

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Soja  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

## **DOCUMENTOS 446**

# **XVII Jornada Acadêmica da Embrapa Soja Resumos expandidos**

*Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite  
Larissa Alexandra Cardoso Moraes  
Kelly Catharin*  
Editoras Técnicas

**Embrapa Soja**  
Londrina, PR  
2022

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Soja**  
Rod. Carlos João Strass, s/n  
Acesso Orlando Amaral, Distrito da Warta  
CEP 86065-981  
Caixa Postal 4006  
Londrina, PR  
Fone: (43) 3371 6000  
www.embrapa.br/soja  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Soja**

Presidente  
*Alvadi Antonio Balbinot Junior*

Secretária-Executiva  
*Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite*

Membros  
*Claudine Dinali Santos Seixas, Edson Hirose,  
Ivani de Oliveira Negrão Lopes, José de Barros  
França Neto, Liliane Márcia Mertz-Henning,  
Marco Antonio Nogueira, Mônica Juliani  
Zavaglia Pereira, Norman Neumaier*

Supervisão editorial  
*Vanessa Fuzinato Dall'Agnol*

Normalização bibliográfica  
*Valéria de Fátima Cardoso*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica e capa  
*Marisa Yuri Horikawa*

**1ª edição**  
PDF digitalizado (2022).

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Soja

---

Jornada Acadêmica da Embrapa Soja (17. : 2022: Londrina, PR).  
Resumos expandidos [da] XVII Jornada Acadêmica da Embrapa Soja / Regina  
Maria Villas Boas de Campos Leite... [et al.] editoras técnicas – Londrina:  
Embrapa Soja, 2022.  
155 p. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937 ; n. 446).

1. Soja. 2. Pesquisa agrícola. I. Leite, Regina Maria Villas Bôas de Campos. II.  
Moraes, Larissa Alexandra Cardoso. III. Catharin, Kelly. IV. Série.

CDD: 630.2515 (21. ed.)

# Efeito do silenciamento gênico de proteínas envolvidas no parasitismo de *Pratylenchus brachyurus*

PINTO, R. A. S.<sup>1</sup>; NOMURA, R. B. G.<sup>2</sup>; HISHINUMA-SILVA, S. M.<sup>2</sup>; LOPES-CAITAR, V. S.<sup>3</sup>; DIAS, W. P.<sup>4</sup>; LOPES, I. de O. N.<sup>4</sup>; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>UEL, Departamento de Genética e Biologia Molecular, Londrina, PR; <sup>2</sup>UEL, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Londrina, PR; <sup>3</sup>Department of Plant Sciences, University of Tennessee, Knoxville, Tennessee, USA; <sup>4</sup>Pesquisador, Embrapa Soja.

## Introdução

O nematoide *Pratylenchus brachyurus*, também conhecido como nematoide das lesões radiculares (Godfrey, 1929), é um endoparasita migrador e polífago, parasitando variados tipos de vegetais em qualquer estágio de vida (Lordello, 1984). Dentre as plantas hospedeiras, destacam-se importantes culturas agrícolas, como a soja, o milho, o algodão (Goulart, 2008). No caso da soja, estes nematoides penetram na região da raiz e estabelecem uma migração ativa nessa região, secretando efetores de parasitismo, além disso, não estabelecem um sítio de alimentação (Araújo Filho; Dallagnol, 2018).

O nematoide inicia a infecção pela inserção de seu estilete e secreção de diversas moléculas no interior da região da coifa. Dentre estas moléculas, destacam-se as proteínas efetoras envolvidas no parasitismo, que atuam na supressão da defesa do hospedeiro, visando facilitar o parasitismo e auxiliar o processo de penetração do estilete e migração do nematoide pela planta (Gheysen; Mitchum, 2011).

Medidas de controle, como o uso de nematicidas ou de cultivares apresentando resistência genética, tem sido ineficazes a este patógeno (Franchini et al., 2014). Por outro lado, estratégias de silenciamento gênico baseado na tecnologia de RNA de interferência (iRNA) constitui uma ferramenta promissora para o controle de muitas pragas e patógenos. A técnica de RNAi permite o desligamento da expressão de genes desencadeado por molécula de RNA de dupla fita (dsRNA) ou aberrantes (Fire et al., 1998) a partir de sua degradação. O sucesso desta metodologia no silenciamento de genes em diferentes espécies de nematoides, incluindo o gênero *Pratylenchus* já foi

reportada (Nomura, 2019). Em trabalhos prévios da Equipe, foi observada a capacidade de nematoides *P. brachyurus* assimilarem moléculas de dsRNA quando incubados em uma solução contendo o neuroestimulante octopamina, sendo que os níveis de RNA do gene PB6584 foi reduzido em pelo menos 35 % via soaking após 60 dias, confirmados por RT-qPCR (Nomura, 2019).

