V.1: versão 1; V.3: versão 3; Blacklisted: cordados, anelídeos, moluscos e plantas.



9 HIPÓTESE

O silenciamento dos potenciais genes efetores de *M. incognita*, dirigidos pelo promotor constitutivo *uceS8.3*, poderá reduzir o sucesso do parasitismo de *M. incognita* em plantas de tabaco transformadas com seus respectivos dsRNAs.

10 OBJETIVOS

10.1 OBJETIVO GERAL

Validar a capacidade de potenciais moléculas, expressadas por genes efetores, em inibir o sucesso parasitário e/ou reprodutivo do fitonematoide *M. incognita*, em plantas GM de *N. tabacum*, via tecnologia de RNA interferente.

10.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar os fragmentos de dsRNAs, referente aos genes estudados e transformar *N. tabacum* com cassete de expressão, contendo o dsRNA, dirigido pelo promotor constitutivo *uceS8.3*, in planta;
- Desafiar as plantas de tabaco GM – realizar bioensaio de infecção das plantas GM com *M. incognita*, para avaliação do número de galhas e o fator de reprodução.

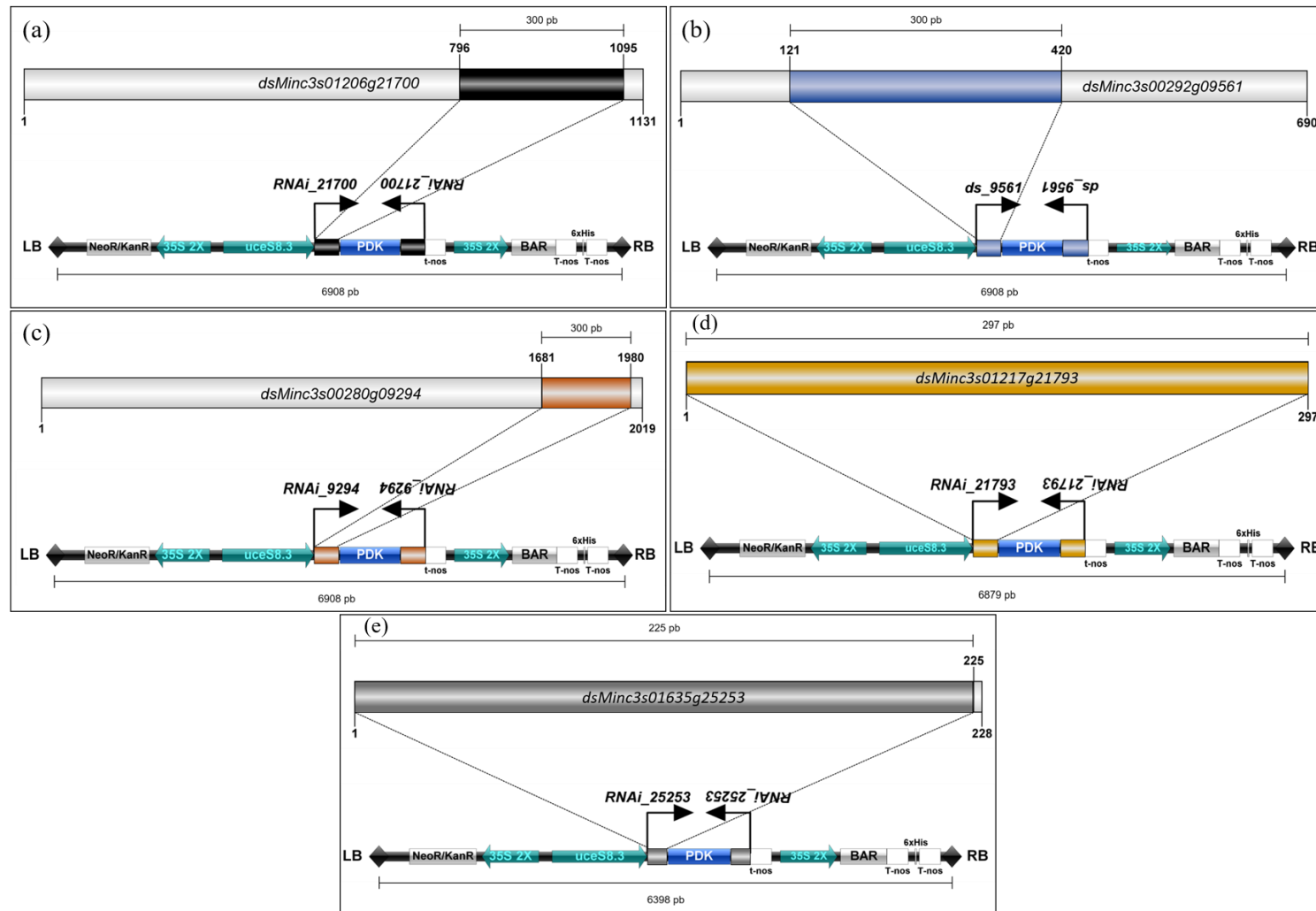
11 MATERIAL E MÉTODOS

11.1 SELEÇÃO DOS FRAGMENTOS DE POTENCIAIS GENES EFETORES DE *M. incognita* E CONTRUÇÃO GÊNICA

Para assegurar que as regiões escolhidas para o silenciamento gênico não provoquem um efeito *off-target*, ou seja, o silenciamento de genes não alvo, as sequências nucleotídicas dos potenciais genes efetores foram comparados com as sequências disponíveis no GeneBank, utilizando a ferramenta BLASTn. Além disso, foram selecionadas sequências com tamanhos entre 225 a 300 pb e com porcentagem GC, dentro do intervalo de 29 a 42%, dentro da sequência codificante de cada um dos genes de parasitismo selecionados. Portanto, o cassete de expressão, usado para transformação de tabaco, foi projetado para a expressão de fragmentos de sequências individuais de cDNAs, senso e anti-senso, dos genes de *M. incognita* *Minc3s01206g21700* (300 pb), *Minc3s00292g09561* (300 pb), *Minc3s00280g09294* (300 pb), *Minc3s01217g21793* (297 pb) e *Minc3s01635g25253* (225 pb) (Figura 2.2), sob o controle do promotor constitutivo da proteína conjugada da ubiquitina (*uceS8.3*) da soja (GROSSI-DE-SA *et al.*, 2010; FRAGOSO *et al.*, 2020, submetido), seguido pelo terminador do sinal de poliadenilação da nopalina sintetase (*T-nos*). As sequências alvo senso e anti-senso foram

separadas por uma sequência oriunda do *intron* da piruvato desidrogenase quinase (PDK) de 742 bp de comprimento para a formação de dsRNA auto complementar. As sequências dos genes marcadores de bialaphos (*bar*) (THOMPSON *et al.*, 1987) e *NeoR/KanR*, para conferir tolerância ao glufosinato de amônio e resistência a neomicina/canamicina, respectivamente, foram incluídas. O cassete de expressão foi sintetizado quimicamente pela Epoch Life Science, Inc. (Texas) (Figura 2.2).

Figura 2.2 – Mapas dos vetores e regiões dos genes, utilizados nas construções para os experimentos de silenciamento gênico, via RNAi *in planta*. As sequências alvo e os vetores binários modulares dos genes *Minc3s01206g21700* (a), *Minc3s00292g09561* (b), *Minc3s00280g09294* (c), *Minc3s01217g21793* (d) e *Minc3s01635g25253* (e) é representado esquematicamente. Mostrando também, as regiões específicas selecionadas para serem alvo de silenciamento via RNAi de cada gene. A expressão dos dsRNAs é dirigida pelo promotor constitutivo, *uceS8.3*. Quando o dsRNA é expresso na planta hospedeira, é produzido um RNA em *hairpin* (hpRNAi), separado por *intron*. Os nucleotídeos inicial e final das regiões escolhidas estão demarcados e identificados.



11.2 CULTIVO DE *Agrobacterium tumefaciens*

A cepa GV3101 de *A. tumefaciens* será utilizada como receptor do vetor com o gene de interesse. Para o cultivo, colônias bacterianas, recém crescidas em meio de cultura Luria Bertani (LB) (BERTANI, 1951) sólido contendo os antibióticos Rifampicina (Rf) ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e Gentamicina (Gt) ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), foram inoculadas em meio de cultura LB líquido contendo os mesmos antibióticos. Posteriormente, esse frasco foi incubado em um agitador orbital com 200 rpm a 28°C , durante 48 h, até atingir a fase exponencial (OD_{600} 0,8 a 1,0). Após, $50 \mu\text{L}$ da solução de meio líquido foi transferido para uma placa de Petri, contendo meio LB sólido seletivo e espalhados com ajuda de uma alça de Drigalski. A placa foi depositada em uma estufa a 28°C , permanecendo por 48 h. Todo o procedimento foi realizado em ambiente estéril para evitar contaminação. Além disso, todos os meios de cultura, utilizados para o crescimento e isolamento de colônias, apresentaram Gt e Rf, com concentração final de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, com o intuito de selecionar somente *A. tumefaciens* que possuem capacidade de virulência.

11.3 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES

Uma colônia isolada de *A. tumefaciens* foi coletada com auxílio de uma alça de platina e transferida para meio de cultura LB líquido acrescido dos antibióticos Gt ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e Rf ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Posteriormente, o pré-inóculo foi incubado a 28°C , 200 rpm por 16 h. Após esse período, $500 \mu\text{L}$ do pré-inóculo foi transferido para 150 mL de meio de cultura LB e foi incubado novamente sob as mesmas condições no período de 12-18 horas, até atingir uma densidade óptica (OD) de até 0,8-1. Logo após esse período, a suspensão bacteriana foi centrifugada por 15 minutos, a 4.000 rpm, a 4°C . O sobrenadante obtido foi descartado e as foram células ressuspendidas suavemente, sob leves agitações com 50 mL de água milli-Q® estéril, e mantidas em temperatura próxima a 4°C . Todo esse volume resultante foi agrupado em um único recipiente e diluídos com mais 250 mL de água milli-Q® estéril e centrifugados por 15 minutos a 4.000 rpm. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o volume ajustado para 250 mL, repetindo o processo de centrifugação. O sobrenadante foi descartado e 20 mL de glicerol 10% estéril adicionados, ressuspendendo suavemente as células e repetindo o processo de centrifugação. Por último, o sobrenadante é descartado novamente e mais 1 mL de glicerol 10% estéril (mantido a 4°C) foi adicionado e o produto separado em alíquotas e congelados instantaneamente com nitrogênio líquido e estocadas a -80°C .

11.4 TRANSFORMAÇÃO E SELEÇÃO DAS CÉLULAS COM PLASMÍDEO DE INTERESSE

Para a transformação de *A. tumefaciens*, foi adicionado 100 ng de DNA plasmidial de cada gene selecionado, individualmente, em células eletrocompetentes. Essas foram transferidas para uma cubeta de eletroporação de 1 mm de distância entre os eletrodos para a realização da sua transformação. O eletroporador foi ajustado para 1.800 V, com capacitância de 40 kV e a resistência de 400 Ω . As células eletrocutadas foram ressuspensas com 1 mL de meio LB e incubadas no período de 2-4 horas em uma estufa a 28 °C. Por fim, as bactérias transformadas foram devidamente plaqueadas por semeadura de superfície em meio de cultura LB sólido contendo Rf (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), Gt (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e Canamicina (KanR) ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Esses antibióticos são agentes seletivos presentes no meio, permitindo especificamente o crescimento de *A. tumefaciens* (GV3101) transformadas com o plasmídeo de interesse.

Após a fase de transformação, foram coletadas 30 colônias recém crescidas no plaqueamento por semeadura de superfície. Foram realizados pequenos riscos em uma nova placa com meio de cultura LB sólido (com Rf (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), Gt (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e KanR (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$)), de maneira a selecionar e identificar as colônias bacterianas isoladas que receberam o plasmídeo com o gene de interesse. As placas foram incubadas em estufa a 28° C por 48 horas. Após o crescimento das colônias, foi realizada PCR de colônia para amplificação do *intron* PDK (279 pb) e confirmação do gene de interesse nas bactérias transformadas. A PCR incluiu uma combinação de PCR buffer (1X), cloreto de magnésio (MgCl) (1,5 mM), dNTPs (0,25 mM), Taq DNA polimerase (1 U) (Ludwig[®], Rio Grande do Sul, Brasil), oligonucleotídeos (0,5 μM de cada) (Tabela 2.1) e 1 μL de colônias homogêneas em água milli-Q[®]. O sistema de amplificação por PCR foi configurado com o seguinte programa no termociclador T100[™] Thermal Cycler (Bio-Rad): desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min e 35 ciclos a 95 °C durante 45 s, 58 °C durante 45 s e 72 °C durante 45 s e uma extensão final a 72 °C durante 5 min. Água estéril foi usado como controle negativo, enquanto o cassete de expressão dos genes, usado para a transformação do tabaco, foi utilizado como um controle positivo. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados por coloração com brometo de etídio (0,2 mg mL^{-1}).

Tabela 2.1 – Oligonucleotídeos utilizados nas caracterizações moleculares de *A. tumefaciens*, *N. tabacum* GM e na avaliação do silenciamento de *M. incognita*.

Nome do oligonucleotídeo	Sequências (5' – 3')	T_M (°C)	Tamanho do amplicon (bp)	Ensaio
bar_Fw	GGCCAGCAGATATTCGTAGAG	60	377	Detecção de cassetes de transformação em plantas de tabaco GM por PCR
bar_Rv	ATCGTTAGGGAGACCGATCA			
PDK_Fw	TGTTAGAAATTCCAATCTGCTTGT	58	279	Detecção de cassetes de transformação em plantas de tabaco GM por PCR
PDK_Rv	TGTTACCTTGTTTATTCATGTTTCG			

11.5 TRANSFORMAÇÃO DE *N. tabacum* VIA *A. tumefaciens*

Foram usadas sementes de *N. tabacum* L. (cv. Petit Havana SR1), plantadas e colhidas na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As sementes foram desinfestadas por incubação em álcool 70% por 5 min, hipoclorito de sódio 2% por 30 minutos seguido de 4 lavagens com água milli-Q[®] estéril. Em seguida, as sementes secas foram posicionadas em placas de meio MS sólido (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (10 g L⁻¹). As placas foram incubadas em sala de cultura com um fotoperíodo de 16h, a uma temperatura de 25 °C.

Uma colônia de *A. tumefaciens* contendo os plasmídeos de interesse, que foram confirmadas por PCR, foi transferida para 5 mL de LB com Rf (50 µg mL⁻¹), Gt (µg mL⁻¹) e KanR (µg mL⁻¹), com uma alça de platina. O inóculo foi incubado a 28°C, a 200 rpm por 16h, até atingir a OD₆₀₀ de 0,5 a 1,0. Após o crescimento do pré-inóculo, 500 µL da suspensão bacteriana foi transferida para 150 mL no meio LB com os mesmos antibióticos citados. O inóculo foi submetido às mesmas condições do inóculo anterior. A suspensão bacteriana foi transferida para tubos e centrifugada por 10 min a 4.000 rpm. As células foram ressuspensas com MS líquido estéril e foi adicionado acetoseringona (13 µM) em 150 mL de LB. A ressuspensão permaneceu no agitador orbital a 28 °C, a 150 rpm por 30 min.

Folhas de plantas de tabaco micropropagadas *in vitro* foram excisadas e cortadas em quadrados de aproximadamente 1 cm², evitando a nervura central da folha. O procedimento foi realizado em placa de Petri com água milli-Q[®] estéril e pequenos ferimentos foram realizados nas folhas. Os explantes foram transferidos para a suspensão bacteriana e foram incubados por 20 min a 28 °C para permitir a infecção pela agrobactéria. Posteriormente, os explantes foram transferidos para MS sólido suplementado com sacarose (10 g L⁻¹) e *Gamborg's Vitamin Solution* (1x) (Sigma-Aldrich[®], EUA) e incubados em ambiente escuro por 48h. Posteriormente, os explantes foram transferidos para placas de Petri contendo meio MS0 [sacarose (10 g L⁻¹), fitagel (3 g L⁻¹), *Gamborg's Vitamin Solution* (1x) (Sigma-Aldrich[®], EUA), cefotaxima (Cx) (500 µg mL⁻¹), hormônio sintético BAP (6-benzilaminopurina) (1 µg mL⁻¹), hormônio NAA (ácido naftalenoacético) (0,1 µg mL⁻¹) e KanR (100 µg mL⁻¹)] para indução de calos. Adicionalmente, foram feitos dois controles experimentais distintos (1° tabaco WT sem co-cultivo com agrobactéria em meio MS0 sem KanR; 2° tabaco WT sem co-cultivo com agrobactéria em meio MS0 com KanR). As placas foram incubadas em sala de cultura com fotoperíodo de 16h, à temperatura de 25 °C.

