

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

**SILENCIAMENTO DOS GENES *FAD* INDUZIDO POR VÍRUS NA
INTERAÇÃO *ARABIDOPSIS THALIANA* E *PYTHIUM* SPP.**

Johannes Humbertus Falcade
Engenheiro Agrônomo/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase Melhoramento e Biotecnologia Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil
Abril de 2010

CIP - Catalogação na Publicação

Falcade, Johannes Humbertus
SILENCIAMENTO DOS GENES FAD INDUZIDO POR VÍRUS NA
INTERAÇÃO ARABIDOPSIS THALIANA E PYTHIUM SPP. /
Johannes Humbertus Falcade. -- 2010.
63 f.

Orientador: Marcelo Gravina de Moraes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2010.

1. Silenciamento Genético Induzido por Vírus
(VIGS). 2. Arabidopsis thaliana. 3. Pythium sp. 4.
FADs. 5. Tobacco Rattle Virus (TRV). I. Moraes,
Marcelo Gravina de , orient. II. Título.

JOHANNES HUMBERTUS FALCADE
Engenheiro Agrônomo - UFRGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

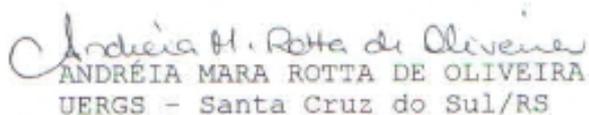
Aprovado em: 30.04.2010
Pela Banca Examinadora



MARCELO GRAVINA DE MORAES
Orientador - PPG Fitotecnia



CARLA ANDRÉA DELATORRE
PPG Fitotecnia

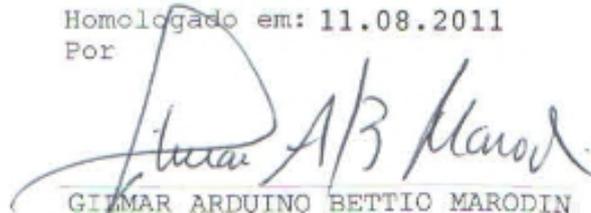


ANDRÉIA MARA ROTTA DE OLIVEIRA
UERGS - Santa Cruz do Sul/RS



CAREN REGINA CAVICHIOLI LAMB
FEPAGRO AGROINDUSTRIA
Caxias do Sul/RS

Homologado em: 11.08.2011
Por



GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia



PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de
Agronomia

DEDICO

*A meus avós Jair e Gladis pelo carinho e exemplo de vida,
alicerces firmes que sustentam nossa fabulosa Família.*

*A minha querida mãe Elaine lutadora forte, de garra,
sempre presente, apoiando e incentivando os filhos.*

*A meus irmãos Jonathan e Jéssica pelo carinho
e compreensão pelas madrugadas de luz acesa.*

*As minhas duas Lindas Márcia e Ana Clara,
pelo amor e compreensão da ausência.*

Amo Todos Vocês.

*“Nas minhas investigações debaixo do sol,
vi ainda que a corrida não é para os ágeis,
nem a batalha para os bravos,
nem o pão para os prudentes,
nem a riqueza para os inteligentes,
nem o favor para os sábios:*

todos estão à mercê das circunstâncias e do destino.”

(Eclesiastes 9:11)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as graças a mim atribuídas;

Ao professor Marcelo Gravina, pelos ensinamentos e pela presença constante;

Aos meus colegas e amigos do atual LFM, Adriano, Ana Paula, Guilherme, Leonardo e Sara, pela amizade, cafés, risadas, brincadeiras, discussões (sobre trabalhos, claro) e ajudas essenciais;

Aos meus colegas e amigos do antigo LFM, Alex, Caren, Marcos, pela e amizade e companheirismo único;

Ao Felipe Graichen, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À “*My Doctor*” minha eterna inspiradora e incentivadora da vida acadêmica, sem sua ajuda e incentivo certamente não estaria aqui hoje;

À UFRGS, minha segunda casa nos últimos sete anos, pela oportunidade de realização dos cursos de graduação e pós-graduação.

A toda minha Família, tias, tios, primos, primas, avô, avó, sogro, sogra, cunhadas, cunhado, mãe, amigos e amigas pela compreensão destes anos de distância e ausência.