Neste trabalho o efeito do silenciamento gênico via *soaking* de três genes essenciais para o parasitismo de *P. brachyurus*: 0713 (Fatty acid and retinol binding protein), PB1953 ( $\beta$ -1,4-endoglucanase), PB6638 (Legumain protein enzyme), previamente identificados em estudos de transcriptoma, foi testado. Os resultados ratificam o potencial da tecnologia de iRNA no controle deste patógeno.

## Material e Métodos

### Seleção do gene alvo e síntese do RNA de dupla fita (dsRNA)

Os genes alvos analisados nesse projeto foram identificados por Lopes-Caitar (2018), em estudo que visou identificar genes do patógeno expressos durante o parasitismo com a soja. Três genes alvos, denominados 0713 (Fatty acid and retinol binding protein); PB1953 ( $\beta$ -1,4-endoglucanase); PB6638 (Legumain protein enzyme), tiveram sua expressão induzida durante o ciclo de *P. brachyurus* na soja via PCR quantitativo, em especial nas fases iniciais da infecção (Nomura, 2021). Como controle foi utilizado dsRNA similar a proteína green fluorescent protein (GFP). As sequências dos transcritos foram obtidas com base nas sequências do transcriptoma. As moléculas de dsRNA foram sintetizadas pela AgroRNA (Seul, Coreia do Sul).

### Inóculos de *Pratylenchus brachyurus*

Os inóculos de *Pratylenchus brachyurus* foram cedidos pelo Laboratório de Nematologia do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR-PR). O preparo do inóculo foi realizado pela coleta de amostras de raízes de quiabo, *Abelmoschus esculentus*, infestadas com os fitonematoides. Assim, foi utilizado a metodologia de Baermann (1917) para preparar o inóculo purificado apenas com *P. brachyurus*.

## Fornecimento de dsRNA via *soaking*

A metodologia utilizada neste trabalho foi baseada no mecanismo de denominado “soaking”, o qual consiste na incubação dos fitonematóides em solução contendo as moléculas de dsRNA, para indução do silenciamento gênico dos genes analisados. Para o experimento, um total de 3.000 fitonematóides em estádios mistos foi utilizado, conforme descrito por Tabara et al. (1998) e adaptado por Tan et al. (2013). Os nematóides foram colocados em solução de 5 mL (3 ml de nematóides contendo, assim, 3000 fitonematóides totais), tampão M9 (43 milimol  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 22 milimol  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2 milimol NaCl; 4,6 milimol  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), os respectivos dsRNA (10 mg) e octopamina (50 milimol) sendo esse último um neuroestimulante que tem por função induzir a ingestão do dsRNA pelo fitonematóide. As concentrações utilizadas foram baseadas em experimentos já testados em outras análises, de acordo com (Nomura, 2021). Dessa forma, após o preparo das soluções com *P. brachyurus*, a solução foi enrolada em papel alumínio para evitar a exposição a luz, e incubada por 16 horas a 28° C. Como controle negativo foi utilizada a molécula dsRNA com similaridade a proteína green fluorescent protein (dsRNA-GFP).

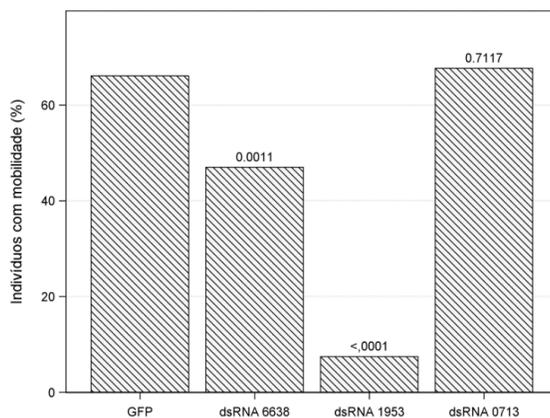
## Desenho Experimental e Análise estatística