Em seguida, foram identificados brotos surgidos dos calos resistentes. Esses foram excisados e transferidos para caixas magenta contendo meio MS1 [sacarose (10 g L^{-1}), fitagel (3 g L^{-1}), *Gamborg's Vitamin Solution* (1x) (Sigma-Aldrich[®], EUA), Cx ($200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e KanR ($100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$)] para manter a mesma pressão seletiva, porém sem a presença dos fitormônios indutores de calos, no qual permaneceram por 4 semanas. Posteriormente, plantas com parte aérea em estágio desenvolvimento avançado foram transferidas para o meio MS2 [sacarose (10 g L^{-1}), *Gamborg's Vitamin Solution* (1x) (Sigma-Aldrich[®], EUA), fitagel (3 g L^{-1}), Cx ($200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e ácido indolbutírico (AIB) ($1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$)] para indução de raízes. As plantas foram mantidas nesse meio até o desenvolvimento completo das raízes. Após, foram transferidas para sacos plásticos de 2 L contendo substrato composto por areia, solo estéril e matéria orgânica (1:1:1) (Bioplant, Brasil), onde foram aclimatadas em casa de vegetação até a maturação e obtenção de sementes para obtenção de geração T₁ a partir dos eventos primários de transformação (T₀).

11.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PLANTAS DE TABACO GM DA GERAÇÃO T₀

O DNA genômico do tabaco foi extraído de aproximadamente 20 mg de tecido foliar fresco T₀ e T₁ pelo método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987) com modificações. Após a extração, foi realizado PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para detectar o evento de tabaco com a presença do cassete de expressão dos genes analisados, utilizando os oligonucleotídeos descritos na tabela 2.1. A PCR incluiu uma combinação de PCR buffer (1X), MgCl ($1,5 \text{ mM}$), dNTPs ($0,25 \text{ mM}$), Taq DNA polimerase (1 U) (Ludwig[®], Rio Grande do Sul, Brasil), 40 ng de DNA genômico de plantas de tabaco (GM e WT) e $0,5 \text{ } \mu\text{M}$ de cada oligonucleotídeo. O sistema de amplificação por PCR foi configurado com o seguinte programa no termociclador T100[™] Thermal Cycler (Bio-Rad): desnaturação inicial a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min e 35 ciclos a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 45 s, $58 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 45 s e $72 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 45 s e uma extensão final a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min. O DNA genômico de plantas WT e Água estéril foram usados como controle negativo, enquanto o cassete de expressão dos genes, usado para a transformação do tabaco, foi utilizado como um controle positivo. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados por coloração com brometo de etídio ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$).

11.7 SELEÇÃO DE PROGÊNIES DE TABACO GM DA GERAÇÃO T₁ EM MEIO SELETIVO

Após a obtenção de sementes da geração T₀, essas foram coletadas e armazenadas a 4 °C até o uso. Para seleção das progênies T₁, foram selecionados eventos T₀ PCR positivas. As sementes tiveram suas superfícies desinfestadas por incubação em álcool 70% por 5 min, hipoclorito de sódio 2% por 30 minutos seguido de 4 lavagens com água milli-Q[®] estéril. Em seguida, foram posicionadas em placas de meio MS sólido suplementado com sacarose (10 g L⁻¹), *Gamborg's Vitamin Solution* (1x) (Sigma-Aldrich[®], EUA) e 100 µg mL⁻¹ de KanR para seleção. As sementes que germinaram foram transferidas para meio MS1 e, após enraizamento, foram transferidas para tubetes plásticos de 300 mL contendo substrato composto por areia, solo estéril e matéria orgânica (1:1:1) (Bioplant, Brasil), onde foram aclimatadas em casa de vegetação. Ao atingir aproximadamente 30 cm, as plantas foram selecionadas por PCR para confirmação da presença do transgene, conforme já citado. As plantas PCR positivas foram utilizadas em bioensaios de infecção por *M. incognita*.

11.8 CULTURA DE *M. incognita* E EXTRAÇÃO DOS OVOS

Os fitonematoides (*M. incognita*, raça 3) foram propagados e mantidos em plantas de tomateiro (*S. lycopersicum* L. cv. Santa Clara), cultivadas em casa de vegetação por três meses. A coleta dos fitonematoides foi realizada em diferentes estádios de desenvolvimento (28 a 90 dias após a inoculação (DAI)). Os ovos foram extraídos de acordo com Hussey e Barker (1973), com modificações. Raízes de tomateiro foram trituradas no liquidificador por um minuto em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5%. Posteriormente, o material foi peneirado e lavado em um conjunto de peneiras de 100, 200 e 500 mesh, até completa retirada do hipoclorito. Os ovos retidos na peneira de 500 mesh foram contados com o auxílio de uma Câmara de Peters (VRAIN, 1977). Para a coleta dos ppJ2, a suspensão de ovos foi submetida à técnica de funil de Baermann (BAERMANN, 1917) modificada e mantida à 28 °C em um recipiente contendo água destilada, para permitir a eclosão dos ovos e posterior coleta do fitonematoide. A coleta dos J2s foi realizada a cada dois dias durante uma semana e as amostras permaneceram a 4°C até o momento da utilização do inóculo.

11.9 BIOENSAIOS DE INFECÇÃO DE *M. incognita* NAS PROGÊNIES DE TABACO GM T₁

Para o desafio das plantas GM de tabaco ao *M. incognita* raça 3, foram obtidas sementes T₁, por meio da autofecundação das flores dos eventos aclimatados em casa de vegetação. Apenas as plantas T₁ que foram selecionadas na placa com KanR (100 µg mL⁻¹) e que foram PCR positivas foram consideradas para a avaliação. O número de plantas avaliadas em cada progênie variou de 3 a 5, dependendo do número de indivíduos em cada população e, pelo menos, 1 planta de cada progênie foi selecionada para avanço de geração T₂. Após 15 dias de aclimação em casa de vegetação, todas as plantas foram inoculadas com, aproximadamente 1.000 ppJ2. Sessenta dias após a inoculação (DAI), as raízes de cada planta foram pesadas (peso fresco), determinado o número de galhas e processadas individualmente para a extração de ovos, de acordo com a técnica de Hussey e Barker (1973). Foi realizada a contagem dos ovos e determinado o fator de reprodução (FR). O FR foi calculado como $FR = Pf/Pi$ (Pf: População Final; Pi: População Inicial).

11.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de número de galhas e o fator de reprodução foram analisados estatisticamente utilizando o software R (R CORE TEAM, 2017), pacote *Easyanova* (ARNHOLD, 2013). A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram confirmadas pelos testes Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Foi realizada a análise de variância simples (*One-way ANOVA*) e as diferenças entre médias entre tratamentos foram determinadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

12 RESULTADOS

12.1 DETERMINAÇÃO DE REGIÕES DE CADA GENE DE *M. incognita* PARA SILENCIAMENTO VIA RNAi

Para determinar as 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 Blastn contra o banco não redundante (nr) (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Além disso, 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. A região específica escolhida para os genes *Minc3s01206g21700* (300 pb), *Minc3s00292g09561* (300 pb), *Minc3s00280g09294* (300 pb), *Minc3s01217g21793* (297 pb) e *Minc3s01635g25253* (225 pb) (Figura 2.2) não possuem qualquer similaridade com nenhuma outra sequência do banco nr, nem com nenhuma sequência de outro gene homólogo do genoma de *M. incognita*. Assim, existe uma alta especificidade 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 (Tabela 2.2). As sequências obtidas foram baseadas nos novos dados de re-sequenciamento do genoma V.3 de *M. incognita*, as quais podem ser acessadas através dos respectivos lócus (Tabela 2.2), bem como suas sequências codificantes, por meio da plataforma https://www6.inra.fr/meloidogyne_incognita.

Tabela 2.2 – Resumo das sequências codificantes (CDS) das proteínas candidatas a efetores selecionadas para alvos de silenciamento gênico. LTS (*Lenght Target Sequence*), tamanho do gene alvo selecionado para silenciamento gênico e a porcentagem de bases GC, determinadas como parâmetros de escolha dessas sequências que se estão sublinhadas e em negrito.

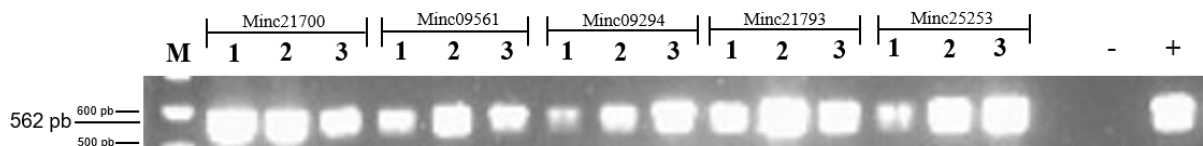
Locus gênico	LTS (pb)/(GC%)	Comprimento (pb)	Sequências codificadores de potenciais efetores de <i>M. incognita</i> (5' - 3')
<i>Minc3s01206g21700</i>	300/(42%)	1131	<p>ATGAAGCATAAAAACAAAAACATCATTGTTTTATAATGCCAATATTAACCTATTTATAGTTGAGG CAATAAATCCATTGGCAAATACTCTTGGATCTGTTCTCAGGCATCTGTTCCAATCTCTGCGGAATC TTATAAAAACACCGGAGAATTAATAATTACAAGAAATGCCCATTTATGGTCAAAAAAATGAAAATA AAATTGTTGCCGAAGGAGGGAAAAGGAAGAAAAGAAAAATAAAAAATAAAAAATTAACAAAC ATTTTCTGATCCAAACAATAAATATTCTGTATTATCCGAATTAATGAAGAAGAGGAGAAAAAAGT TTTAGACAAAGGAAATGAAAGCAAAAGCAAAGGGAAAGAAATTTTGTGGAAAGAGGGGTGTGAAG AATGTAATGGAATTTGTGACGAGGAAGAAGATGAGGTAAACGATGGCAATAAAAGTCTAGAATCG AACAGAAAAATTCGAGGGAGAAGTCTGAAAGGAGGAGGCGGTGGTGGAGGTCATGGTGGTGGCG GTGGAGGACGAGGTGGAAGTGGCGGTGGAGGACGAGGTTTTAGTGGTGGAAAGGGAGGCTATGGT GGAAAAGGAAGCTATGGAGGTGGATATGAAGGCCATGGATATGGAAACACTAAAGGAGCAACTCG TGGATATTATGGGAGGCCTTATTATGGAAGTTATGGACCATACTTTACCCAGTATATTACCCGTAC GGTGGGTATTATGTTGGAGATAGTTCCTAGCAGTAATGACGAGGGCAATTGCTGTTGTCCAAAA CATACTGTG<u>ACTGTTGTTTTGACAATGATGCTAGCTTTTACGGCATTGAGTCCTGGA</u><u>ACTCAA</u> <u>TGGGATGTCGACTTTATCCCGATCTTGATATTTATTCTCTTCCAAATTGCGTGGTAGACAAA</u> <u>GTTCAA</u><u>ACTCGACTGGCCACCGCTATACAATGTAAATTCTCTGCCGCGTATAGAGTCCATT</u> <u>CTGACGCATTTCA</u><u>CAAGCAAATGAAGAAAAGTCCATTCCA</u><u>ACTTTTATGTCCTATTGGGAAGG</u> <u>ATGGAGGACTGAAGTCTTGGCAGAATCCAATGCAACTTGTAATGTTGATGAGAAA</u><u>CGTTTAT</u> GTCATATTATGTTCAACAAAACGAATTGA</p> <p>ATGTCATCAAAAAACAAAATAATTATTTTATTAGTTTTTATTCTAATATTTTTACAAATTCAATCACT TTTAAACAATTTTAAACAATGAATCTTCTTCATGCAATCCAAATCGAAATTTA<u>ATTTTTTCAACTTGC</u> <u>AAAGCCGGCCTTCCTTGGCCTAGAGAAGATTTTACTTCAATTTCTGTTTTAATCACTCACGGA</u> <u>ATTCATGATCGATATATTACAAGAGGATAATCCAAATTTGAAAAACACCTTCAATTCCACA</u> <u>AAGA</u><u>CATTGTTTGGAGTTGATTAATAAATTCATAAATTC</u><u>TTTAAAGAAAAACA</u><u>CAATTACA</u> <u>CAGTTCCAAAAGAGTTGTGCAAAGATTTTCGACAGGCAGCCTTCCAGGTGGACGAGTAAGA</u> <u>AGAGGAGTGTGGGTTGTGGATGGGGAAGGCAT</u><u>CGTTGTGGAAGAAAGAAAGAGGGATATAAA</u> AGAATTTAAAGGCTTGGAAAGAATTGGACGACAATGATTTTAAAGAAATGGCAACAAAAAATTTTCG AAAAACTCCTTTTAAAGAGAAAAACGAAAAATTATCGGAAATTGAGAAAAAATATGTGGAAGGA TCAAGAAACCTTTAGCGATAAGAATGGCAGCATTGGGAATTTATTGCAAATTTGAATCATATGGG AAAGTGGTGAAGATGTTATTGATGGAAGAATTATATTTAATTGA</p>
<i>Minc3s00292g09561</i>	300/(36%)	690	

<i>Minc3s00280g09294</i>	300/(38%)	2019	<p>ATGAAGTTATTCTTGCTCAGTTTATTTTTAATATATTCACAATTTATTGTTAATAGAATCGAGGCACA AAAATGCGAAAATGAAATTTAATAAATAATGTGAAAGTACCATCAACATTTGATTGGTTGGATT AGGGTTTGGATTAGGCTTTAAACCTGGCAAGAGTATTCAATTTGTTGGAACCATAAAAATCAGGTTTC AAGTTGCATTAATTTGGCAAATCCAGGAGAGATTTTGAAGGATGCTGACGTTGTTTTCCATTTTAGT CCACGACCAGGTCCTTTAGGTCCTTAAAAACATATTGAACGAAATAGTTGGAGTAAAAAGAACAGGA TGGACACGAGTAGATTCAAGTGGTGGTTGGCCTATTAAGCCAAATAATAATTTTCGAGATGGAATGG GTTGCGGGACCTAACAAATGCAATAAATGTTTACATCGACAAGAAATTTTTACAAAATATGATAAA TGGGATACGAGTAAAGTTGCCCAACTTAATATTGTTGATGCTATTGCAATTAGTTCTATAAAAATTGT GTGGAGGAAAACCTGATCCAACACCACCTCCTCCAACATGTGAAAAATCCAATTTCTATCGATAAAG TGCCAATACCATCAACATTTGATTTGGTAAAACTTGGATTTGGATTAGGTTTTAAACCTGGCAAGAG TATTCATTTGTTGGAACCATAAAAATTTGGTTCTAGTTGTATAAAAATTGGCAAATCCAGGAGAGTTT CTGAAGGATGCTGACGTTGTTTTCCATTTTAGTCCACGATCAATTCGTAAAAGTTATTGAACGAAATA GTTGGAGTAAAGCAACGGGATGGACACGTTAGATTTAAGTGGTGGTTGGCCTATTAACCAGATA ATCATTTCGAGATGGAATGGATTGCGGGACCTAACAAATGCAATAATTGTCAACATCGACAAAAAAT ATTTTACAACCTTATGATAAATGGGATACGAGTAATGTTGCCCAACTTAATATTGTTGATGCTATTGC AATTAGCTCTATAAAAATTGTGTGGAGGAAAACCTGATCCTACACCAACACCTCCTCCAAAATGTCC CAATGAAGTTCTTATAACTAATGTGTCAATTGGAAACGTTAATCTTCTTAACTATGGATTTGGAATT GGTTTTACTGAAGGCAAAAAGTATTATTATGACTGGAACATTACTAAATGGTGGAAAGTTGTATTTAAA CTGGGAGATCCGGGTGTGCTTTTGCAAACCTGCTGATGCTGTCTCCATTTAGCCCAACAATGTTG CCAAAACATGTTATTTGCAACAGTTGGATGAAAGGAAAGGGTTGGACACCTGAAGATAAATCAGGC GGTTATCCTTTTAACTCTAACAAACCAATTCGAGTTGGAATGGGTTGCTGAGCCTAACAAATACAGTAA AAATAAATGTGATCGCAAATTTCTGGAAAAGGTTTTCTCGTGAAGATTTGAGTGGAGTTGTCCAAC TGGACTTTTCTTATGCTATCAGAATTAGCTCTATTAATTTGTGCAGAGCTGATGAAAATCCCAAC AACAAACAGTAACTCCAACCTACACCCCTCCCGATGTTCCCTTGTCTTATTTTTCACTTAAATTG GATTTGGAATACCAATAGCAATCAATTTAGAAAACGGATTTAAACCAGGAAAACATATTACAATT ATTGGAACACCAACTGAT<u>TATTTTCCTGACTTTGTTATTTGGCCTTGGAGAGCCTGGCATTATGA</u> <u>GAGAGACTGCTAACGTTCTTTTCAGTTTCAGCCCCAATTAATTTCTAAATCAGTTACAGTAA</u> <u>ACACTTTGTTAACAGGGATTGGATGGGAAACGGAATTGACTTACGGACATTCACCCTTTAAAG</u> <u>TTGGAGAGCCATTTCGTTTTAGAAATCAAGGCAGGGCTGAACAATCAAATAGAAGTTTTTGTGA</u> <u>ATTACGTGGCATATCTCAGATTTACTCGTCATGATTTAAGCAAAGTGAGCCAGATACAAATTA</u> <u>TTAGAGCAGTCAAAGTCTGCTCTATTGTTACTTGCTATTGA</u></p>
<i>Minc3s01217g21793</i>	297/(42%)	297	<p><u>ATGAAAGTTGGAGCAGGTTTATTCGCTTTATTCCTCCTTAGTTGTCAATTTTCCTTCTTTA</u> <u>CTGAAGTCGATTCCATTGTATTTCATTTTCGCCCAGGACGACCAGGACGTTTCGGTTCCAATAT</u> <u>ATGAAAGTTAGAGCTAAACGTCATAAGGAGGATTGGCCTCGCCAGATCGACTGACACGTTCT</u> <u>GTGCTAGACCAAGACAGAGCTAAACGTCATGCCACAGCAATGGATTCAATCATTGCACCGCC</u> <u>AGAAAAATGCGAGTTGCTAGAAAAGGTTATTTTTATGCATTCTAA</u></p>
<i>Minc3s01635g25253</i>	225/(29%)	228	<p><u>ATGAATAATTTATTATTTTTTGGACTAATTTTATTTTCAATTAATTTATCAATTATCGTTTATTC</u> <u>TGATTTATGCAAAGATGGGTGTACAATATTATGTAGTATTGTGCAGGAAATTTGTTCAAACTT</u> <u>AGCAACTTGTGAAAGCTATAAAGGATTGTTTGCTTCTGTGAGAAAGCGATGTGCAAATTTGG</u> <u>GGTTAATTGTTCTGCTGAAGATGATTGTGGATATTAG</u></p>