Ao CNPq pela bolsa concedida;

SILENCIAMENTO DOS GENES *FAD* INDUZIDO POR VÍRUS NA INTERAÇÃO *ARABIDOPSIS THALIANA* E *PYTHIUM* SPP.¹

Autor: Johannes Humbertus Falcade
Orientador: Marcelo Gravina de Moraes

RESUMO

Patógenos necrotróficos matam as células por meio de suas agressivas moléculas tóxicas e enzimas líticas não específicas. Jasmonato (JA) é um importante hormônio produzido, para entre outras funções, regular positivamente genes envolvidos na defesa a necrotróficos. Um passo importante nesta rota é a produção do ácido linolênico, um ácido graxo de (18:3) que é dessaturado de (18:2) pelas enzimas FAD3, FAD7 e FAD8. Uma ferramenta muito utilizada hoje é o silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) que se utiliza de um mecanismo natural de defesa das plantas a vírus, para a descoberta da função gênica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a interação entre *A. thaliana* e isolados do gênero *Pythium* sp., com os genes *FAD3*, *FAD7* e *FAD8* silenciados. Para alcançar tal objetivo um fragmento de 325 pb do gene FAD7 de *A. thaliana* foi isolado e clonado no vetor viral TRV2b. As plantas foram agro-infiltradas com o vetor TRV1 e TRV2b-GFP (controle) ou TRV2b-FAD7 (silenciada), após foi realizada a inoculação dos isolados de *Pythium* sp. e atribuídas notas de severidade, referente ao fenótipo e medido o comprimento das raízes. A agro-infiltração do vetor viral TRV2b-FAD7 ocasionou uma redução significativa na quantidade de mRNA dos genes *FAD3* e *FAD7*, não interferindo na quantidade de mRNA do *FAD8*. Esta redução na expressão interferiu negativamente na resistência de *A. thaliana* a *P. deliense*, causando sintomas mais severos na parte aérea, sintomas que estão correlacionados significativamente com o comprimento de raiz. O silenciamento destes genes ocasionou a redução na expressão da defensina PDF1.2, induzida na infecção por patógenos necrotróficos. A resistência a *P. deliense* foi restituída pela adição de metil-jasmonato, pois a aplicação exógena deste, ocasionou a indução de PDF1.2, evidenciando a importância da produção de JA na indução desta defensina e na resistência a *P. deliense*.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (63 p.) Abril, 2010.

VIRUS INDUCED SILENCING OF *FAD* GENES IN *ARABIDOPSIS THALIANA* INCREASES SUSCEPTIBILITY TO *PYTHIUM* SPP.¹

Author: Johannes Humbertus Falcade
Adviser: Marcelo Gravina de Moraes

ABSTRACT

Necrotrophic pathogens kill plant cells through its aggressive and nonspecific lytic enzymes and toxic molecules. Jasmonate (JA) is an important hormone that positively regulates genes involved in necrotrophic defense, among other functions. An important step in this pathway is the production of linolenic acid, a fatty acid (18:3) that is desaturated to (18:2) by FAD3, FAD7, and FAD8 enzymes. Virus induced gene silencing (VIGS) is a widely used tool today, which takes advantage of a natural defense mechanism of plants against viruses, for the discovery of gene function. The aim of this study was to evaluate the interaction between *A. thaliana* and isolates of the genus *Pythium* sp., after gene silencing of *FAD3*, *FAD7*, and *FAD8*. For this purpose, a 325 bp fragment of *FAD7* from *A. thaliana* was isolated and cloned into a viral vector TRV2b. Plants were agro-infiltrated with the vector and TRV1 TRV2b-GFP (control) or TRV2b-FAD7 (silenced). Then, plants were inoculated with *Pythium* sp. isolates and disease severity was evaluated, based on phenotype and measures of root length. Agro-infiltration of TRV2b-FAD7 caused a significant reduction in the amount of mRNA from *FAD3* and *FAD7* but did not interfere in the amount of mRNA from *FAD8*. This down regulation had a negative influence on the resistance of *A. thaliana* to *P. deliense*, causing more severe symptoms in the shoot, symptoms that are significantly correlated with root length. Gene silencing led to a reduction in the expression of *PDF1.2* defensin, which is induced in infections caused by necrotrophic pathogens. Resistance to *P. deliense* was restored by adding exogenous methyl jasmonate, which induced *PDF1.2* expression. These results indicate the importance of JA in the induction of this defensin leading to resistance against *P. deliense* in *A. thaliana*.