O experimento foi instalado em um delineamento de blocos casualizados com 5 blocos, sendo avaliado 50 nematóides por bloco. Foram testados três genes alvo no tempo de incubação de 16 horas, sendo após este tempo os nematóides foram avaliados em lupa para avaliação de sua mobilidade. Em um segundo experimento, foi analisado apenas o gene dsRNA 1953 e o controle GFP após 6 horas e 8 horas de incubação. Este último foi um estudo exploratório para investigar se o gene que proporcionou maior redução na mobilidade do nematóide no primeiro bioensaio apresentaria proporções significativamente menores que o controle GFP em um menor tempo de exposição. Para a análise estatística, considerou-se o tempo de exposição como um fator de blocagem. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os procedimentos glimmix e sgplot do sistema SAS/STAT software (SAS Institute, 2016). O modelo estatístico adotado foi  $M_{ij} = \mu + g_i + b_j + e_{ij}$ , em que no primeiro ensaio  $i \in \{1, 2, 3, 4\}$  e  $j \in \{1, 2, 3, 4, 5\}$  e no segundo  $i, j \in \{1, 2\}$ ,  $M_{ij}$  representou a proporção de mobilidade sob o gene  $i$  ( $g_i$ ) no bloco  $j$  ( $b_j$ ),  $\mu$  a proporção média geral de mobilidade e  $e_{ij}$  a proporção de mobilidade não

explicada por  $gi$  ou  $bj$ , denominada erro experimental ou resíduo. Os parâmetros do modelo foram estimados assumindo-se que  $M$  é descrita pela distribuição binomial e que os efeitos que o explicam são aditivos. As validades dessas pressuposições foram verificadas por meio da distribuição dos resíduos, os quais foram aleatórios, independentes e seguiram a distribuição normal com média zero e variância  $\sigma^2$ . A independência e a aleatoriedade foram verificadas graficamente, enquanto a normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk ( $p=0,309$  no 1º bioensaio e  $0,0353$  no 2º bioensaio).

## Resultado e Discussão

Após a exposição de 16 horas dos nematoides às moléculas de dsRNA similares a genes envolvidos no parasitismo, observou-se que a mobilidade foi afetada significativamente ( $p<0.001$ ) na presença dos dsRNA similares aos genes PB1953 e PB6638, sendo observada a mobilidade de 7,5% e 46,99% no percentual de fitonematoides móveis comparados ao controle, conforme o Figura 1. Em contrapartida, nematoides em contato com o controle dsRNA-GFP tiveram uma mobilidade em torno de 66%. Sendo assim, esses percentuais indicam potencial silenciamento gênico desses alvos e, conseqüentemente, efeitos em sua mobilidade. Todavia, para o gene PB0713, não houve efeito na mobilidade dos fitonematoides. A análise estatística pode ser observada na Tabela 1.



**Figura 1.** Efeito do soaking na mobilidade de *Pratylenchus brachyurus*, após 16 horas de contato com o dsRNA dos respectivos genes silenciados. Asteriscos indicam significância a 1% ( $p<0,001$ ).

**Tabela 1.** Proporção estimada ( $\hat{p}$ ) de mobilidade de fitonematoides após 16 horas de contato.

Gene	$\hat{p}$	$\hat{\sigma}_p$	dsRNA vs GFP Pr >  t
GFP	0,661	0,0298	-
dsRNA 6638	0,470	0,0315	0,0011
dsRNA 1953	0,074	0,0165	<,0001
dsRNA 0713	0,677	0,0295	0,7117

Devido à elevada redução na mobilidade dos nematoides, causada pela incubação dos nematoides por 16h para o gene 1953, tempos menores de incubação também foram avaliados. Não houve redução significativa na mobilidade dos namatoides nos tempos de 6 e 8 horas de incubação