12.2 OBTENÇÃO DE *A. tumefaciens* COM OS POTENCIAIS GENES EFETORES

A. tumefaciens foi transformada individualmente com vetores binários dos genes selecionados, como indicado na figura 2.2. Após a transformação, as colônias que cresceram em meio seletivo, foram testadas com PCR (Figura 2.3) e as positivas foram co-cultivadas com discos foliares de *N. tabacum* para proceder à transformação.

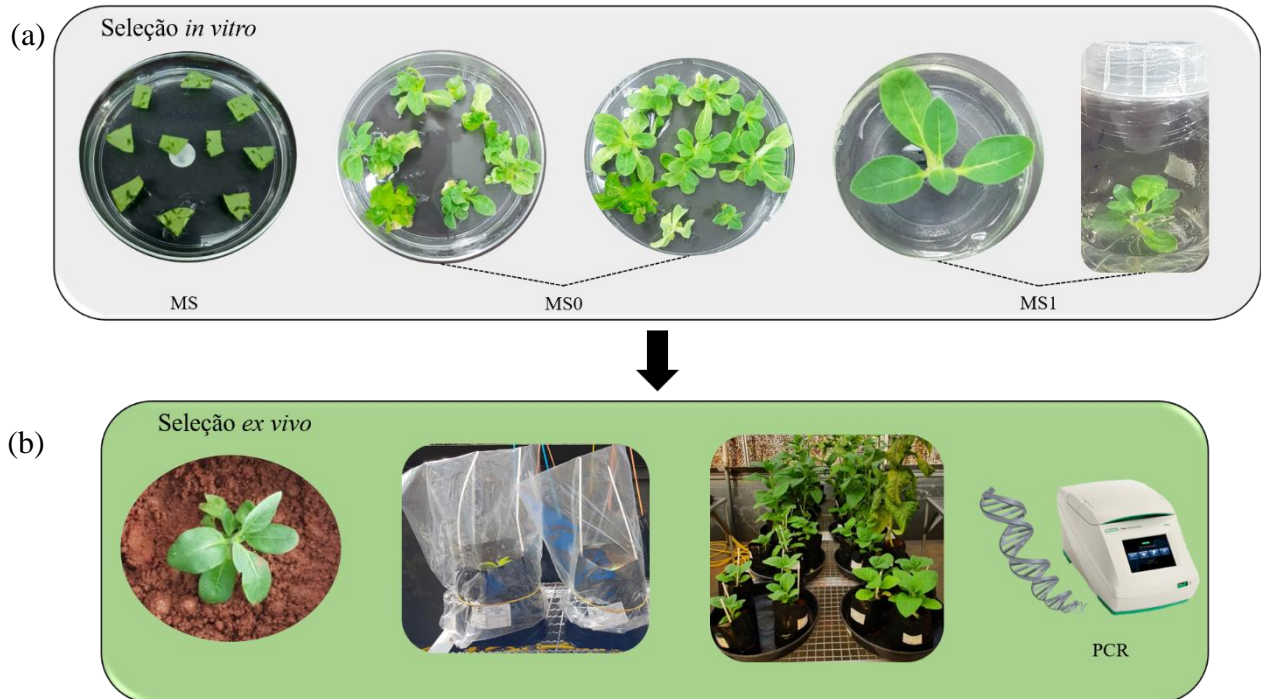
Figura 2.3 – Amplificação dos amplicons dos potenciais genes efetores. Gel de agarose 1%, demonstrando a reação de PCR de colônia das *A. tumefaciens*, transformadas com as construções *Minc3s01206g21700*, *Minc3s00292g09561*, *Minc3s00280g09294*, *Minc3s01217g21793* e *Minc3s01635g25253*, contendo amplificação do fragmento da sequência de ligação do *intron* da piruvato desidrogenase quinase (PDK) de aproximadamente 600 pb. (-): água usada como controle da reação de PCR); (+): controle positivo – cassete de expressão do gene; M: marcador em pares de bases (pb) (*Ladder 1kb plus* (Invitrogen®)).



12.3 TRANSFORMAÇÃO DE *N. tabacum* E SELEÇÃO DOS EVENTOS T₀ E PROGÊNIES T₁

Para cada fragmento gênico foi realizada a co-cultura de 100 fragmentos foliares de plantas de tabaco com *A. tumefaciens*. As plantas transformadas foram, então, aclimatadas em casa de vegetação até sua completa maturação e obtenção de sementes (geração T₁) (Figura 2.4). Foram obtidos 12, 11, 7, 16 e 4 eventos primários (T₀) com os genes *Minc3s01206g21700*, *Minc3s00292g09561*, *Minc3s00280g09294*, *Minc3s01217g21793* e *Minc3s01635g25253*, respectivamente. Essas plantas foram confirmadas pela amplificação do gene *bar* por PCR.

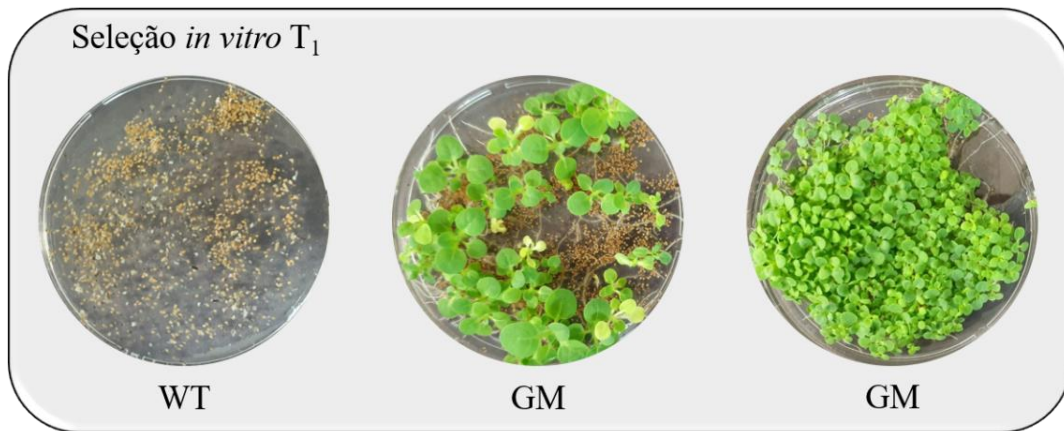
Figura 2.4 – Seleção de plantas de *N. tabacum* GM T₀. (a) Seleção *in vitro* de *N. tabacum* após transformação com *A. tumefaciens*. Os explantes foram transferidos para meios seletivos e indutores, de acordo com a fase de desenvolvimento da planta. Após o enraizamento das plantas em meio de cultura, (b) as plantas foram transferidas para solo em casa de vegetação, onde foram aclimatadas e tiveram seu material genético amplificado por PCR para seleção. MS (sacarose e *Gamborg's Vitamin Solution*); MS0 (sacarose, fitagel, *Gamborg's Vitamin Solution*, Cx, BAP, NAA e KanR); MS1 (sacarose, fitagel, *Gamborg's Vitamin Solution*, Cx e KanR).



12.4 BIOENSAIOS COM AS PROGÊNIES DE TABACO GM T₁ CONTRA *M. incognita*

Para verificar o efeito do silenciamento dos genes alvo nos fitonematoides foram realizados bioensaios, infectando ppJ2 nas plantas transformadas e nas plantas WT. Primeiramente, as sementes T₁ selecionadas *in vitro* na presença de KanR (Figura 2.5) foram transferidas para tubetes contendo solo estéril e mantidas em câmara de crescimento em torno de 15 dias. Observou-se que nas placas com plantas GM havia também a presença de segregantes nulos, visto que algumas plantas ficaram amareladas ou sementes que não germinaram.

Figura 2.5 – Seleção de plantas GM T₁ de *N. tabacum* em meio MS com KanR 100 µg mL⁻¹. WT: planta não transformada que não germinou na placa de seleção. GM: planta transgênica que germinou e cresceu na placa de seleção.



O bioensaio foi realizado com 1 evento GM de cada uma das construções gênicas *Minc3s01206g21700*, *Minc3s00292g09561* e *Minc3s01217g21793*, 3 eventos da construção *Minc3s00280g09294*, além das plantas WT como controle. Dentro de cada evento de transformação foram utilizados 3 a 5 indivíduos como repetição, dependendo do número de planta sobreviventes e PCR positivas. Cada planta foi selecionada individualmente por PCR (Figura 2.6) e, após confirmação da presença do transgene, foram inoculadas com 1.000 J2pp recém-eclodidos (o número de repetições confirmadas por PCR estão descritas na tabela 2.3).

Figura 2.6 – Amplificação dos potenciais genes efetores em *N. tabacum* T₁. Gel de agarose 1% contendo amplificação do fragmento do gene de seleção *bar* de aproximadamente 377 pb. (a) *ds21700.1*, (b) *ds9561.11*, (c) *ds9294.2*, (d) *ds9294.3*, (e) *ds9294.4*, (f) *ds21793.3*. (WT): planta não transformada utilizada como controle negativo; (-): água usada como controle negativo da reação de PCR; (+): controle positivo – cassete de expressão do gene; M: marcador em pares de bases (pb) (*Ladder 1kb plus* (Invitrogen®)).

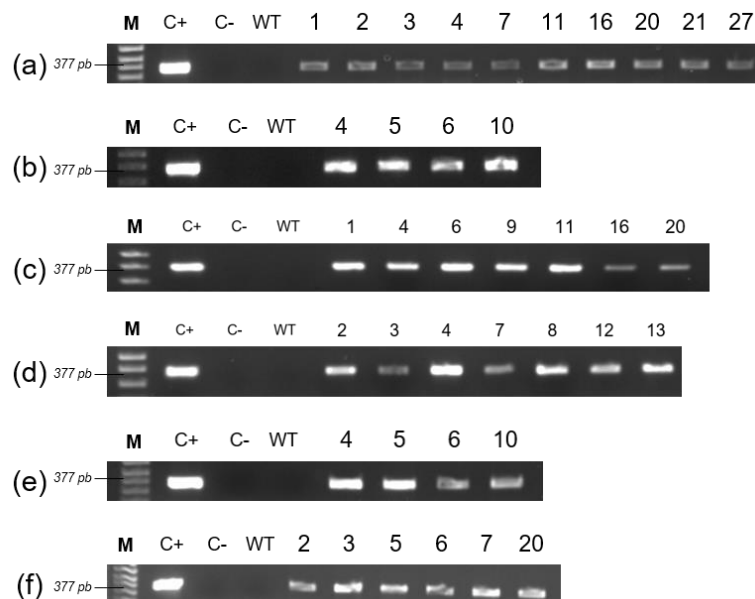


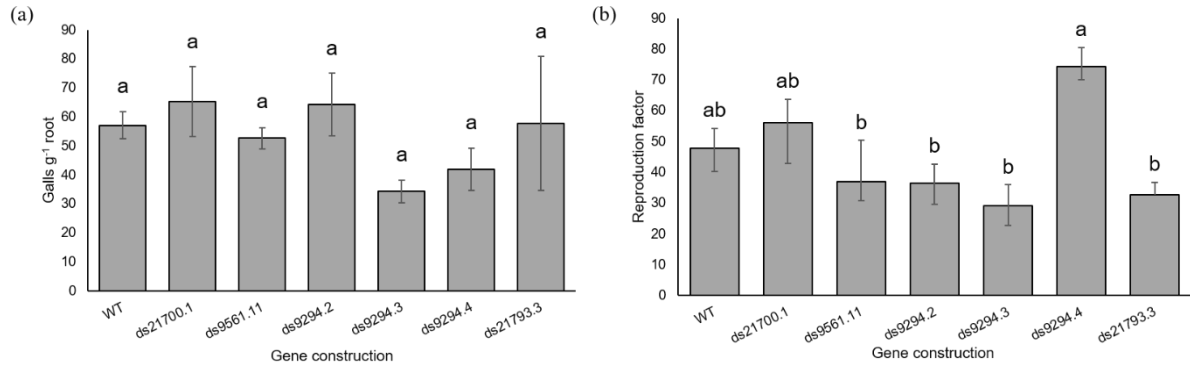
Tabela 2.3 – Repetições de plantas GM de cada construção submetidas ao bioensaio contra *M. incognita*.

Construção	Evento T ₀	Quantidade de progênies T ₁ PCR+ submetidas ao bioensaio	Quantidade de progênies T ₁ avaliadas
<i>Minc3s01206g21700</i>	<i>ds21700.1</i>	10	5
<i>Minc3s00292g09561</i>	<i>ds9561.11</i>	4	3
<i>Minc3s00280g09294</i>	<i>ds9294.2</i>	7	5
<i>Minc3s00280g09294</i>	<i>ds9294.3</i>	7	5
<i>Minc3s00280g09294</i>	<i>ds9294.4</i>	4	3
<i>Minc3s01217g21793</i>	<i>ds21793.3</i>	6	5

As plantas de tabaco cultivadas *in vitro* em meio com KanR possuíam tamanho desuniforme e sofreram muito com o transplante para o solo em tubetes. Após a inoculação com J2s de *M. incognita*, mesmo sendo irrigadas em dias alternados, começaram a apresentar folhas amareladas e secas. Alguns fatores podem ter influenciado nesse processo: (1) as plantas não se adaptaram ao solo e desenvolveram raízes superficiais, dificultando seu crescimento e sobrevivência; (2) a temperatura da casa de vegetação não foi adequada para esse tipo de material; e (3) as plantas necessitariam de suplementação por meio da aplicação de nutrientes para melhorar seu desenvolvimento, o que não foi realizado.

Ainda assim, aos 60 DAI, as raízes das plantas foram extraídas e processadas individualmente para a determinação do número de galhas g⁻¹ de raiz e do FR. A Figura 2.7a mostra o resultado da contagem das galhas presentes nas raízes de tabaco em plantas WT, bem como nas linhagens GM de cada construção avaliada. O número médio de galhas g⁻¹ de raiz formadas pela infecção de *M. incognita* por planta não mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às plantas WT. O FR de *M. incognita* também não diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre o controle e as linhagens GM de cada construção. Porém, a comparação entre os eventos GM mostrou que o FR foi significativamente ($p < 0,05$) maior na progênie *ds9294.4* em relação às progênies GM *ds9561.11*, *ds9294.2*, *ds9294.3* e *ds21793.3* (Figura 2.7b).