¹Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.(63 p.) April, 2010.

SUMÁRIO

		Página
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1	<i>Pythium</i> sp.	4
2.2	Doenças causadas por <i>Pythium</i>	7
2.3	Patógenos Necrotróficos.....	9
2.4	Jasmonato, rota biossintética e função.....	12
2.5	Silenciamento gênico pós transcricional (PGTS).....	15
2.5.1	Silenciamento genético induzido por vírus (VIGS)	17
2.5.2	Vetor Tobacco Rattle Virus (TRV)	18
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1	Material vegetal e isolados de <i>Pythium</i> spp.	21
3.2	Extração de RNA total e isolamento de mRNA.....	22
3.3	Síntese de cDNA.....	24
3.4	Obtenção do clone atFAD7.....	25
3.5	Reação de sequenciamento.....	28
3.6	Extração de plasmídeos recombinantes.....	28
3.7	Transformação do vetor TRV.....	29
3.8	Transformação de <i>A. tumefaciens</i>	31
3.9	Agro-infiltração.....	32
3.10	Avaliação da interação entre <i>A. thaliana</i> e isolados de <i>Pythium</i> sp.	33
3.11	Restituição do fenótipo.....	34
3.12	Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	35
3.13	Análise estatística.....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1	Análise <i>in silico</i>	38
4.2	Clonagem de um fragmento do cDNA <i>FAD7</i>	39

	Página
4.3	Efeito da agro-infiltração de TRV2b-FAD7 na resistência a <i>Pythium</i> sp. 40
4.4	Análise da expressão gênica..... 46
4.5	Complementação bioquímica do silenciamento. 50
5	CONCLUSÕES..... 53
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 54
7	APÊNDICES..... 61

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Escala de sintomas em <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas RT-qPCR.	36
3. Coeficientes médios de correlação de Spearman.....	45
4. Eficiência do silenciamento dos genes <i>FAD 3</i> , <i>FAD 7</i> e <i>FAD 8</i> em <i>Arabidopsis thaliana</i>	48

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Rota biossintética do ácido jasmônico (JA).	12
2. Rota de dessaturações dos ácidos graxos.	13
3. Representação gráfica do vetor TRV.....	30
4. Perfis eletroforéticos em gel de agarose da amplificação de FAD7.....	39
5. Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> agro-infiltradas.	41
6. Resistência de <i>Arabidopsis thaliana</i> a isolados de <i>Pythium</i> sp.....	42
7. Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> inoculadas com <i>Pythium deliense</i>	44
8. Raízes de <i>Arabidopsis thaliana</i> inoculadas com <i>Pythium deliense</i>	46
9. Expressão dos genes <i>FAD3</i> , <i>FAD7</i> e <i>FAD8</i> em <i>A. thaliana</i> silvestres.....	47
10. Expressão dos genes <i>FAD3</i> , <i>FAD7</i> e <i>FAD8</i> em <i>A. thaliana</i> agro-infiltradas com TRV2b-GFP e inoculada com <i>Pythium deliense</i>	47
11. Acúmulo de mRNA dos genes <i>FAD3</i> , <i>FAD7</i> e <i>PDF 1.2</i> em plantas de <i>A. thaliana</i> silenciadas com TRV2b-FAD7 e inoculadas com <i>Pythium deliense</i>	50
12. Resistência de <i>Arabidopsis thaliana</i> a <i>Pythium deliense</i>	51
13. Acúmulo de mRNA dos genes <i>FAD3</i> , <i>FAD7</i> e <i>PDF1.2</i> em plantas de <i>A. thaliana</i> agro-infiltradas com TRV2b-FAD7, inoculadas com <i>Pythium deliense</i> e sem adição de MeJA.	52
14. Acúmulo de mRNA dos genes <i>FAD3</i> , <i>FAD7</i> e <i>PDF1.2</i> em plantas de <i>A. thaliana</i> agro-infiltradas com TRV2b-FAD7, inoculadas com <i>Pythium deliense</i> e com adição de MeJA..	52

RELAÇÃO DE APÊNDICES

	Página
1. Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos mRNAs dos genes <i>FAD7</i> e <i>FAD8</i>	61
2. Alinhamento das sequências de região interna aos oligonucleotídeos iniciadores e o fragmento da sequência de nucleotídeos do mRNAs do gene <i>FAD3</i>	63
3. Sequência do fragmento amplificado do vetor TRV2b- <i>FAD7</i>	63