O gene efetor PB1953 codifica a proteína  $\beta$ -1,4-endoglucanase, a qual participa de forma efetiva no processo de parasitismo, atuando no rompimento da parede celular vegetal do hospedeiro (Baum et al., 2003). Portanto, esse gene efetor desempenha papel primordial na infecção da planta (Nomura, 2021), assim como, desempenha papéis imprescindíveis para o metabolismo basal de *P. brachyurus*, mesmo na ausência do hospedeiro (Abrahão-Neto et al., 1995). Adicionalmente, a enzima  $\beta$ -1,4-endoglucanase possui relação com a inibição das funções mitocondriais (Abrahão-Neto et al., 1995). Ademais, a repressão da transcrição do gene PB1953 acarreta em baixa concentração de oxigênio e baixa concentração de glicose em organismos como *Trichoderma reesei* (Abrahão-Neto et al., 1995). A expressão do gene da endoglucanase está intrinsecamente relacionada ao processo de respiração celular e a expressão dos genes celobiohidrolase I e engoglucanases que participam da catálise do material de reserva e promove a produção energética (Abrahão-Neto et al., 1995). O gene efetor PB6638 é transcrito em um RNAm para síntese de *Legumain*, uma proteína com capacidade de processar outras proteínas, isto é, clivagem e ligação a outras proteínas (Zauner et al., 2018). Essas proteínas são encontradas tanto nas vesículas lisossomais de animais, quanto no vacúolo de vegetais. Dessa forma, essas endopeptidases são consideradas hidrolases que atuam no rompimento das ligações peptídicas, assim como cofatores enzimáticos – para ativar determinadas enzimas (Enzymes... 1992; Rawlings et al., 2014). Além disso, essas proteínas possuem funções de degradação e maturação de proteínas, assim como, a

morte programada das células (Mosolov; Valueva, 2006). Esse gene auxilia no crescimento celular na fase G2 da interfase, regulando assim o crescimento celular através de sinais químicos de  $\text{Ca}^{2+}$  e regulando a proliferação das células SKHep1. O gene efetor PB0713, similar a proteína FAR-1, altera rotas metabólicas de síntese de lipídeos e ácidos graxos, que são precursores de hormônios vegetais, no hospedeiro (Rehman et al., 2009). Já foi demonstrado que o hormônio ácido jasmônico sofre interferência na sua síntese na presença da proteína FAR-1, visto que *P. brachyurus* acabam fixando os lipídeos constituintes desse fitormônio (Cheng et al., 2013; Iberkleid et al., 2015). Os dados de Takahashi e colaboradores (2004) indicaram como uma proteína de ligação a lipídios, FAR-1, pode regular as respostas de defesa dependentes de jasmonato para promover a suscetibilidade de raiz vegetal.

## Conclusão

Pelos menos dois genes efetores (PB1953 e PB6638) analisados nesse trabalho estão potencialmente envolvidos em processos biológicos do fitonematóide *P. brachyurus*, levando à uma redução da mobilidade destes fitoparasitas na presença de moléculas capazes de induzir o silenciamento gênico em ensaio de soaking. Foi demonstrado ainda que este animal apresenta uma maquinaria de silenciamento ativa, capaz de processar moléculas de dsRNA e induzir o silenciamento. O método de soaking se mostrou eficiente para o estudo da função de genes em *P. brachyurus*. Ensaios futuros são necessários para confirmar a ocorrência do silenciamento gênico baseada na redução dos níveis dos transcritos dos genes alvos. Neste trabalho, a ocorrência do silenciamento foi inferida de forma indireta, com base no efeito na mobilidade dos nematoides, comparativamente com o controle negativo (dsRNA-GFP).

## Referências

ABRAHÃO-NETO, J.; ROSSINI, J.; EL-GOGARY, S.; HENRIQUE-SILVA, F.; CRIVELLARO, O.; EL-DORRY, H. Mitochondrial functions mediate cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. **Biochemistry**, v. 34, p. 10456-10462, 1995.

ARAÚJO FILHO, J. V. de; DALLAGNOL, L. J. Resistência de plantas a fitonematóides: importância, terminologia & aspectos biológicos. In: DALLAGNOL, L. J. (ed.). **Resistência genética**: de plantas a patógenos. Pelotas: Ed. UFPel, 2018. cap. 9, p. 394-436.

BAERMANN, G. Eine einfache method zur auffindung von ankvlostomum (Nematoden) larven in erdproben. **Natuurkundig tijdschrift voor Nederlandsch Indië**, v. 57, p. 131-137, 1917.

BAUM, T.; HUSSEY, R.; GAO, B.; ALLEN, R.; MAIER, T.; DAVIS, E. The parasitome of the phytoneatode *Heterodera glycines*. **Journal Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, n. 8, p. 720-726, 2003.