Figura 2.7 – Efeito das moléculas de dsRNAs no desenvolvimento e reprodução de *M. incognita* em plantas de tabaco T₁. (a) O número de galhas g⁻¹ de raiz não foi significativamente diferente ($p < 0,05$) nas linhagens GM e no WT. (b) O FR (fator de reprodução) de *M. incognita* não diferiu significativamente ($p < 0,05$) nas raízes WT em comparação com as linhagens GM. As barras indicam os erros padrão dos dados médios ($n = 3-5$) e as diferentes letras são significativamente diferentes pelo teste Tukey ($p < 0,05$) entre os tratamentos.



13 DISCUSSÃO

13.1 TABACO GM EXPRESSANDO dsRNA DE POTENCIAIS GENES EFETORES NÃO RESULTOU NA REDUÇÃO DA INFECÇÃO POR *M. incognita* NA GERAÇÃO T₁

Para que o parasitismo de fitonematoides, como *M. incognita*, ocorra com êxito, é indispensável o uso eficiente do acúmulo de moléculas de parasitismo disponíveis para contornar as defesas da planta e manter os sítios de alimentação (GHEYSEN; MITCHUM, 2011). O silenciamento bem sucedido de genes de fitonematoides *in planta* já foi relatado por diversos autores (tabela 1) e em diferentes espécies de fitonematoides (tabela S1) há mais de uma década.

Fundamentado na importância desses genes, este estudo foi realizado para investigar a possibilidade de redução dos transcritos de cinco genes de potenciais efetores, individualmente, de modo a reduzir a taxa de sucesso parasitário e/ou reprodutivo deste fitonematoide em plantas de tabaco. No entanto, com todos os desafios que surgiram durante esse experimento, todas as plantas GM contendo as construções de dsRNAs *Minc3s01206g21700*, *Minc3s00292g09561*, *Minc3s00280g09294*, *Minc3s01217g21793* e WT avaliadas apresentaram valores estatisticamente similares quanto ao número de galhas g⁻¹ de raiz, indicando ausência de resistência ao fitonematoide. Embora o número de galhas formadas pelo fitonematoide não tenha diferido significativamente, as linhagens GM *ds9294.3* e *ds9294.4* apresentaram, em termos absolutos, redução de 40 e 26,6%, respectivamente, em comparação com as plantas WT. Resultado semelhante foi observado por Chukwurah *et al.* (2019), no qual as linhagens GM da geração T₁ de *S. lycopersicum* expressando dsRNA-*PolA1* não apresentaram redução

significativa no número de galhas geradas por *M. incognita*, porém, houve redução em torno de 12% em comparação com as plantas WT. Com relação ao FR, observa-se também que não houve diferenças significativas entre as plantas GM e o controle. Porém, nota-se uma redução significativa (acima de 50%) nas linhagens *ds9294.2*, *ds9294.3*, *ds9561.11* e *ds21793.3* em comparação com a planta de algodão GM *ds9294.4*. O fato de a planta de algodão GM *ds9294.4* apresentar resultado tão contrastante para FR em comparação com as linhagens, oriundas da mesma construção (*ds9294.2* e *ds9294.3*), apesar de supostamente este gene estar envolvido com a reprodução do nematoide, pode estar relacionada à posição do gene no genoma da planta que, possivelmente, impediu sua expressão.

Outro motivo que também pode ser questionado a respeito da não observação da resistência das plantas GM a *M. incognita* pode estar, hipoteticamente, associado ao fato de que, caso os eventos primários (T₀) contenham apenas uma cópia do transgene (A-, hemizigoto), de acordo com a Lei de Mendel, espera-se que na geração T₁ 25% das plantas sejam homozigotas (AA), 50% heterozigotas (A-), isto é, contenham apenas um alelo transgênico, e 25% das plantas não contenham o gene (--). Segundo Tizaoui e Kchouk (2012), o aumento da expressão do transgene pode ser explicado pela amplificação ou duplicação do transgene no *loci* original. A inserção de mais de uma cópia no genoma da planta (YIN; PLÄDER; MALEPSZY, 2004), assim como mecanismos de eliminação do transgene (ROMANO *et al.*, 2005) também são observados em plantas oriundas das manipulações de cultura de tecidos. Dessa forma, novas análises serão realizadas nas gerações T₁ e T₂, onde espera-se que, com a duplicação do transgene no genoma da planta, as mesmas possam mostrar com clareza o efeito do silenciamento desses potenciais efetores no insucesso do parasitismo de *M. incognita*.

14 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Este estudo teve como objetivo iniciar avaliar genes potencialmente envolvidos no parasitismo de *M. incognita*, *Minc3s01206g21700*, *Minc3s00292g09561*, *Minc3s00280g09294*, *Minc3s01217g21793* e *Minc3s01635g25253*, como ferramenta biotecnológica de controle desse fitonematoide, via transformação genética de plantas, aplicado a estratégia de silenciamento gênico. Não há relatos da função desses genes em nenhum fitonematoide, sendo, então, esse o primeiro documento com informações associadas a esses genes. Diante da provável função efetora desses genes, foi realizado o perfil cinético de expressão dos cinco genes avaliados, revelando-os como importantes nos processos de

penetração e migração (fases iniciais) em raízes de plantas, além da sua provável participação nos estádios finais de vida do fitonematoide.

A transformação de tabaco com *A. tumefaciens* foi bem sucedida, sendo confirmada por PCR e seleção com KanR. Devido ao curto prazo, não foi possível realizar todos os bioensaios contra *M. incognita*, para confirmar se ocorre interferência na expressão desses genes. No primeiro bioensaio realizado houve um problema técnico, não ocorrendo boa infecção com os fitonematoídeos, tanto com as plantas de tabaco GM como as plantas controle. Devido à baixa infecção, não foi possível diferenciar nas plantas o número de galhas e o número de ovos depositados, o que pode ter sido ocasionado por motivos já discutidos. Com os experimentos realizados, não foi possível concluir o potencial papel dos diferentes genes no parasitismo e/ou reprodução desse fitonematoide, sendo também impossível confirmar o potencial do uso desses genes para o controle desse parasita.

A próxima etapa do estudo será a seleção de plantas de tabaco GM da geração T₁ e T₂ com glufosinato de amônio e por PCR e posterior realização de bioensaios contra *M. incognita*, a fim de verificar se a interferência desses genes afeta seu parasitismo e/ou sua reprodução. Além disso, serão realizados ensaios de penetração do fitonematoide na raiz de tabaco, pela análise com fucsina ácida, avaliação do silenciamento gênico dos genes alvo em galhas formadas por *M. incognita* por RT-qPCR, análise morfológica das células gigantes nas plantas expressando dsRNAs dos genes alvo por microscopia e hibridização *in situ*.

15 CONCLUSÃO GERAL

No presente estudo foram descritas informações a respeito do silenciamento gênico de *M. incognita*, a partir da transformação de *G. hirsutum* e *N. tabacum* com genes importantes para a sobrevivência e infecção do fitonematoide. Os dados gerados e discutidos aqui confirmaram a importância das moléculas essenciais ao fitonematoide e efetoras de parasitismo, como ponto de partida, visando a obtenção de plantas que sejam tolerantes/resistentes a fitonematoides. Os dados obtidos no Capítulo 1 acerca da utilização de plantas de algodão contendo *dsMinc1* são pioneiros e evidenciam a eficácia do uso da tecnologia de RNAi para o controle de *M. incognita*. No Capítulo 2, os dados ainda são inconclusivos, necessitando dados melhores de bioensaios e finalização da caracterização molecular.

Atualmente, estudos envolvendo pesquisa fundamental e validação de ativos biotecnológicos, bem como realização de prova de conceito em plantas commodities são de suma importância, como previsão para substituição das estratégias convencionais para o controle de pragas no campo. Ressalta-se que a piramidação de genes do patógeno via RNAi, aliada a genes de defesa do hospedeiro, poderá potencializar esta ferramenta no combate a este importante fitonematoide.

16 PERSPECTIVAS GERAIS

Os dados aqui gerados, poderão servir de subsídios para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para o controle dos fitonematoides, de maneira mais eficiente nas culturas de importância econômica, como algodão e soja. O uso do RNAi é mais uma ferramenta estratégica no controle integrado de fitonematoides, podendo, assim, diminuir a expressão de genes essenciais e efetores de *M. incognita*. Os genes validados e confirmados como ativo biotecnológico efetivo no controle de fitonematoides poderão ser inseridos em outras plantas de interesse comercial, o que poderá ser feito, por exemplo, em plantas de soja.

Após a repetição dos bioensaios com os potenciais genes efetores, caso se obtenha resultados positivos para o controle de *M. incognita*, pode-se desenvolver uma construção única envolvendo fragmentos de três diferentes genes, sob controle de um promotor com alta expressão em galhas, como o *uces8.3*, em plantas de interesse comercial. Além disso, existe a possibilidade de se combinar genes efetores com genes essenciais de *M. incognita*, assim como genes de resistência da planta em uma mesma construção, a fim de potencializar o insucesso do parasita. De posse de todas essas informações, o uso de estratégias biotecnológicas, por meio

do desenvolvimento de cultivares GM resistentes a fitonematoides, constitui um campo promissor para o futuro do agronegócio.

17 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, P. *et al.* Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 26, n. 8, p. 909–915, 2008.

ABD-ELGAWAD, M. M. M.; ASKARY, T. H. Impact of phytonematodes on agriculture economy. *In*: ASKARY, T. H.; MARTINELLI, P. R. P. (org.). **Biocontrol Agents of Phytonematodes**. Wallingford, UK: CABI, 2015. p. 3–49.

ABDURAKHMONOV, I. Y. *et al.* RNA Interference for functional genomics and improvement of cotton (*Gossypium* sp.). **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 7, n. February, p. 1–17, 2016.

ABRAPA. **Algodão no mundo**. [s. l.], 2020. Disponível em: <https://www.abrapa.com.br/Paginas/Dados/Algodão no Mundo.aspx>. Acesso em: 2 abr. 2020.

ADAMS, K. L. *et al.* Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 100, n. 8, p. 4649–4654, 2003.

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.

ALVES, G. C. S. *et al.* Inheritance of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in cotton accession TX 25. **Acta Scientiarum Agronomy**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 331, 2017.

ARAGÃO, F. J. L. *et al.* Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. **Theoretical and Applied Genetics**, [S. l.], v. 101, n. 1–2, p. 1–6, 2000.

ARGUEL, M. J. *et al.* siRNAs trigger efficient silencing of a parasitism gene in plant parasitic root-knot nematodes. **Genes**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 391–408, 2012.

ARNHOLD, E. Package in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [S. l.], v. 50, n. 6, p. 488–492, 2013.

ARTICO, S. *et al.* Isolation and characterization of three new promoters from *Gossypium hirsutum* that show high activity in reproductive tissues. **Plant Molecular Biology**, [S. l.], v. 32, p. 630–643, 2013.

ASMUS, G. L. *et al.* Manejo de nematoides. *In*: FREIRE, E. C. (org.). **Algodão no cerrado do Brasil**. Brasília: Gráfica e Editora Positiva, 2015. p. 445–483.

- ATKINSON, H. J. *et al.* Prototype demonstration of transgenic resistance to the nematode *Radopholus similis* conferred on banana by a cystatin. **Transgenic Research**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 135–142, 2004.
- ATKINSON, H. J.; LILLEY, C. J.; URWIN, P. E. Strategies for transgenic nematode control in developed and developing world crops. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 251–256, 2012.
- AULD, D. *et al.* Mutagenesis systems for genetic analysis of *Gossypium*. In: JORGENSEN, R. A. (org.). **Plant Genetics and Genomics: Crops and Models**. Athens, GA: Springer, 2009. p. 209–226.
- BACK, M. A.; HAYDOCK, P. P. J.; JENKINSON, P. Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens. **Plant Pathology**, [S. l.], v. 51, n. 6, p. 683–697, 2002.
- BAERMANN, G. Eine einfache methode zur auffindung von *Ankylostomum* (Nematoden) larven in erdproben. **Mededelingen uit het Geneeskundig Laboratorium te Weltevreden**, Batavia, v. 57, p. 131–137, 1917.
- BAKHETIA, M. *et al.* RNA interference and plant parasitic nematodes. **TRENDS in Plant Science**, [S. l.], v. 10, n. 8, p. 6–11, 2005a.
- BAKHETIA, M. *et al.* RNA interference of *dual oxidase* in the plant nematode *Meloidogyne incognita*. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, [S. l.], v. 18, n. 10, p. 1099–1106, 2005b.
- BAKHETIA, M.; URWIN, P. E.; ATKINSON, H. J. qPCR analysis and RNAi define pharyngeal gland cell-expressed genes of *Heterodera glycines* required for initial interactions with the host. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 306–312, 2007.
- BALI, S. *et al.* Jasmonic acid-induced tolerance to root-knot nematodes in tomato plants through altered photosynthetic and antioxidative defense mechanisms. **Protoplasma**, [S. l.], v. 255, n. 2, p. 471–484, 2018.
- BANERJEE, S. *et al.* RNA interference: A novel source of resistance to combat plant parasitic nematodes. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 8, p. 1–8, 2017.
- BARBOSA, A. E. A. D. *et al.* Differentially expressed genes in cotton plant genotypes infected with *Meloidogyne incognita*. **Plant Science**, [S. l.], v. 177, n. 5, p. 492–497, 2009.
- BARRETT, J.; WRIGHT, D. J. Intermediary metabolism. In: PERRY, R. N.; WRIGHT, D. J. (org.). **The Physiology and Biochemistry of Free-Living and Plant-Parasitic Nematodes**. Oxford: CABI Publishing, 1998. p. 331–353.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, [S. l.], v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.
- BARTEL, D. P. MicroRNA target recognition and regulatory functions. **Cell**, [S. l.], v. 136, n. 2, p. 215–233, 2009.

- BARTLEM, D. G.; JONES, M. G. K.; HAMMES, U. Z. Vascularization and nutrient delivery at root-knot nematode feeding sites in host roots. **Journal of Experimental Botany**, [S. l.], v. 65, n. 7, p. 1789–1798, 2014.
- BARTON, K. A. *et al.* Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. **Cell**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 1033–1043, 1983.
- BASSO, M. F. *et al.* Insights into genetic and molecular elements for transgenic crop development. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 11, p. 1–24, 2020.
- BAULCOMBE, D. RNA silencing *in plants*. **Nature**, [S. l.], v. 431, p. 356–363, 2004.
- BECKER, W. F.; FERRAZ, S.; SILVA, E. A. M. Alterações histopatológicas em raízes de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) infectadas por *Heterodera glycines*. **Nematologia Brasileira**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 34–46, 1999.
- BEREZIKOV, E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. **Nature Reviews Genetics**, [S. l.], v. 12, n. 12, p. 846–860, 2011.
- BERTANI, G. Studies on lysogenesis: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, [S. l.], v. 62, n. 3, p. 293–300, 1951.
- BOERMA, H. R.; HUSSEY, R. S. Breeding plants for resistance to nematodes. **Journal of nematology**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 242–52, 1992.
- BOUCHÉ, N. *et al.* An antagonistic function for *Arabidopsis DCL2* in development and a new function for *DCL4* in generating viral siRNAs. **EMBO Journal**, [S. l.], v. 25, n. 14, p. 3347–3356, 2006.
- BRAECKMAN, B. P.; HOUTHOOFD, K. V. J. R. Intermediary metabolism. *In*: **WormBook: The Online Review of C. elegans Biology**. Pasadena, CA: WormBook, 2009. p. 1–24.
- BRASILEIRO, A. C. M.; CABRAL, G. B.; SILVA, M. C. M. Transformação de plantas-modelo via *Agrobacterium* spp. *In*: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (org.). **Manual de transformação genética de plantas**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2015. p. 105–136.
- BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. Introdução à transformação genética de plantas. *In*: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (org.). **Manual de transformação genética de plantas**. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2015. p. 15–20.
- BRIDGE, J. Nematodes. *In*: HILLOCKS, R. J. (org.). **Cotton disease**. Londres, Reino Unido: CAB International, 1992. p. 331–353.
- BRUDERER, S. **Genetically modified (GM) crops: molecular and regulatory details**. [S. l.]: BATS, 2003.
- BURAND, J. P.; HUNTER, W. B. RNAi: Future in insect management. **Journal of Invertebrate Pathology**, [S. l.], v. 112, p. 68–74, 2013.