1 INTRODUÇÃO

A busca pela resistência a patógenos necrotróficos é um dos grandes desafios para os pesquisadores da área de fitopatologia e áreas afins. Na classe dos omicetos, os gêneros *Phytophthora* e *Pythium* inclui alguns dos mais agressivos gêneros de patógenos. Os patógenos do gênero *Pythium*, além de apresentarem uma ampla gama de hospedeiros, possuem uma vasta diversidade de fatores que afetam a infecção, como temperatura, pH, conteúdo de água no solo e presença de outros microorganismos. Além disso, diferentes espécies do gênero *Pythium* variam quanto à severidade da doença causada em diferentes hospedeiros. Espécies patogênicas deste gênero causam tombamento em plântulas, podridões radiculares, amarelecimento, murcha e morte, sendo responsáveis por grandes reduções na produtividade nas culturas de alface, pepino, tomate, fumo, milho, entre outras.

A dificuldade de encontrar plantas resistentes através de métodos de melhoramento convencionais se deve, principalmente, ao modo de infecção destes patógenos agressivos, que se utilizam de uma grande quantidade de enzimas inespecíficas para degradar as paredes celulares das plantas e, assim, nutrirem-se. Alguns avanços têm sido obtidos através do uso de

técnicas de engenharia genética, quebrando a barreira interespecífica e transferindo genes isolados em laboratório a partir de qualquer organismo para outro, possibilitando o desenvolvimento de novas variedades. Entretanto, ainda é reduzido o entendimento da fase de reconhecimento à infecção por patógenos necrotróficos e das vias de sinalização por parte da planta. Uma exceção é o conhecimento sobre o papel da produção de etileno (ET) e jasmonato (JA) na sinalização através do estímulo à síntese de defensinas como PDF1.2 e THI2.1.

Nos últimos anos, estudos de mecanismos de defesa, especialmente em *Arabidopsis thaliana*, têm auxiliado à compreensão dos mecanismos genéticos e dos sinais endógenos e exógenos que regulam a expressão de genes de defesa. Uma das formas mais clássicas e muito empregada é a utilização de mutantes para a identificação da função gênica.

Outra estratégia, de uso mais recente, é o emprego do silenciamento gênico em nível de RNA, que ocorre naturalmente como uma forma de proteger os organismos contra infecções virais e contra a mobilização de elementos genéticos móveis. Uma das estratégias de emprego do silenciamento é o uso do “Virus-induced gene silencing” ou Silenciamento Genético Induzido por Vírus (VIGS), devido a sua praticidade e amplitude de hospedeiros. Nos casos onde a expressão do gene possui um efeito importante no fenótipo da planta, o VIGS pode ser mais efetivo que a mutagênese. Desta forma, as plantas podem se desenvolver normalmente, sendo o fenótipo das mesmas alterado após a aplicação do vetor viral e o silenciamento.

Mutantes de *A. thaliana* relacionados à via de sinalização em resposta a infecção por patógenos necrotróficos são bastante utilizados, principalmente os mutantes de genes responsáveis pela síntese de enzimas envolvidas na produção de ácidos graxos que são utilizados na via biosintética do ácido jasmônico, como os mutantes da família das enzimas denominadas de dessaturases de ácidos graxos ou FADs.

A mutação nos genes responsáveis pela produção das enzimas FAD3, FAD7 e FAD8 altera a produção de ácido linolênico que é o substrato primário na biossíntese do JA, fazendo com que a planta não ative a defesa contra os patógenos, tornando-se altamente suscetível. Entretanto, não apenas a via de sinalização contra patógenos é alterada, uma vez que o jasmonato possui diversas outras funções fisiológicas em *A. thaliana* como o crescimento radicular, floração, produção de sementes, senescência, entre outros efeitos. E não somente a via biosintética do jasmonato é alterada com a falta das enzimas FAD3, FAD7 e FAD8, pois o ácido linolênico é um dos mais abundantes nas membranas celulares. A deficiência desse ácido graxo provoca alterações de conformação, permeabilidade e flexibilidade das membranas.

Tendo em vista essas considerações, o objetivo deste estudo foi avaliar o silenciamento dos genes *FAD3*, *FAD7* e *FAD8* na resistência de *A. thaliana* à infecção por isolados do gênero *Pythium* sp.