CHENG, X.; XIANG, Y.; XIE, H.; XU, C.-L.; XIE, T.-F.; ZHANG, C.; LI, Y. Molecular characterization and functions of fatty acid and retinoid binding protein gene (*Ab-far-1*) in *Aphelenchoides besseyi*. **PLoS One**, v. 8, n. 6, e66011, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0066011.

ENZYME nomenclature recommendations. London: IUBMB, 1992.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, K.; KOSTAS, S.; DRIVER, S.; MELLO, C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 19, n. 391, p. 806-811, 1998.

FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; DIAS, W. P.; RAMOS JUNIOR, E. U.; SILVA, J. F. V. Perda de produtividade da soja em área infestada por nematoide das lesões radiculares na região médio norte do Mato Grosso. In: BERNARDI, A. C. de C.; NAIME, J. de M.; RESENDE, A. V. de; BASSOI, L. H.; INAMASU, R. Y. (ed.). **Agricultura de precisão: resultados de um novo olhar**. Brasília, DF: Embrapa, 2014. p. 274-278.

GHEYSEN, G.; MITCHUM, M. How nematodes manipulate plant development pathways for infection. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 4, p. 415-421, 2011.

GODFREY, G. H. A. A destructive root disease of pineapples and other plants due to *Tylenchus brachyurus*. **Phytopathology**, v. 19, p. 610-623, 1929.

GOULART, A. M. C. **Aspectos gerais sobre nematóides das lesões radiculares (gênero *Pratylenchus*)**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. 27 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 219).

IBERKLEID, I.; SELA, N.; MIYARA, S. B. Meloidogyne javanica fatty acid-and retinolbinding protein (*Mj-FAR-1*) regulates expression of lipid-, cell wall-, stress-and phenylpropanoid-related genes during nematode infection of tomato. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 272, 2015.

LOPES-CAITAR, V. S. **Estudos moleculares do patossistema *Glycine max-Pratylenchus brachyurus*: de estratégias de infecção do patógeno e de defesa do hospedeiro, à interação proteína-proteína**. 2018. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular de Plantas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

LORDELLO, L. G. E. **Nematoídes das plantas cultivadas**. São Paulo: Nobel, 1984. 314 p.

MOSOLOV, V.; VALUEVA, T. Participation of proteolytic enzymes in the interaction of plants and phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry**, v. 71, n. 8, p. 838-845, 2006.

NOMURA, R. B. G. **Análise funcional de candidatos a efetores de *Pratylenchus brachyurus* em soja via estratégias de RNAi e predição das proteínas-alvo no hospedeiro**. 2021. 169 f. Tese (Doutorado) - Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

NOMURA, R. B. G. **Padronização de metodologias para o estudo funcional de genes em *Pratylenchus brachyurus* e caracterização da proteína PB6584.1 envolvida no**

**parasitismo**. 2019. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RAWLINGS, N.; MORTON, F.; BARRETT, A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 503-509, 2014.

REHMAN, S.; BUTTERBACH, P.; POPEIJUS, H.; OVERMARS, H.; DAVIS, E.; JONES, J.; GOVERSE, A.; BAKKER, J.; SMANT, G. Identification and characterization of the most abundant cellulases in stylet secretions from *Globodera rostochiensis*. **Phytopathology**, v. 99, p. 194-202, 2009.

SAS Institute. **SAS/STAT software**. versão 9.4. Cary: SAS Institute Inc., 2016.

TABARA, H.; GRISHOK, A.; MELLO, C. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. **Science**, v. 282, p. 430-433, 1998.

TAKAHASHI, H.; KANAYAMA, Y.; ZHENG, M.; KUSANO, T.; HASE, S. Antagonistic interactions between the SA and JA signaling pathways in Arabidopsis modulate expression of defense genes and gene-for-gene resistance to cucumber mosaic virus. **Plant Cell Physiology**, v. 45, p. 803-809, 2004.

TAN, J.-A. C.; JONES, M. G.; FOSU-NYARKO, J. Gene silencing in root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) significantly reduces reproduction in a plant host. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 2, p. 166-178, 2013.

ZAUNER, F.; DALL, E.; REGL, C.; GRASSI, L.; HUBER, C.; CABRELE, C.; BRANDSTETTER, H. A estrutura cristalina da legumaina vegetal revela um estado único de duas cadeias com Regulação da atividade dependente do pH. **Plant Cell**, v. 30, p. 686-699, 2018.