BURGE, C. B.; TUSCHL, T.; SHARP, P. A. Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosome. *In*: GESTELAND, R. F.; CECH, T. R.; ATKINS, J. F. (org.). **RNA World**. 2. ed. Gesteland: Cold Spring Harbor, 1999. p. 525–560.

CABRAL, D. *et al.* The plant WEE1 kinase is involved in checkpoint control activation in nematode-induced galls. **New Phytologist**, [*S. l.*], v. 225, n. 1, p. 430–447, 2020.

CALLIS, J.; RAASCH, J. A.; VIERSTRA, R. D. Ubiquitin extension proteins of *Arabidopsis thaliana*. Structure, localization, and expression of their promoters in transgenic tobacco. **Journal of Biological Chemistry**, [*S. l.*], v. 265, n. 21, p. 12486–12493, 1990.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, [*S. l.*], v. 136, n. 4, p. 642–655, 2009.

CASTAGNONE-SERENO, P.; SEMBLAT, J.-P.; CASTAGNONE, C. Modular architecture and evolution of the *map-1* gene family in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Molecular Genetics and Genomics**, [*S. l.*], v. 282, n. 5, p. 547–554, 2009.

CELERES. **Informativo Biotecnologia**. [*S. l.*]: Céleres, 2014.

CHAKRAVARTHY, V. S. K. *et al.* Current status of genetic engineering in cotton (*Gossypium hirsutum* L): an assessment. **Critical Reviews in Biotechnology**, [*S. l.*], v. 34, n. 2, p. 144–160, 2014.

CHARLTON, W. L. *et al.* Additive effects of plant expressed double-stranded RNAs on root-knot nematode development. **International Journal for Parasitology**, [*S. l.*], v. 40, n. 7, p. 855–864, 2010.

CHAUDHARY, S. *et al.* Host-induced silencing of *Mi-msp-1* confers resistance to root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in eggplant. **Transgenic Research**, [*S. l.*], v. 28, n. 3–4, p. 327–340, 2019.

CHAVAS, J. P.; MITCHELL, P. D. Corn productivity: The role of management and biotechnology. *In*: AMANULLAH (org.). **Corn: Production and Human Health in Changing Climate**. [*S. l.*]: Intechopen, 2018. p. 13–26.

CHEN, J. *et al.* A novel *Meloidogyne graminicola* effector, *MgGPP*, is secreted into host cells and undergoes glycosylation in concert with proteolysis to suppress plant defenses and promote parasitism. **PLoS Pathogens**, [*S. l.*], v. 13, n. 4, p. 1–24, 2017.

CHEN, Q. *et al.* Functional Analysis of Pathogenicity Proteins of the Potato Cyst Nematode *Globodera rostochiensis* Using RNAi. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [*S. l.*], v. 18, n. 7, p. 621–625, 2005.

CHITWOOD, D. J. Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service. **Pest Management Science**, [*S. l.*], v. 59, n. 6–7, p. 748–753, 2003.

CHUKWURAH, P. N. *et al.* Expression of *Meloidogyne incognita* *PolA1* hairpin RNA reduced nematode multiplication in transgenic tomato. **Plant Biotechnology Reports**, [*S. l.*], v. 13, n. 6, p. 591–601, 2019.

COLONNA, W. J.; MCFADDEN, B. A. Isocitrate lyase from parasitic and free-living nematodes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 170, p. 608–619, 1975.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira - SAFRA 2019/20 (Março 2020). **Companhia Nacional de Abastecimento**, [S. l.], v. 7, n. 6, p. 1–89, 2020.

CORNAH, J. E.; SMITH, S. M. Synthesis and function of glyoxylate cycle enzymes. In: BAKER, A.; GRAHAM, I. A. (org.). **Plant Peroxisomes: Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications**. 1. ed. [S. l.]: Springer Netherlands, 2002. p. 57–101.

COSTA, S. R.; BUENO, M. G. **A saga do algodão - Das primeiras lavouras à ação na OMC**. Rio de Janeiro: Insight Engenharia, 2004.

COTTON INCORPORATED. **Precision crop management for cotton**. [s. l.], 2017. Disponível em: <http://www.cottoninc.com/fiber/agriculturaldisciplines/engineering/precision-crop-management-for-cotton/>. Acesso em: 20 maio. 2018.

COUTINHO, E. M. Gossypol: A contraceptive for men. **Contraception**, [S. l.], v. 65, n. 4, p. 259–263, 2002.

COYNE, D. L.; ROSS, J. L. **Protocol for nematode resistance screening root-knot nematodes *Meloidogyne* spp.** Ibadan, Nigeria: International Institute of Tropical Agriculture (IITA), 2014.

DALZELL, J. J. *et al.* Short interfering RNA-mediated gene silencing in *Globodera pallida* and *Meloidogyne incognita* infective stage juveniles. **International Journal for Parasitology**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 91–100, 2010.

DANCHIN, E. G. J. *et al.* Identification of novel target genes for safer and more specific control of root-knot nematodes from a pan-genome mining. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 9, n. 10, 2013.

DAVIS, E. L. *et al.* Nematode parasitism genes. **Annual Review of Phytopathology**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 365–396, 2000.

DAVIS, E. L. *et al.* Parasitism proteins in nematode-plant interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 360–366, 2008.

DAVIS, E. L.; HUSSEY, R. S.; BAUM, T. J. Parasitism genes: what they reveal about parasitism. In: R.H., B.; C.G., T. (org.). **Cell Biology of Plant Nematode Parasitism**. 15. ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009. p. 15–44.

DAVIS, R. F.; STETINA, S. R. Resistance and tolerance to nematodes in cotton. In: GALBIERI, R.; BELOT, J. L. (org.). **Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle**. Mato Grosso: IMAmt, 2016. p. 166–243.

DAVIS, W. L. *et al.* Identification of glyoxylate cycle enzymes in chick liver – the effect of vitamin D3: cytochemistry and biochemistry. **Anatomical Record**, [S. l.], v. 227, p. 271–284, 1990.

- DAVIS, W. L.; JONES, R. G.; GOODMAN, D. B. P. Cytochemical localization of malate synthase in amphibian fat body adipocytes: possible glyoxylate cycle in a vertebrate. **Journal Histochem Cytochem**, [S. l.], v. 34, p. 689–692, 1986.
- DEBLOCK, M. The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implications for the plant breeding. **Euphytica**, [S. l.], v. 71, p. 1–14, 1993.
- DECRAEMER, W.; HUNT, D. J. Structure and classification. *In*: PERRY, R. N.; MOENS, M. (org.). **Plant Nematology**. 2. ed. Wallingford, Oxfordshire, Reino Unido: CAB International, 2013. p. 3–32.
- DEPICKER, A.; VAN MONTAGU, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. **Current Opinion in Cell Biology**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 373–382, 1997.
- DINH, P. T. Y. *et al.* Plant-mediated RNA interference of effector gene *Mc16D10L* confers resistance against *Meloidogyne chitwoodi* in diverse genetic backgrounds of potato and reduces pathogenicity of nematode offspring. **Nematology**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 669–682, 2014a.
- DINH, P. T. Y. *et al.* RNA Interference of effector gene *Mc16D10L* confers resistance against *Meloidogyne chitwoodi* in *Arabidopsis* and potato. **Nematology**, [S. l.], v. 104, n. 10, p. 1098–1106, 2014b.
- DONG, W. *et al.* Comparison of methods for assessing resistance to *Meloidogyne arenaria* in peanut. **Journal of Nematology**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 169–175, 2007.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, [S. l.], v. 9, p. 11–15, 1987.
- DUBREUIL, G. *et al.* Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism. **New Phytologist**, [S. l.], v. 176, n. 2, p. 426–436, 2007.
- DUTTA, T. K. *et al.* Tomato transgenic plants expressing hairpin construct of a nematode protease gene conferred enhanced resistance to root-knot nematodes. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 6, p. 1–14, 2015.
- DUTTA, T. K.; BANAKAR, P.; RAO, U. The status of RNAi-based transgenic research in plant nematology. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 5, p. 1–7, 2015.
- DUTTA, T. K.; KHAN, M. R.; PHANI, V. Plant-parasitic nematode management via biofumigation using brassica and non-brassica plants: Current status and future prospects. **Current Plant Biology**, [S. l.], v. 17, p. 17–32, 2019.
- ELLING, A. A. Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species. **Phytopathology**, [S. l.], v. 103, n. 11, p. 1092–1102, 2013.
- ELLING, A. A.; JONES, J. T. Functional characterization of nematode effectors in plants. *In*: P., B.; J., J.; J., B. (org.). **Plant-Pathogen Interactions**. Totowa, NJ: Humana Press, 2014. p. 113–124.

ENVIROLOGIX. **QuickStix™ kit for LibertyLink® (bar) cotton leaf & seed.** [S. l.], 2007. Disponível em: <http://www.envirotest-china.com/uploads/soft/120222/1-120222110322.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2019.

EVES-VAN DEN AKKER, S. *et al.* Identification and characterisation of a hyper-variable apoplastic effector gene family of the potato cyst nematodes. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 1–14, 2014.

FAIRBAIRN, D. J. *et al.* Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes. **Planta**, [S. l.], v. 226, n. 6, p. 1525–1533, 2007.

FANELLI, E. *et al.* Analysis of chitin synthase function in a plant parasitic nematode, *Meloidogyne artiellia*, using RNAi. **Gene**, [S. l.], v. 349, p. 87–95, 2005.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematoides. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (org.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 168–201.

FINER, J. J.; MCMULLEN, M. D. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. **Plant Cell Reports**, [S. l.], v. 8, p. 586–589, 1990.

FIRE, A. *et al.* Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. **Development**, [S. l.], v. 113, n. 2, p. 503–514, 1991.

FIRE, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, [S. l.], v. 391, n. 6669, p. 806–811, 1998.

FIRE, A. RNA-triggered gene silencing. **Trends in Genetics**, [S. l.], v. 15, n. 9, p. 358–363, 1999.

FIROOZABADY, E. *et al.* Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, [S. l.], v. 10, p. 105–116, 1987.

FRAGOSO, R. D. R. *et al.* Isolation and characterization of a cDNA encoding a serine proteinase from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 110, n. 2, p. 123–133, 2005.

FRAGOSO, R. da R. *et al.* *Meloidogyne incognita*: molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a cathepsin D-like aspartic proteinase. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 121, n. 2, p. 115–123, 2009.

FULLER, V. L.; LILLEY, C. J.; URWIN, P. E. Nematode Resistance. **New Phytologist**, [S. l.], v. 180, p. 27–44, 2008.

GALBIERI, R.; ASMUS, G. L. Principais espécies de nematoides do algodoeiro no Brasil. In: GALBIERI, R.; BELOT, J. L. (org.). **Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle**. Cuiabá: Instituto Mato-grossense do Algodão - IMAmt, 2016. p. 11–36.

- GELVIN, S. B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “Gene-Jockeying” tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S. l.], v. 67, n. 1, p. 16–37, 2003.
- GHEYSEN, G.; MITCHUM, M. G. How nematodes manipulate plant development pathways for infection. **Current Opinion in Plant Biology**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 415–421, 2011.
- GHEYSEN, G.; MITCHUM, M. G. Phytoparasitic nematode control of plant hormone pathways. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 179, n. 4, p. 1212–1226, 2019.
- GLEASON, C. A.; LIU, Q. L.; WILLIAMSON, V. M. Silencing a candidate nematode effector gene corresponding to the tomato resistance gene *Mi-1* leads to acquisition of virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 576–585, 2008.
- GOODMAN, D. B.; DAVIS, W. L.; JONES, R. G. Glyoxylate cycle in toad urinary bladder: Possible stimulation by aldosterone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 77, n. 3, p. 1521–1525, 1980.
- GORDON, K. H. J.; WATERHOUSE, P. M. RNAi for insect-proof plants. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 25, n. 11, p. 1231–1232, 2007.
- GOUDA, B. P. *et al.* Impact of integrated pest management technologies in rainfed cotton and created job opportunities for rural youth and farm women in the Mysore district of Karnataka. **International Journal of Tropical Agriculture**, [S. l.], v. 32, n. 1/2, p. 105–108, 2014.
- GOULART, A. M. C. **Análise Nematológica: importância e princípios gerais**. Planaltina, DF: Embrapa, 2010.
- GRISHOK, A.; TABARA, H.; MELLO, C. C. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. **Science**, [S. l.], v. 287, n. 5462, p. 2494–2497, 2000.
- GROSSI-DE-SA, M. F. *et al.* **Compositions and methods for modifying gene expression using the promoter of ubiquitin conjugating protein coding gene of soybean plants**. US20100005539. Concessão: 2010.
- GROSSI-DE-SA, M. F. *et al.* **Expression cartridge for inducing resistance to multiple nematoid species in plants, method and plants using said expression cartridge**. WO2014/197951A2. Concessão: 2014.
- GROVER, C. E. *et al.* Molecular confirmation of species status for the allopolyploid cotton species, *Gossypium ekmanianum* Wittmack. **Genetic Resources and Crop Evolution**, [S. l.], v. 62, n. 1, p. 103–114, 2014.
- GRUNDLER, F.; SCHNIBBE, L.; WYSS, U. *In vitro* studies on the behaviour of second-stage juveniles of *Heterodera schachtii* (Nematoda: Heteroderidae) in response to host plant root exudates. **Parasitology**, [S. l.], v. 103, p. 149–155, 1991.
- GUAN, X.; SONG, Q.; CHEN, Z. J. Polyploidy and small RNA regulation of cotton fiber development. **Trends in Plant Science**, [S. l.], v. 19, n. 8, p. 516–528, 2014.

GUDYNAITE-SAVITCH, L.; JOHNSON, D. A.; MIKI, B. L. A. Strategies to mitigate transgene-promoter interactions. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 7, p. 472–485, 2009.

GUIMARAES, L. A. *et al.* *Ex vitro* hairy root induction in detached peanut leaves for plant-nematode interaction studies. **Plant Methods**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 1–10, 2017.

GUTIÉRREZ, O. A. *et al.* SSR markers closely associated with genes for resistance to root-knot nematode on chromosomes 11 and 14 of Upland cotton. **Theoretical and Applied Genetics**, [S. l.], v. 121, n. 7, p. 1323–1337, 2010.

HAEGEMAN, A.; JONES, J. T.; DANCHIN, E. G. J. Horizontal gene transfer in nematodes: a catalyst for plant parasitism? **The American Phytopathological Society**, [S. l.], v. 24, n. 8, p. 879–887, 2011.

HAMILTON, A. J.; BAULCOMBE, D. C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, [S. l.], v. 286, n. 5441, p. 950–952, 1999.

HAMMOND, S. M. *et al.* An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. **Nature**, [S. l.], v. 404, n. 6775, p. 293–296, 2000.

HAMMOND, S. M. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 579, n. 26, p. 5822–5829, 2005.

HE, Y. *et al.* Re-evaluation of the inheritance for root-knot nematode resistance in the Upland cotton germplasm line M-120 RNR revealed two epistatic QTLs conferring resistance. **Theoretical and Applied Genetics**, [S. l.], v. 127, n. 6, p. 1343–1351, 2014.

HERMSEN, J. G. T. Introgression of genes from wild species, including molecular and cellular approaches. *In*: BRADSHAW, J. E.; MACKAY, G. R. (org.). **Potato Genetics**. Wallingford, UK: CAB International, 1994. p. 515–538.

HERNANDEZ-GARCIA, C. M. *et al.* A soybean (*Glycine max*) polyubiquitin promoter gives strong constitutive expression in transgenic soybean. **Plant Cell Reports**, [S. l.], v. 28, n. 5, p. 837–849, 2009.

HERNANDEZ-GARCIA, C. M.; FINER, J. J. Identification and validation of promoters and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. **Plant Science**, [S. l.], v. 217–218, p. 109–119, 2014.

HOLMES, R. P. The absence of glyoxylate cycle enzymes in rodent and embryonic chick liver. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S. l.], v. 1158, p. 47–51, 1993.

HU, Y. *et al.* *Gossypium barbadense* and *Gossypium hirsutum* genomes provide insights into the origin and evolution of allotetraploid cotton. **Nature Genetics**, [S. l.], v. 51, p. 739–748, 2019.

HUANG, G. *et al.* A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S. l.], v. 16, n. 5, p. 376–381, 2003.