A hipótese do estudo é que o silenciamento simultâneo dos genes codificantes de FAD3, FAD7 e FAD8 reduz a quantidade acumulada de mRNA dos respectivos genes, acarretando na diminuição de defensinas e aumento da suscetibilidade de *A. thaliana* à infecção por *Pythium* spp.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Pythium* sp.

As espécies do gênero *Pythium* pertencem à família Pythiaceae, ordem Pythiales, classe Oomycetes (van West *et al.*, 2003). Este gênero foi estabelecido por Pringsheim em 1858 (Hendrix & Campbell, 1973) e atualmente é composto por mais de 200 de espécies que podem ser encontradas em todo o mundo (Kong *et al.*, 2004). Os omicetos são considerados patógenos de plantas que causam danos severos a várias culturas de importância agrônômica, acarretando perdas econômicas significativas em todo mundo. Entre os omicetos são encontrados patógenos biotróficos como o míldio (ex: *Bremia lactucae*, *Hyaloperonospora parasitica*, *Plasmopara viticola*) e a ferrugem branca (*Albugo* spp.), hemibiotróficos (ex: *Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae*) e os necrotróficos (*Phytophthora cinnamomi*, *Pythium* spp.).

Embora os omicetos apresentem características morfológicas de fungos, como crescimento filamentosos, produzindo micélio em seu estado vegetativo, e formem esporos para reprodução sexual e assexual (Latijnhouwers *et al.*, 2003) eles não são classificados como tais. Características como a presença de celulose na parede celular, hifas cenocíticas e a produção de esporos assexuais flagelados, fizeram com que

fossem classificados em um novo reino, Straminipila ou Chromista. Desta forma, eles não estão mais relacionados com fungos verdadeiros, mas sim com as algas marrons. Esta classificação é estabelecida usando técnicas moleculares que são baseadas nas sequências de rRNA (Kumar & Rzhetsky, 1996; Van de Peer & De Wachter; 1997; Paquin *et al.*, 1997). Contudo, a taxonomia do gênero *Pythium* foi principalmente baseada nas descrições morfológicas como tamanho e forma do oogônio, anterídeo e esporângio, seguindo chaves dicotômicas descritas por Middleton (1943), Plaats-Niterink (1981), Waterhouse (1967).

Espécies do gênero *Pythium* podem ser encontradas na água e no solo e causam uma diversidade de doenças em plantas, principalmente nas raízes. As infecções causadas por *Pythium* são geralmente limitadas a extremidades meristemáticas, epiderme, córtex das raízes e frutos (Vijayan *et al.*, 1998), mas o patógeno pode penetrar o tecido da planta e atingir o seu sistema vascular, causando infecções mais severas.

Pythium spp. apresentam crescimento saprofítico e, quando as condições ambientais não são favoráveis para o crescimento ou, quando o hospedeiro não está presente, sobrevivem no solo através de estruturas de resistência denominadas oósporos, as quais apresentam paredes espessas e podem se manter viável por mais de 12 anos (Hendrix & Campbell, 1973). Adicionalmente são dispersos via zoósporos com dois flagelos, sendo sua dispersão favorecida em ambientes úmidos ou em solos mal drenados (van West *et al.*, 2003). Estruturas como os zoósporos, oósporos e fragmentos de hifa, podem ser consideradas fontes potenciais de inóculo, atuando no processo de infecção dos hospedeiros. O zoósporo é considerado o inóculo

inicial (primário) e uma das principais estruturas de disseminação do patógeno na cultura hidropônica (Stanghellini *et al.*, 1996; Owen-going *et al.*, 2003).

A capacidade de cada espécie de causar infecção depende de diversos fatores como a densidade do inóculo, conteúdo de água no solo, temperatura, pH, intensidade da luz e presença de outros microrganismos (Plaats-Niterink, 1981). O sucesso da infecção depende da produção de esporos e de sua dispersão, além da capacidade de sobrevivência dos zoósporos no sítio de deposição no tecido hospedeiro (Tyler, 2002).