- HUANG, G. *et al.* Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, [S. l.], v. 103, n. 39, p. 14302–14306, 2006.
- HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, [S. l.], v. 57, n. 12, p. 1025–1028, 1973.
- HUSSEY, R. S.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J. Secrets in secretions: genes that control nematode parasitism of plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 183–194, 2002.
- HWANG, A. H. *et al.* *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **The Arabidopsis Book**, [S. l.], v. 15, p. 1–32, 2017.
- IBERKLEID, I. *et al.* Fatty acid-and retinol-binding protein, Mj-FAR-1 induces tomato host susceptibility to root-knot nematodes. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 5, p. 1–14, 2013.
- IBRAHIM, H. M. M. *et al.* Post-transcriptional gene silencing of root-knot nematode in transformed soybean roots. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 127, n. 1, p. 90–99, 2011.
- IBRAHIM, H. S. *et al.* Study the nematicidal efficiency of *Corchorus olitorius*, *Cinnamomum camphora*, *Portulaca oleraceae* and *Lantana camara* extracted saponins and their formulations on root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. **Nature and Science**, [S. l.], v. 12, n. 11, p. 40–45, 2014.
- IMAMT. **Ima 5801b2rf**. Mato Grosso, 2018. Disponível em: http://imamt.com.br/system/banners/imagems/42/original/folder_imamt_2018_VFinal.pdf?1550251992. Acesso em: 22 abr. 2020.
- ISAAA. **Global status of commercialized biotech/GM crops: 2016**. Ithaca, NY: ISAAA Brief, 2016. v. 52.
- ISAAA. **Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017: biotech crop adoption surges as economic benefits accumulate in 22 years**. Ithaca, NY, 2017. Disponível em: <http://isaaa.org/resources/publications/briefs/53/download/isaaa-brief-53-2017.pdf>. Acesso em: 30 maio. 2020.
- ISAAA. Global status of commercialized biotech/GM crops in 2018. *In*: 2019, Ithaca, NY. **ISAAA Brief No. 54**. Ithaca, NY: [s. n.], 2019.
- IZANT, J. G.; WEINTRAUB, H. Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. **Cell**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 1007–1015, 1984.
- JAOUANNET, M. *et al.* The root-knot nematode calreticulin *Mi-CRT* is a key effector in plant defense suppression. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 97–105, 2013.
- JAUBERT, S. *et al.* A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Febs Letters**, [S. l.], v. 522, n. 1–3, p. 109–112, 2002.

JOHN, M. E. Cotton crop improvement through genetic engineering. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 185–208, 1997.

JONES, J. D.; BURNETT, P.; ZOLLMAN, P. The glyoxylate cycle: does it function in the dormant or active bear? **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, [S. l.], v. 124, p. 177–179, 1999.

KAKRANA, A. *et al.* Identification, validation and utilization of novel nematode-responsive root-specific promoters in *Arabidopsis* for inducing host-delivered RNAi mediated root-knot nematode resistance. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 8, p. 2049, 2017.

KIAWU, J.; VALDES, C.; MACDONALD, S. Brazil's cotton industry. **United States Department of Agriculture**, [S. l.], p. 1–31, 2011.

KLINK, V. P. *et al.* 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**, [S. l.], v. 230, n. 1, p. 53–71, 2009.

KOCH, A.; KOGEL, K. H. New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 12, n. 7, p. 821–831, 2014.

KONAN, N. O. *et al.* Bridging classical and molecular cytogenetics of *Gossypium*. In: JORGENSEN, R. (org.). **Plant genetics and genomics: crops and models**. Athens, GA: Springer, 2009. p. 257–283.

KONDRASHOV, F. A. *et al.* Evolution of glyoxylate cycle enzymes in Metazoa: evidence of multiple horizontal transfer events and pseudogene formation. **Biology Direct**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 1–14, 2006.

KONDRASHOVA, M. N.; RODIONOVA, M. A. Realization of glyoxylate cycle in mitochondria of animal tissues. **Doklady Akademii Nauk**, [S. l.], v. 196, p. 1225–1227, 1971.

KUMAR, A. *et al.* Host-delivered RNAi-mediated root-knot nematode resistance in *Arabidopsis* by targeting *splicing factor* and *integrase* genes. **Journal of General Plant Pathology**, [S. l.], v. 83, n. 2, p. 91–97, 2017.

KUMAR, S.; DHINGRA, A.; DANIELL, H. Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. **Plant Molecular Biology**, [S. l.], v. 56, n. 2, p. 203–216, 2004.

KYNDT, T.; FERNANDEZ, D.; GHEYSEN, G. Plant-parasitic nematode infections in rice: molecular and cellular insights. **Annual Review of Phytopathology**, [S. l.], v. 52, n. 1, p. 135–153, 2014.

LI, C.; ZHANG, B. MicroRNAs in control of plant development. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 231, n. 2, p. 303–313, 2016.

LI, F. *et al.* Genome sequence of cultivated Upland cotton (*Gossypium hirsutum* TM-1) provides insights into genome evolution. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 524–530, 2015.

- LI, J. *et al.* Host-derived suppression of nematode reproductive and fitness genes decreases fecundity of *Heterodera glycines* Ichinohe. **Planta**, [S. l.], v. 232, n. 3, p. 775–785, 2010.
- LI, J. *et al.* Biotechnological application of functional genomics towards plant-parasitic nematode control. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 9, p. 936–944, 2011.
- LI, J.; TODD, T. C.; TRICK, H. N. Rapid *in planta* evaluation of root expressed transgenes in chimeric soybean plants. **Plant Cell Reports**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 113–123, 2010.
- LI, X. Q. *et al.* Resistance to root-knot nematode in tomato roots expressing a nematocidal *Bacillus thuringiensis* crystal protein. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 455–464, 2007.
- LI, Y. *et al.* Transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing a hairpin RNAi construct of a nematode *Rs-cps* gene exhibit enhanced resistance to *Radopholus similis*. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.
- LILLEY, C. J. *et al.* Cloning and characterisation of a *Heterodera glycines* aminopeptidase cDNA. **International Journal for Parasitology**, [S. l.], v. 35, n. 14, p. 1577–1585, 2005.
- LILLEY, C. J. *et al.* Recent progress in the development of RNA interference for plant parasitic nematodes. **Molecular Plant Pathology**, [S. l.], v. 8, n. 5, p. 701–711, 2007.
- LIN, B. *et al.* A novel effector protein *MJ-NULG1a* targeted to giant cell nuclei plays a role in *Meloidogyne javanica* parasitism. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 55–66, 2013.
- LIN, B. *et al.* A novel nematode effector suppresses plant immunity by activating host reactive oxygen species-scavenging system. **New Phytologist**, [S. l.], v. 209, n. 3, p. 1159–1173, 2016.
- LINS, P. C. **Caracterização funcional do promotor de soja *uces8.3***. 2015. - Universidade Católica de Brasília, [s. l.], 2015.
- LIU, F. *et al.* Silencing the *HaAK* gene by transgenic plant-mediated RNAi impairs larval growth of *Helicoverpa armigera*. **International Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 11, p. 67–74, 2015.
- LIU, J. F. *et al.* Biolistic transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with the *phyA* gene from *Aspergillus ficuum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [S. l.], v. 106, n. 2, p. 207–214, 2011.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LOURENÇO-TESSUTTI, I. T. *et al.* Knock-down of *heat-shock protein 90* and *isocitrate lyase* gene expression reduced root-knot nematode reproduction. **Phytopathology**, [S. l.], v. 105, n. 5, p. 628–637, 2015.

- MAGGENTI, A. R.; ALLEN, M. W. The origin of the gelatinous matrix in *Meloidogyne*. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 4–10, 1960.
- MANN, D. G. *et al.* Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) polyubiquitin gene (*PvUbi1* and *PvUbi2*) promoters for use *in plant* transformation. **BMC Biotechnology**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 74, 2011.
- MARTÍNEZ-MEDINA, A. *et al.* Shifting from priming of salicylic acid- to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. **New Phytologist**, [S. l.], v. 213, n. 3, p. 1363–1377, 2017.
- MCCARTER, J. P. *et al.* Analysis and functional classification of transcripts from the nematode *Meloidogyne incognita*. **Genome Biology**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. R26, 2003.
- MCCARTER, J. P. Molecular approaches toward resistance to plant-parasitic nematodes. *In*: BERG, R. H.; TAYLOR, C. G. (org.). **Cell Biology of Plant Nematode Parasitism**. 15. ed. St. Louis: Springer, 2009. p. 239–268.
- MCDONALD, M. B.; ELLIOT, L. J.; SWEENEY, P. M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science and Technology**, [S. l.], v. 22, p. 171–176, 1994.
- MEDINA, C. *et al.* Characterization of microRNAs from *Arabidopsis* galls highlights a role for *miR159* in the plant response to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **New Phytologist**, [S. l.], v. 3, n. 216, p. 882–896, 2017.
- MELLO, C. C.; CONTE JR, D. Revealing the world of RNA interference. **Nature**, [S. l.], v. 431, p. 338–342, 2004.
- METTE, M. F. *et al.* Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. **EMBO Journal**, [S. l.], v. 19, p. 5194–5201, 2000.
- MIRANDA, V. J. **Caracterização da expressão do gene codificador da enzima de conjugação a ubiquitina (E2) em soja inoculada com *Meloidogyne incognita* e infestada com *Anticarsia gemmatilis***. 2011. - Universidade de Brasília, [s. l.], 2011.
- MITKOWSKI, N. A.; ABAWI, G. S. **Nematoide das galhas**. [s. l.], 2003. Disponível em: <https://apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/Nematodes/Pages/RootknotNematodePort.aspx>. Acesso em: 3 jul. 2018.
- MOHR, S. E.; PERRIMON, N. RNAi screening: New approaches, understandings, and organisms. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 145–158, 2012.
- MOON, D. O. *et al.* Gossypol suppresses *NF-κB* activity and *NF-κB-related* gene expression in human leukemia U937 cells. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 264, n. 2, p. 192–200, 2008.
- MORESCO, E. R. Uso da cultura do trigo no controle de fitonematoides. *In*: MORESCO, E. R. **Comunicado Técnico**. Embrapa, 2016. p. 1–11.
- MORGUNOV, I. G. *et al.* Evidence of the glyoxylate cycle in the liver of newborn rats. **Medical Science Monitor**, [S. l.], v. 1, p. BR57-60, 2005.

- MOURRAIN, P. *et al.* A single transgene locus triggers both transcriptional and posttranscriptional silencing through double-stranded RNA production. **Planta**, [S. l.], v. 225, p. 365–379, 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, [S. l.], v. 15, p. 474–497, 1962.
- NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **the Plant Cell Online**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 279–289, 1990.
- NAVARRETE, M. *et al.* A resistant pepper used as a trap cover crop in vegetable production strongly decreases root-knot nematode infestation in soil. **Agronomy for Sustainable Development**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 1–12, 2016.
- NELLEN, W.; LICHTENSTEIN, C. What makes an mRNA anti-sensi-itive? **Trends in Biochemical Sciences**, [S. l.], v. 18, n. 11, p. 419–423, 1993.
- NEVES, M. F.; PINTO, M. J. A. **A cadeia do algodão brasileiro**. 3. ed. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2017.
- NEVEU, C.; ABAD, P.; CASTAGNONE-SERENO, P. Molecular cloning and characterization of an intestinal cathepsin L protease from the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [S. l.], v. 63, n. 3, p. 159–165, 2003.
- NGUYEN, C. N. *et al.* A root-knot nematode small glycine and cysteine-rich secreted effector, *MiSGCR1*, is involved in plant parasitism. **New Phytologist**, [S. l.], v. 217, n. 2, p. 687–699, 2018.
- NIU, J. *et al.* RNAi silencing of the *Meloidogyne incognita Rpn7* gene reduces nematode parasitic success. **European Journal of Plant Pathology**, [S. l.], v. 134, n. 1, p. 131–144, 2012.
- NIU, J. *et al.* *Msp40* effector of root-knot nematode manipulates plant immunity to facilitate parasitism. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, p. 1–13, 2016.
- NOE, J. P. Nematoides parasitas de plantas. In: TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S. (org.). **Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 83–96.
- NTALLI, N. *et al.* Acetic acid, 2-undecanone, and (E)-2-decenal ultrastructural malformations on *Meloidogyne incognita*. **Journal of nematology**, [S. l.], v. 48, n. 4, p. 248–260, 2016.
- O'RIORDAN, V. B.; BURNELL, A. M. Intermediary metabolism in the dauer larva of the nematode *Caenorhabditis elegans-II*. The glyoxylate cycle and fatty-acid oxidation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, [S. l.], v. 95, n. 1, p. 125–130, 1990.

- ODELL, J. T.; NAGY, F.; CHUA, N. H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**, [S. l.], v. 313, p. 810–812, 1985.
- OERKE, E. C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, [S. l.], v. 144, p. 31–42, 2006.
- OPPERMAN, C. H. *et al.* Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: a compact nematode genome for plant parasitism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 105, n. 39, p. 14802–14807, 2008.
- PAN, X. *et al.* MicroRNA-target gene responses to root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) infection in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Genomics**, [S. l.], v. 111, n. 3, p. 383–390, 2019.
- PAPOLU, P. K. *et al.* Utility of host delivered RNAi of two FMRF amide like peptides, flp-14 and flp-18, for the management of root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 11, p. 1–16, 2013.
- PASSEY, R. F.; FAIRBAIRN, D. The conversion of fat to carbohydrate during embryonation of *Ascaris* eggs. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 35, n. 7, p. 511–525, 1957.
- PATEL, T. R.; MCFADDEN, B. A. Particulate isocitrate lyase and malate synthase in *Caenorhabditis elegans*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 183, n. 1, p. 24–30, 1977.
- PATERNIANI, E. Agricultura sustentável nos trópicos. **Estudos Avançados**, [S. l.], v. 15, n. 43, p. 303–326, 2001.
- PATERSON, A. H. *et al.* Repeated polyploidization of *Gossypium* genomes and the evolution of spinnable cotton fibres. **Nature**, [S. l.], v. 492, n. 7429, p. 423–427, 2012.
- PEREMARTI, A. *et al.* Promoter diversity in multigene transformation. **Plant Molecular Biology**, [S. l.], v. 73, n. 4, p. 363–378, 2010.
- PERRIMON, N.; NI, J.; PERKINS, L. *In vivo* RNAi: Today and Tomorrow *in vivo* RNAi: Today and Tomorrow. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [S. l.], v. 2, n. 8, p. 1–11, 2010.
- PERRY, R. N.; MOENS, M. Introduction to plant-parasitic nematodes: modes of parasitism. *In*: JONES, J.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. (org.). **Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions**. New York: Springer, 2011. p. 3–20.
- PICKERSGILL, B. Domestication of plants in the americas: insights from mendelian and molecular genetics. **Annals of Botany**, [S. l.], v. 100, p. 925–940, 2007.
- PIYA, S.; BINDER, B. M.; HEWEZI, T. Canonical and noncanonical ethylene signaling pathways that regulate *Arabidopsis* susceptibility to the cyst nematode *Heterodera schachtii*. **New Phytologist**, [S. l.], v. 221, n. 2, p. 946–959, 2019.

POPOV, V. N. *et al.* Induction of a peroxisomal malate dehydrogenase isoform in liver of starved rats. **Biochemistry**, [S. l.], v. 66, p. 496–501, 2001.

PORTO, A. *Gossypium hirsutum* L. [S. l.], 2016. Disponível em: https://www.tudosobreplantas.com.br/asp/plantas/ficha.asp?id_planta=29213. Acesso em: 25 maio. 2018.

POTENZA, C.; ALEMAN, L.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used *in plant* transformation. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, [S. l.], v. 40, p. 1–22, 2004.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria, 2017. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 24 jun. 2020.

RANCUREL, C. *et al.* SATQPCR: Website for statistical analysis of real-time quantitative PCR data. **Molecular and Cellular Probes**, [S. l.], v. 46, p. 1–2, 2019.

RECH, E. L.; VIANNA, G.; ARAGÃO, F. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nature protocols**, [S. l.], v. 3, p. 410–418, 2008.

REHMAN, S.; GUPTA, V. K.; GOYAL, A. K. Identification and functional analysis of secreted effectors from phytoparasitic nematodes. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 16, n. 48, p. 1–18, 2016.

RENNY-BYFIELD, S. *et al.* Ancient gene duplicates in *Gossypium* (cotton) exhibit near-complete expression divergence. **Genome Biology and Evolution**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 559–571, 2014.

REVERSAT, G. Consumption of food reserves by starved second-stage juveniles of *Meloidogyne Javanica* under conditions inducing osmobiosis. **Nematologica**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 207–214, 1981.

RIBEIRO, T. P. *et al.* Transgenic cotton expressing *Cry10Aa* toxin confers high resistance to the cotton boll weevil. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 15, n. 8, p. 997–1009, 2017.