O ciclo de vida completo de *Pythium* consiste de um ciclo assexual e um ciclo sexual. O ciclo assexual é caracterizado pela formação de esporângios nas extremidades das hifas. Os esporângios, por sua vez, são responsáveis pela formação de vesículas, nas quais ocorre a diferenciação dos zoósporos, que nadam na água em busca do tecido do hospedeiro (sementes, raízes, caules ou folhas) onde eles se fixam e encistam. O cisto germina pelo desenvolvimento de um tubo germinativo que pode penetrar o hospedeiro diretamente ou via formação do apressório, que liga-se às raízes e forma a hifa de infecção para penetração no tecido hospedeiro. No ciclo sexual ocorre a fertilização do oogônio (gametângio feminino) pelo anterídio (gametângio masculino), resultando na formação do oósporo. Em um hospedeiro suscetível, sob condições ambientais propícias, o oósporo germina formando então o esporângio, retomando ao ciclo assexual (van West *et al.*, 2003).

2.2 Doenças causadas por *Pythium*

Espécies fitopatogênicas do gênero *Pythium* são comuns na rizosfera e em outros tecidos da planta que estão em contato ou próximos ao solo (Kucharek & Mitchell, 2000). Elas apresentam uma ampla gama de hospedeiros e podem causar podridões em frutos, raízes e caules e o tombamento pré ou pós-emergência de sementes e plântulas, sendo que os tecidos jovens e tenros são preferencialmente infectados (Plaats-Niterink, 1981).

A incidência de podridões radiculares causadas por espécies do gênero *Pythium* é favorecida pela alta umidade presente em sistemas protegidos de produção de mudas de diversas culturas, como o fumo, o tomate e a alface, e apresenta dificuldades no controle da doença (Lopes *et al.*, 2005). O tombamento de plântulas causado por *Pythium* spp. é muito comum e importante para o cultivo hidropônico de plantas, em particular nos estádios iniciais de desenvolvimento das plantas (van West *et al.*, 2003). Quando sementes de plantas suscetíveis são plantadas em solos com a presença do patógeno e são infectadas, elas falham na germinação e acabam desintegrando (Lopes *et al.*, 2005). Estes mesmo autores observaram que plântulas jovens podem ser infectadas antes da emergência em qualquer parte da planta, ocorrendo a rápida colonização e, dessa forma, as células invadidas colapsam levando a morte da plântula.

Em plântulas emergidas, a infecção ocorre geralmente nas raízes e no caule, próximo à linha do solo. Raízes infectadas apresentam podridões moles e úmidas, geralmente na região do colo, devido à liberação de enzimas pectolíticas e celulolíticas, que promovem a colonização do tecido

vegetal pelo patógeno através da desintegração do tecido do hospedeiro. As áreas colonizadas tornam-se intumescidas e hialinas, a parte basal do caule das plântulas torna-se mole e muito mais fino que as partes não infectadas acima dele, as plântulas caem sobre o solo, caracterizando o tombamento (Kucharek & Mitchell, 2000; Lopes *et al.*, 2005). No caso de podridões em plantas adultas, a infecção é restrita a tecidos periféricos ou imaturos (Kamoun *et al.*, 1999).

Outro sintoma observado por Kucharek & Mitchell (2000) em plantas que se desenvolveram mesmo na presença do patógeno é o amarelecimento das folhas, que inicia nas folhas mais velhas, chegando à totalidade da planta. Plantas que sobrevivem, apresentam diminuição na produtividade de grãos e frutos (Hendrix & Campbell, 1973).

A infecção das raízes por *Pythium* ocorre através da entrada do patógeno na planta, que pode acontecer via aberturas naturais como hidatódios, estômatos ou lenticelas, pela penetração através de ferimentos ocasionados por práticas agrícolas, por insetos e nematóides e/ou pela penetração direta na superfície do hospedeiro através das estruturas do micélio. Este último processo é iniciado através da quimiotaxia, ocorrendo um movimento direcionado dos zoósporos em direção às raízes, graças à liberação de exsudados pela planta, como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e ácidos graxos (Tyler, 2002), favorecendo a atração química entre os zoósporos e as raízes das plantas. Eles podem mover em resposta a gradientes destes compostos. Mudanças eletrostáticas podem também ser um importante estímulo sensorial para que os zoósporos nadem (Van West *et al.*, 2002).

Em seguida, ocorre o encistamento dos zoósporos na superfície do hospedeiro, sua adesão por meio da liberação de material adesivo produzido pelo patógeno, a produção do tubo germinativo e o desenvolvimento da colônia. Geralmente, as pontas das raízes, os locais de emergência dos pêlos radiculares, as zonas de alongação das raízes e raízes jovens, são os locais preferenciais para a adesão dos zoósporos e a penetração através das estruturas do omiceto, o que pode ser facilitado pela liberação de enzimas pelo patógeno como as pectinases e outras enzimas como hemicelulases, celulases e proteinases (Plaats-Niterink, 1981; Gold & Stanghellini, 1985; Sutton *et al.*, 2006).

2.3 Patógenos Necrotróficos

Os fitopatógenos possuem distintas estratégias de infecção e colonização. Dois grandes grupos que se destacam são os biotróficos e os necrotróficos. Os patógenos biotróficos necessitam do hospedeiro vivo para crescer e se multiplicar, nutrindo-se do tecido vivo da planta, sem causar a lise celular para a sua infecção. Já os patógenos necrotróficos, primeiramente matam as células hospedeiras e então se nutrem de seus conteúdos (Glazebrook *et al.*, 2005). Muitos dos fitopatógenos que atacam as raízes são necrotróficos, desencadeando a lise e a morte celular com suas toxinas, peptídeos elicitadores e enzimas e, desse modo, obtêm condições favoráveis ao seu desenvolvimento (Hardham, 2007).

Uma resposta de defesa bem sucedida depende da rápida ativação de uma série de genes que atuam na síntese de compostos antimicrobianos

e de espécies reativas de oxigênio, lignificação da parede celular e produção de enzimas que degradam a parede do patógeno. Essas enzimas são denominadas de proteínas PR, cuja expressão geralmente é induzida sob infecção (Glazebrook *et al.*, 2005). As respostas de defesa mediadas pela sinalização dependente de jasmonato (JA) e etileno (ET), desempenham papel importante como mecanismo de defesa contra esses microorganismos. A sinalização dependente de JA/ET procede através do aumento da síntese de jasmonato e etileno em resposta ao ataque de patógenos. Este aumento de JA e, conseqüentemente, de jasmonato-isoleucina (JA-Ile), faz com que repressores (JAZ) dos fatores de transcrição dos genes responsivos a JA e ET (atMYC2) sejam degradados, permitindo assim, a transcrição desses genes como os responsáveis pela codificação das defensinas PDF1.2 e a THI2.1 (Browse, 2010).

A caracterização de componentes celulares envolvidos na transdução de sinais e na ativação da defesa em plantas é beneficiada pelo isolamento e pela análise de mutantes com resposta de defesa alterada, como mutantes na via de síntese do jasmonato que se tornam suscetíveis aos patógenos necrotróficos (Browse, 2009). Mutantes de *A. thaliana* com perda de função dos genes *FADs*, tiveram a suscetibilidade a *Pythium mastophorum* aumentada. Nas plantas silvestres somente 6% tiveram sintomas causados por *P. mastophorum* e uma baixa taxa de infecção nas raízes. Por outro lado, em plantas mutantes para os genes *FAD3*, *FAD7* e *FAD8* mais de 90% mostraram sintomas severos e raízes infectadas por *P. mastophorum* (VIJAYAN *et al.*, 1998).

Outro gene conhecido e de importância na resistência a *Pythium* é o JASMONATE RESISTANT 1 (*JAR1*), que é responsável pela transformação do JA em JA-Ile permitindo que, quando em grandes quantidades, ocorra ligação do complexo JAZ ao complexo SCF-COI1 o qual adiciona uma cauda de ubiquitina o que marca o JAZ para degradação no proteossoma 26S (Browse, 2010). Segundo Staswick *et al.*, (1998), enquanto plantas de *A. thaliana* silvestres apresentaram menos de 10% de sintomas visíveis na interação com *Pythium irregulare*, nas plantas de *A. thaliana* mutantes para *JAR1*, todas mostraram sintomas de infecção pelo patógeno.

A rota de sinalização por ET também tem alguns genes relatados como de grande importância na defesa contra necrotróficos. Estudos mostraram que o produto do gene ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1 (*ERF1*), atua na resistência contra patógenos necrotróficos, como *Botrytis cinerea*, *Plectosphaerella cucumerina* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002) e *Fusarium oxysporum* (Berrocal-Lobo & Molina, 2004). Esse gene expressa um fator de transcrição que é um componente comum das vias de defesa mediadas por ET e JA, sendo ambos necessários para ativação de *ERF1* e para a consequente expressão de genes relacionados à defesa contra patógenos (Lorenzo *et al.*, 2003). Outra importante descoberta recente é o *AtPep 1*, um peptídeo sinal do gene *PROPEP 1*, que induz a superexpressão dos genes envolvidos na defesa, produzindo um fenótipo com maior resistência a *Pythium irregulare*, um patógeno radicular (Huffaker *et al.*, 2006).