RODERICK, H.; URWIN, P. E.; ATKINSON, H. J. Rational design of biosafe crop resistance to a range of nematodes using RNA interference. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 520–529, 2018.

ROMANO, A. *et al.* Expression of poly-3-(R)-hydroxyalkanoate (PHA) polymerase and acyl-CoA-transacylase in plastids of transgenic potato leads to the synthesis of a hydrophobic polymer, presumably medium-chain-length PHAs. **Planta**, [S. l.], v. 220, n. 3, p. 455–464, 2005.

ROSSO, M. *et al.* Application of RNA interference to root-knot nematode genes encoding esophageal gland proteins. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S. l.], v. 18, n. 7, p. 615–620, 2005.

ROSSO, M. N. *et al.* Isolation of a cDNA encoding a beta-1,4-endoglucanase in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and expression analysis during plant parasitism. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S. l.], v. 12, n. 7, p. 585–591, 1999.

- ROSSO, M. N.; JONES, J. T.; ABAD, P. RNAi and functional genomics in plant parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, [S. l.], v. 47, p. 207–232, 2009.
- ROTHSTEIN, M.; MAYOH, H. Glycine synthesis and isocitrate lyase in the nematode, *Caenorhabditis Briggsae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 14, p. 43–47, 1964.
- ROVERE, C. V.; DEL VAS, M.; HOPP, H. E. RNA-mediated virus resistance. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 167–172, 2002.
- RUTTER, W. B. *et al.* Mining novel effector proteins from the esophageal gland cells of *Meloidogyne incognita*. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, [S. l.], v. 27, n. 9, p. 965–974, 2014.
- SAKHANOKHO, H. F. *et al.* Putrescine enhances somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [S. l.], v. 81, n. 1, p. 91–95, 2005.
- SATO, K.; KADOTA, Y.; SHIRASU, K. Plant immune responses to parasitic nematodes. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 10, n. September, p. 1–14, 2019.
- SEN, G. L.; BLAU, H. M. A brief history of RNAi: the silence of the genes. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 20, n. 9, p. 1293–1299, 2006.
- SHEN, X. *et al.* QTL mapping for resistance to root-knot nematodes in the M-120 RNR Upland cotton line (*Gossypium hirsutum* L.) of the Auburn 623 RNR source. **Theoretical and Applied Genetics**, [S. l.], v. 113, n. 8, p. 1539–1549, 2006.
- SHIN, H. *et al.* Transcriptome analysis for *Caenorhabditis elegans* based on novel expressed sequence tags. **BMC Biology**, [S. l.], v. 6, n. 30, p. 1–14, 2008.
- SHINGLES, J. *et al.* *Meloidogyne incognita*: Molecular and biochemical characterisation of a cathepsin L cysteine proteinase and the effect on parasitism following RNAi. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 115, n. 2, p. 114–120, 2007.
- SHIVAKUMARA, T. N. *et al.* Host-induced silencing of two pharyngeal gland genes conferred transcriptional alteration of cell wall-modifying enzymes of *Meloidogyne incognita* vis-à-vis perturbed nematode infectivity in eggplant. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 8, n. March, p. 1–14, 2017.
- SINDHU, A. S. *et al.* Effective and specific in planta RNAi in cyst nematodes: expression interference of four parasitism genes reduces parasitic success. **Journal of Experimental Botany**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 315–324, 2009.
- SINGH, S.; SINGH, B.; SINGH, A. P. Nematodes: a threat to sustainability of agriculture. **Procedia Environmental Sciences**, [S. l.], v. 29, p. 215–216, 2015.
- SIOMI, H.; SIOMI, M. C. On the road to reading the RNA-interference code. **Nature**, [S. l.], v. 457, n. 7228, p. 396–404, 2009.

- SOUZA, D. S. L. *et al.* Ectopic expression of a *Meloidogyne incognita* dorsal gland protein in tobacco accelerates the formation of the nematode feeding site. **Plant Science**, [S. l.], v. 180, n. 2, p. 276–282, 2011.
- SOUZA JÚNIOR, J. D. A. de *et al.* Knocking-down *Meloidogyne incognita* proteases by plant-delivered dsRNA has negative pleiotropic effect on nematode vigor. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 12, p. 1–17, 2013.
- SOUZA, L. R. **A cultura do algodão no rio grande do norte na década de 1970**. 1996. - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, [s. l.], 1996.
- STARR, J. L. Cotton. In: BARKER, K. R.; PEDERSON, G. A.; WINDHAN, G. L. (org.). **Plant and nematode interaction**. Madison, Estados Unidos: american society of agronomy, 1998. p. 359–379.
- STARR, J. L. *et al.* The future of nematode management in cotton. **Journal of Nematology**, [S. l.], v. 39, n. 4, p. 283–294, 2007.
- STARR, J. L.; BRIDGE, J.; COOK, R. Resistance to plant-parasitic nematodes: history, current use and future potential. In: STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (org.). **Plant resistance to parasitic nematodes**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 1–22.
- STEEVES, R. M. *et al.* Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction. **Functional Plant Biology**, [S. l.], v. 33, n. 11, p. 991–999, 2006.
- SUN, Y. *et al.* Somatic embryogenesis and plant regeneration from different wild diploid cotton (*Gossypium*) species. **Plant Cell Reports**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 289–296, 2006.
- THOMPSON, C. J. *et al.* Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. **The EMBO Journal**, [S. l.], v. 6, n. 9, p. 2519–2523, 1987.
- TIAN, B. *et al.* Host-derived artificial microRNA as an alternative method to improve soybean resistance to soybean cyst nematode. **Genes**, [S. l.], v. 7, n. 12, 2016.
- TIAN, B. *et al.* Host-derived gene silencing of parasite fitness genes improves resistance to soybean cyst nematodes in stable transgenic soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, [S. l.], v. 132, n. 9, p. 2651–2662, 2019.
- TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1993.
- TIMMONS, L.; FIRE, A. Specific interference by ingested dsRNA. **Nature**, [S. l.], v. 395, n. 6705, p. 854, 1998.
- TIZAOUI, K.; KCHOUK, M. E. Genetic approaches for studying transgene inheritance and genetic recombination in three successive generations of transformed tobacco. **Genetics and Molecular Biology**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 640–649, 2012.
- TOMALOVA, I. *et al.* The *map-1* gene family in root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp.: A set of taxonomically restricted genes specific to clonal species. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 6, p. 1–9, 2012.

TOMCZAK, A. *et al.* Resistant plant responses. *In*: ROBINSON, D. G.; NICK, P. (org.). **Plant Cell Monographs**. Berlin: Springer, 2008. p. 1–31.

TORT, J. *et al.* Proteinases and associated genes of parasitic helminths. **Advances in parasitology**, [*S. l.*], v. 43, p. 161–266, 1999.

TRUDGILL, D. L.; BLOK, V. C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, [*S. l.*], v. 39, n. 1, p. 53–77, 2001.

TWYMAN, R. M. Growth and development: control of gene expression, regulation of transcription. *In*: THOMAS, B.; MURPHY, D. J.; MURRAY, B. . (org.). **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**. Londres: Elsevier Science, 2003. p. 558–567.

UMBECK, P. *et al.* Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. **Nature**, [*S. l.*], v. 5, p. 263–266, 1987.

URWIN, P. E. *et al.* Continual green-fluorescent protein monitoring of cauliflower mosaic virus 35S promoter activity in nematode-induced feeding cells in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, [*S. l.*], v. 10, n. 3, p. 394–400, 1997a.

URWIN, P. E. *et al.* Characterization of two cDNAs encoding cysteine proteinases from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. **Parasitology**, [*S. l.*], v. 114, n. 6, p. 605–613, 1997b.

URWIN, P. E. *et al.* Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. **The plant journal**, [*S. l.*], v. 12, n. 2, p. 455–461, 1997c.

URWIN, P. E.; GREEN, J.; ATKINSON, H. J. Expression of a plant cystatin confers partial resistance to *Globodera*, full resistance is achieved by pyramiding a cystatin with natural resistance. **Molecular Breeding**, [*S. l.*], v. 12, n. 3, p. 263–269, 2003.

URWIN, P. E.; LILLEY, C. J.; ATKINSON, H. J. Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, [*S. l.*], v. 15, n. 8, p. 747–752, 2002.

VAIN, P. *et al.* Expression of an engineered cysteine proteinase inhibitor (Oryzacystatin-I delta D86) for nematode resistance in transgenic rice plants. **Agris**, [*S. l.*], v. 96, n. 2, p. 266–271, 1998.

VAN BLOKLAND, R. *et al.* Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. **The Plant Journal**, [*S. l.*], v. 6, n. 6, p. 861–877, 1994.

VIANA, A. A. *et al.* Isolation and functional characterization of a cotton ubiquitination-related promoter and 5'UTR that drives high levels of expression in root and flower tissues. **BMC Biotechnology**, [*S. l.*], v. 11, p. 1–11, 2011.

VOINNET, O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. **Trends in Genetics**, [*S. l.*], v. 17, n. 8, p. 449–459, 2001.

- VRAIN, T. C. A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inocula. **Journal of Nematology**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 249–250, 1977.
- WADSWORTH, W. G.; RIDDLE, D. L. Developmental regulation of energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, [S. l.], v. 132, p. 167–173, 1989.
- WALAWAGE, S. L. *et al.* Stacking resistance to crown gall and nematodes in walnut rootstocks. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 1, 2013.
- WANG, C.; MASLER, E.; ROGERS, S. Responses of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne incognita* infective juveniles to root tissues, root exudates, and root extracts from three plant species. **Plant Disease**, [S. l.], v. 102, n. 9, p. 1–31, 2018.
- WANG, J. O. J. Rice ubiquitin promoters: deletion analysis and potential usefulness in plant transformation systems. **Plant Cell Reports**, [S. l.], v. 22, p. 129–134, 2003.
- WANG, M. *et al.* Reference genome sequences of two cultivated allotetraploid cottons, *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*. **Nature Genetics**, [S. l.], v. 51, p. 224–229, 2019.
- WANG, P. *et al.* High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system. **Plant Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 137–150, 2018.
- WATERHOUSE, P. M.; GRAHAM, M. W.; WANG, M.-B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 95, n. 23, p. 13959–13964, 1998.
- WATERHOUSE, P. M.; WANG, M.; LOUGH, T. Defence against viruses. **Nature**, [S. l.], v. 411, p. 834–842, 2001.
- WENDEL, J. F. *et al.* Genetic diversity in *Gossypium hirsutum* and the origin of upland cotton. **American Journal of Botany**, [S. l.], v. 79, n. 11, p. 1291–1310, 1992.
- WENDEL, J. F. *et al.* Evolution and natural history of the cotton genus. In: PARTERSON, A. H. (org.). **Genetics And Genomics Of Cotton**. New York: Springer, 2009. p. 2–22.
- WILKINS, T. A.; MISHRA, R.; TROLINDER, N. L. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of cotton. **Journal of Food Agriculture and Environment**, [S. l.], p. 179–187, 2004.
- WILKINS, T. A.; RAJASEKARAN, K.; ANDERSON, D. M. Cotton biotechnology. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 511–550, 2000.
- WILLIAMSON, V. M.; GLEASON, C. A. Plant-nematode interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 327–333, 2003.
- WILLIAMSON, V. M.; KUMAR, A. Nematode resistance in plants: the battle underground. **Trends in Genetics**, [S. l.], v. 22, n. 7, p. 396–403, 2006.

- WINTER, J. *et al.* Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature Cell Biology**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 228–234, 2009.
- WRIGHT, R. J.; NIU, C.; NGUYEN, B. Bridging classical and molecular genetics of cotton disease resistance. In: JORGENSEN, R. A. (org.). **Plant Genetics and Genomics: Crops and Models**. Athens, GA: Springer, 2009. v. 3p. 313–336.
- XIE, J. *et al.* A novel *Meloidogyne incognita* effector *Misp12* suppresses plant defense response at latter stages of nematode parasitism. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 7, p. 1–12, 2016.
- XUE, B. *et al.* The *8D05* parasitism gene of *Meloidogyne incognita* is required for successful infection of host roots. **Phytopathology**, [S. l.], v. 103, n. 2, p. 175–181, 2013.
- YADAV, B. C.; VELUTHAMBI, K.; SUBRAMANIAM, K. Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [S. l.], v. 148, n. 2, p. 219–222, 2006.
- YANG, X. *et al.* Analysis of the copy number of exogenous genes in transgenic cotton using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **African Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 23, n. 11, p. 6226–6233, 2012.
- YANG, Y. *et al.* Molecular characteristics and efficacy of *16D10* siRNAs in inhibiting root-knot nematode infection in transgenic grape hairy roots. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 1–13, 2013.
- YIN, Z.; PLÄDER, W.; MALEPSZY, S. Transgene inheritance in plants. **Journal of Applied Genetics**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 127–144, 2004.
- YOO, S. Y. *et al.* The *35S* promoter used in a selectable marker gene of a plant transformation vector affects the expression of the transgene. **Planta**, [S. l.], v. 221, n. 4, p. 523–530, 2005.
- YU, J. *et al.* CottonGen: a genomics, genetics and breeding database for cotton research. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 42, p. 1229–1236, 2014.
- ZÄHLER, A. Pre-mRNA splicing and its regulation in *Caenorhabditis elegans*. In: BLUMENTHAL, T. (org.). **WormBook: the online review of C. elegans biology**. Pasadena, CA: WormBook, 2012. p. 1–21.
- ZHANG, F. *et al.* *In vitro* uptake of 140 kDa *Bacillus thuringiensis* nematicidal crystal proteins by the second stage juvenile of *Meloidogyne hapla*. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 6, 2012.
- ZHANG, J.; HONG, Y. Investigating transgene integration and organization in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genome. In: ZHANG, B. (org.). **Methods in Molecular Biology**. 1. ed. Greenville: Humana Press, 2013. v. 958p. 95–107.
- ZHANG, T. *et al.* Sequencing of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. acc. TM-1) provides a resource for fiber improvement. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 531–537, 2015.

ZHAO, S.; FERNALD, R. D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Computational Biology**, [*S. l.*], v. 12, n. 8, p. 1047–1064, 2005.

18 ARQUIVOS SUPLEMENTARES

Tabela S1 – Genes alvo de fitonematoides estudados pelo uso da tecnologia de silenciamento gênico (RNAi) envolvidos na infecção e/ou no seu desenvolvimento.

Gene alvo	Espécie	Método de ingestão	Planta hospedeira	Tempo de infecção	Fenótipo observado	Referência
<i>hgcp-1</i>	<i>H. glycines</i>	<i>Soaking</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	14 DAI	Redução de 41% no n° de nematoides Redução de 50% no tamanho das fêmeas	Urwin, Lilley e Atkinson (2002)
<i>pMiDuox1</i>	<i>M. incognita</i>	<i>Soaking</i>	<i>Phaseolus angularis</i>	14 DAI	Redução de 70% no n° de nematoides	Baketia <i>et al.</i> (2005)
<i>Gr-eng-1</i>	<i>G. rostochiensis</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. tuberosum</i>	14 DAI	Redução de 50% no n° de nematoides	Chen <i>et al.</i> (2005)
<i>Gr-ams-1</i>	<i>G. rostochiensis</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. tuberosum</i>	14 DAI	Capacidade reduzida de localizar e invadir raízes	Chen <i>et al.</i> (2005)
Quitina sintase (AW871671)	<i>M. artiellia</i>	<i>Soaking</i>	<i>Triticum aestivum</i>	15 DAI	Atividade atrasada do surgimento de J2	Fanelli <i>et al.</i> (2005)
<i>Hg-amp-1</i>	<i>H. glycines</i>	<i>Soaking</i>	<i>G. max</i>	14 DAI	Redução de 61% no n° de fêmeas	Lilley <i>et al.</i> (2005)
<i>16D10</i>	<i>M. incognita</i>	<i>Soaking</i>	<i>A. thaliana</i>	13 DAI	Redução de 74-81% no n° de nematoides	Huang <i>et al.</i> (2006)
<i>16D10</i>	<i>M. arenaria</i> <i>M. incognita</i> <i>M. javanica</i> <i>M. hapla</i> <i>M. arenaria</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	13 DAI	Redução de 63-90% no n° de galhas e tamanho da galha Redução de 69-93% no n° de ovos	Huang <i>et al.</i> (2006)
<i>MSP</i>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	56 DAI	Redução de 49% no n° de nematoides Redução de até 68% de ovos	Steeves <i>et al.</i> (2006)

Integrase (AW871671)	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>Tabaco</i>	45 DAI	Redução de 90% no n° de nematoides	Yadav, Veluthambi e Subramaniam (2006)
<i>Mi-fs</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>Tabaco</i>	45 DAI	Redução de 92% no n° de galhas	Yadav, Veluthambi e Subramaniam (2006)
<i>hg-syv46</i>	<i>H. glycines</i>	<i>Soaking</i>	<i>G. max</i>	10 DAI	Redução no n° de nematoides Redução no tamanho de fêmeas	Bakhetia, Urwin e Atkinson (2007)
<i>Mi-gsts-1</i>	<i>M. incognita</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. lycopersicum</i>	42 DAI	Redução no número de massa de ovos	Dubreuil <i>et al.</i> (2007)
<i>MjTIS-11</i>	<i>M. javanica</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	42 DAI	Nenhum efeito no fenótipo	Fairbairn <i>et al.</i> (2007)
<i>Mi-cpl-1</i>	<i>M. incognita</i>	<i>Soaking</i>	<i>P. angularis</i>	21 DAI	Redução de 60% no n° de nematoides	Shingles <i>et al.</i> (2007)
<i>Hg-rps-3a</i>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	30 DAI	Redução de 87% no n° de fêmeas	Klink <i>et al.</i> (2009)
<i>Hg-rps-4</i>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	30 DAI	Redução de 81% no n° de fêmeas	Klink <i>et al.</i> (2009)
<i>Hg-spk-1</i>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	30 DAI	Redução de 88% no n° de fêmeas	Klink <i>et al.</i> (2009)
<i>Hg-snb-1</i>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	30 DAI	Redução de 93% no n° de fêmeas	Klink <i>et al.</i> (2009)
<i>8H07</i>	<i>H. schactii</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	14 DAI	Redução de 50% no n° de fêmeas	Sindhu <i>et al.</i> (2009)
<i>10A06</i>	<i>H. schactii</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	14 DAI	Redução de 42% no n° de fêmeas	Sindhu <i>et al.</i> (2009)
<i>3B05</i>	<i>H. schactii</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	14 DAI	Redução de 12-47% no n° de fêmeas	Sindhu <i>et al.</i> (2009)
<i>4G06</i>	<i>H. schactii</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	14 DAI	Redução de 3-64% no n° de fêmeas	Sindhu <i>et al.</i> (2009)

<i>Misc3</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	20 DAI	Redução de 52-61% no nº de nematoídes Redução no tamanho de fêmeas	Charlton <i>et al.</i> (2010)
<i>Cpn-1</i>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	35 DAI	Redução de 95% de ovos	Li <i>et al.</i> (2010)
<i>Prp-17</i>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	35 DAI	Redução de 79% de ovos	Li <i>et al.</i> (2010)
<i>Y25</i>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	35 DAI	Redução de 81% de ovos	Li <i>et al.</i> (2010); Li, Todd e Trick (2010)
<i>Tp</i> (tirosina fosfatase)	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	38 DAI	Redução de 92% no nº de galhas Redução de 5,4 vezes no diâmetro de fêmeas	Ibrahim <i>et al.</i> (2011)
<i>MSP</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	38 DAI	Redução de 94,7% no nº de galhas Redução de 6,5 vezes no diâmetro de fêmeas	Ibrahim <i>et al.</i> (2011)
<i>Mi-Rpn7</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>S. lycopersicum</i>	40 DAI	Redução de 34% no nº de massa de ovos Redução de até 50,8% de ovos	Niu <i>et al.</i> (2012)
<i>Minc03866</i>	<i>M. incognita</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. lycopersicum</i>	21 DAI	Redução de 41,2% no nº de galhas Redução de 50,3% no nº de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Minc03313</i>	<i>M. incognita</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. lycopersicum</i>	21 DAI	Redução de 57,8% no nº de galhas Redução de 53,2% no nº de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Minc01632</i>	<i>M. incognita</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. lycopersicum</i>	21 DAI	Redução de 57,7% no nº de galhas Redução de 70,1% no nº de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)

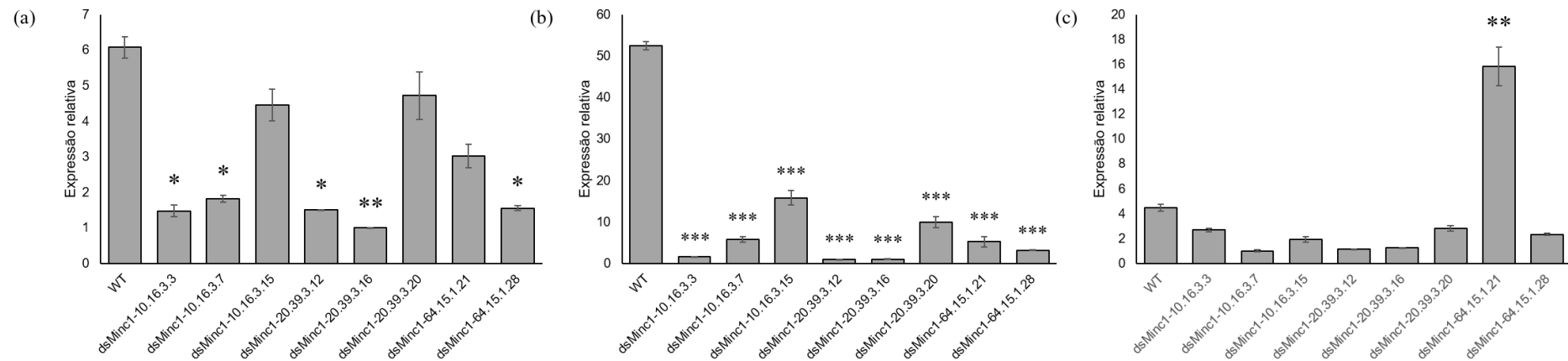
<i>Minc05001</i>	<i>M. incognita</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. lycopersicum</i>	21 DAI	Redução de 51,5% no n° de galhas Redução de 71,1% no n° de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Minc08013</i>	<i>M. incognita</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. lycopersicum</i>	21 DAI	Redução de 44,5% no n° de galhas Redução de 54% no n° de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Minc02483</i>	<i>M. incognita</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. lycopersicum</i>	21 DAI	Redução de 54,4% no n° de galhas Redução de 60,9% no n° de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Minc08335</i>	<i>M. incognita</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. lycopersicum</i>	21 DAI	Redução de 60,8% no n° de galhas Redução de 56% no n° de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Minc17713</i>	<i>M. incognita</i>	<i>Soaking</i>	<i>S. lycopersicum</i>	21 DAI	Redução de 53,5% no n° de galhas Redução de 64,2% no n° de ovos	Danchin <i>et al.</i> (2013)
<i>Mj-far-1</i>	<i>M. javanica</i>	<i>In planta</i>	<i>S. lycopersicum</i>	15 e 28 DAI	Redução do desenvolvimento de nematoides Redução no número de células gigantes	Iberkleid <i>et al.</i> (2013)
<i>Mi-CRT</i> (<i>Minc06693</i>)	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	56 DAI	Redução de 80% no n° de galhas	Jaouannet <i>et al.</i> (2013)
<i>Mj-NULG1a</i>	<i>M. javanica</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	18 e 42 DAI	Redução de 72,7-88,8% no n° de nematoides	Lin <i>et al.</i> (2013)
<i>flp-14</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	30 DAI	Redução de 50-103% no n° de fêmeas Redução de 28-57% no n° de massa de ovos	Papolu <i>et al.</i> (2013)

<i>flp-18</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	30 DAI	Redução de 43-59% no nº de fêmeas Redução de 15-50% no nº de massa de ovos	Papolu <i>et al.</i> (2013)
<i>Mi-ser-1</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	45 DAI	Redução de 30% no nº de ovos Redução de 48% no nº de J2 eclodidos	Souza Júnior <i>et al.</i> (2013)
<i>Mi-cpl-1</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	45 DAI	Redução de 45% no número de galhas Redução de 32% no nº de massa de ovos Redução de 42% no nº de ovos	Souza Júnior <i>et al.</i> (2013)
<i>Pv010</i>	<i>P. vulnus</i>	<i>In planta</i>	<i>Juglans hindsii x J. regia</i>	60 DAI	Redução de 70% no nº de nematoides	Walawage <i>et al.</i> (2013)
<i>Mi8D05</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	56 DAI	Redução de 90% no nº de galhas	Xue <i>et al.</i> (2013)
<i>16D10</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>Vitis vinifera</i>	35 DAI	Menor suscetibilidade à infecção por nematoides	Yang <i>et al.</i> (2013)
<i>Mc16D10L</i>	<i>M. chitwoodi</i>	<i>In planta</i>	<i>Batata</i>	35 e 55 DAI	Redução de 68% no nº de massa de ovos Redução de 65% no nº de ovos	Dinh <i>et al.</i> (2014a)
<i>Mc16D10L</i>	<i>M. chitwoodi</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana e batata</i>	35 e 55 DAI	Redução de 63% no nº de massa de ovos Redução de 65% no nº de ovos	Dinh <i>et al.</i> (2014b)
<i>Gp-hyp-1</i>	<i>G. pallida</i>	<i>In planta</i>	<i>S. tuberosum</i>	14 DAI	Redução de 50-60% no nº de nematoides	Eves-van den Akker <i>et al.</i> (2014)

<i>Mi-icl</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>N. tabacum</i>	45 DAI	Redução de até 65% no n° de ovos	Lourenço-tessutti <i>et al.</i> (2015)
<i>J15</i>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	35 DAI	Redução de 28% no n° de nematoides Redução de até 53% no n° de ovos	Tian <i>et al.</i> (2016)
<i>MjTTL5</i>	<i>M. javanica</i>	<i>In planta</i>	<i>S. tuberosum</i>	42 DAI	Redução de 34–37,5% no n° de fêmeas	Lin <i>et al.</i> (2016)
<i>MiMsp40</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	49 DAI	Redução de 35,4-50,9% no n° de galhas Redução de 13,8-18,3% no n° de massa de ovos	Niu <i>et al.</i> (2016)
<i>J20</i>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	35 DAI	Redução de 24% no n° de nematoides Redução de até 23% no n° de ovos	Tian <i>et al.</i> (2016)
<i>J23</i>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	35 DAI	Redução de 43% no n° de nematoides Redução de até 47% no n° de ovos	Tian <i>et al.</i> (2016)
<i>Misp12</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>N. benthamiana</i>	45 DAI	Redução de 68% no n° de fêmeas Redução de 63% dos ovos de nematoides	Xie <i>et al.</i> (2016)
<i>MgGPP</i>	<i>M. graminicola</i>	<i>In planta</i>	<i>O. sativa</i>	12 DAI	Redução de 50%-72,2% no n° de fêmeas	Chen <i>et al.</i> (2017)
<i>At1g74770</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>A. thaliana</i>	21 DAI	Redução de 32% no n° de galhas	Kakrana <i>et al.</i> (2017)
<i>Rs-cps</i>	<i>R. similis</i>	<i>In planta</i>	<i>N. benthamiana</i>	70 DAI	Redução de 68% na eclosão dos ovos	Li <i>et al.</i> (2017)
<i>Minc18876</i>	<i>M. incognita</i>	<i>Soaking</i>	<i>N. benthamiana</i>	42 DAI	Redução de 60% no n° de galhas	Nguyen <i>et al.</i> (2018)

<i>Mi-msp-1</i>	<i>M. incognita</i>	<i>In planta</i>	<i>S. melongena</i>	30 DAI	Redução de 60% no n° de ovos Redução de 33,8–46,9% no n° de galhas Redução de 41–51,2% no n° de massa de ovos	Chaudhary <i>et al.</i> (2019)
<i>HgPrp17</i>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	35 DAI	Redução de até 72% no n° de ovos	Tian <i>et al.</i> (2019)
<i>HgY25</i>	<i>H. glycines</i>	<i>In planta</i>	<i>G. max</i>	35 DAI	Redução de até 59% no n° de ovos	Tian <i>et al.</i> (2019)

Figura S1 - Caracterização dos níveis relativos de acúmulo de transcritos por RT-qPCR dos genes presentes no *dsMinc1* de galhas de *M. incognita*, coletados de plantas de algodão GM T₃ e WT. (a) expressão relativa do gene *Mi-cpl*; (b) expressão relativa do gene *Mi-icl*; (c) expressão relativa do gene *Mi-fs*. As barras indicam os erros padrão dos dados médios (n = 3). Diferenças significativas foram avaliadas pelo teste de Tukey, onde a expressão gênica de *Mi-cpl*, *Mi-icl* e *Mi-fs* em galhas de diferentes linhagens de plantas de algodão foram comparadas às plantas controle WT (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).



19 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1 – **Rodrigues-Silva, PL**; Fernandez, PBB; Rodrigues, MT; Mendonça, ML; Figueiredo, LHM; Grossi-de-Sa, MF (2020). Tendências no conhecimento e aplicações biotecnológicas do *Psidium guineense* evidenciadas pelo monitoramento tecnológico. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**. Submetido.

2 – Basso, MF; Costa, JA; Ribeiro, TP; Amorim, RMS; Lourenço-Tessutti, IT; Macedo, AF; Neves, MR; Nardeli, SM; Arge, LW; Aucique Perez, CEA; **Rodrigues-Silva, PL**; Macedo, LLP; Lisei-de-Sa, ME; Campos-Pinto, ER; Silva, MCM; Morgante, CV; Floh, EIS; Alves-Ferreira, M; Grossi-de-Sa, MF (2020). Overexpression of the *Coffea arabica* *CaHB12* transcription factor (HD-Zip I subfamily) in cotton improves drought tolerance. **PLANTA**. Submetido.

3 – **Rodrigues-Silva, PL**; Amorim, GC; Andrade, IEPC; Cunha, VA; Figueiredo, LHM; Grossi-de-Sa, MF (2020). Prospecção científica e tecnológica da cagaita (*Eugenia dysenterica*): competências biotecnológicas. Em processo para submissão a **Cadernos de Prospecção**.

4 – Lisei-de-Sa, ME[§]; **Rodrigues-Silva, PL**[§]; Morgante, CV; Lourenço-Tessutti, IT; Arraes, FBM; Abreu-Sousa, JP; Galbieri, R; Amorim, RMS; Macedo, LLP; Moreira, V; Ferreira, GF; Silva, MCM; Grossi-de-Sa, MF (2020). Cotton-delivered stacked RNAi mediated root-knot nematode resistance by targeting essential genes. Em processo para submissão na revista **3 Biotech**.

20 REALIZAÇÕES ACADÊMICAS DURANTE O MESTRADO

CURSOS

- Vírus respiratórios emergentes, incluindo COVID-19 - Escola Nacional de Administração Pública, Brasil, 2020.
- Genética Molecular de Leveduras - Fundación Instituto Leloir y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Buenos Aires, Argentina, CBAB, 2019.
- Engenharia genética para o desenvolvimento de cultivadores superiores: Edição de genomas via tecnologia CRISPR - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasil, CBAB, 2019.
- Segurança em Laboratórios: Aspectos Ambientais e Ocupacionais - Universidade Federal de São Paulo, Brasil, 2019.

PRÊMIO

- Prêmio de 3º lugar na área temática Vegetal, nível pós-graduação no XXIV Encontro do Talento Estudantil, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS

- Apresentação do trabalho no XXIV Encontro de Talentos da Embrapa, Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019.
- Apresentação do trabalho no 2º Simpósio de Biologia Química da Dana-Farber Cancer Institute, Havard University, Boston, EUA, 2019.
- Apresentação dos trabalhos no 7º Congresso Brasileiro de Biotecnologia e 2º Congresso Ibero-Americano de Biotecnologia, 2018.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- Seminário Tendências em Nanotecnologia, Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa, 2019.
- 2º Simpósio de Biologia Química de Dana-Farber Cancer Institute, Havard University, Boston, EUA, 2019.
- 7º Congresso Brasileiro de Biotecnologia e 2º Congresso Ibero-Americano de Biotecnologia, 2018.
- 1º Congresso Internacional de Cidades Lixo Zero, 2018.

ORIENTAÇÕES

- Coorientação do aluno Joao Pedro Abreu Souza, estudante de Ciências Biológicas, atuando como bolsista de Iniciação Científica na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019-2020, sob orientação de Maria Fatima Grossi-de-Sa.



Campus I - QS 07 – Lote 01 – EPCT – Águas Claras – Brasília – DF CEP: 71966-700 - (61) 3356-9000
Campus Avançado Asa Norte - SGAN 916 Módulo B Avenida W5 - CEP: 70790-160 - Brasília/DF - Telefone: (61) 3448-7134
Campus Avançado Asa Sul - SHIGS 702 Conjunto 2 Bloco A - CEP: 70330-710 - Brasília/DF - Telefone: (61) 3226-8210