2.4 Jasmonato, rota biossintética e função

O JA é um hormônio regulador de crescimento e de diversos outros processos do desenvolvimento de plantas como a germinação de sementes, crescimento radicular, fertilidade, amadurecimento de frutas e importante sinalizador de ferimento e ataque de patógenos, principalmente de necrotróficos. O JA é sintetizado na via dos octadecanóides (Figura 1), e tem como precursor o ácido linolênico, que está presente em grande quantidade na membrana celular de plantas. Na forma livre, esse ácido graxo está em uma concentração insignificante, o que é alterado rapidamente por ferimentos ou ataques de patógenos pela ação da fosfolipase A1 do gene *DAD1* (Loake & Nurmberg, 2003).

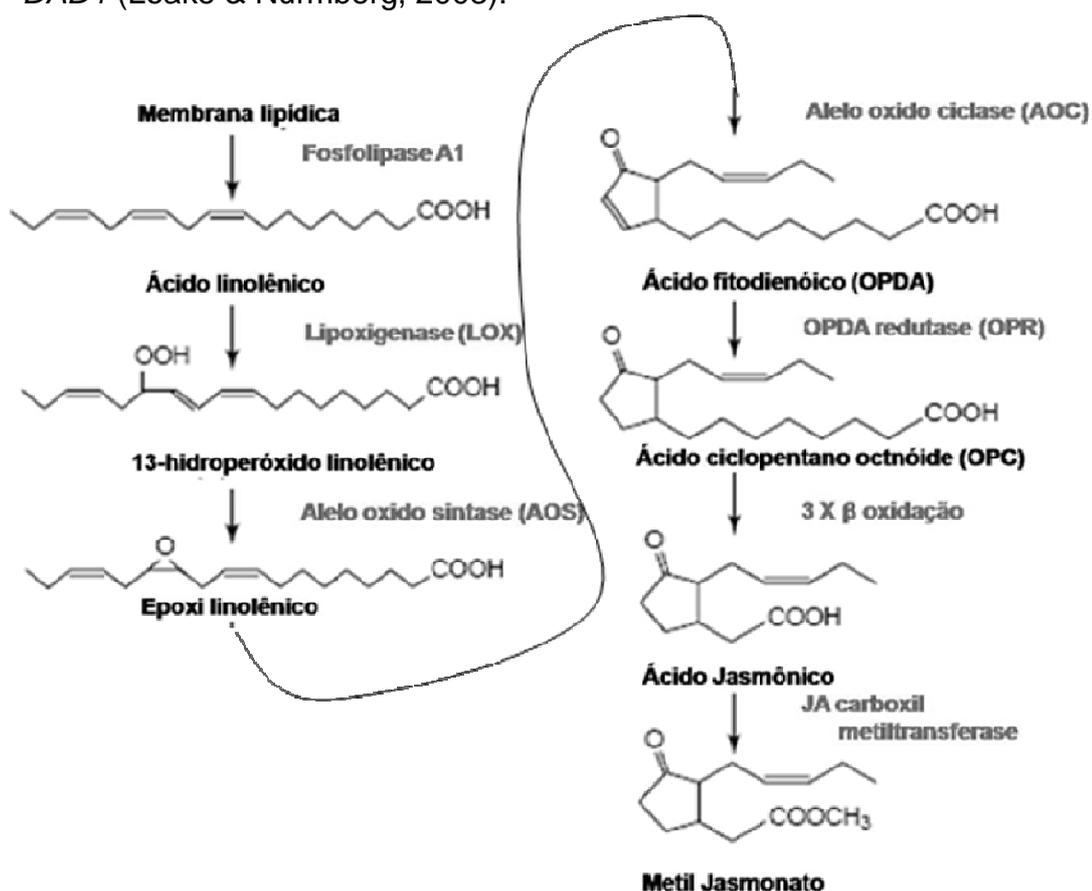


FIGURA 1. Rota biossintética do ácido jasmônico (JA). Adaptado de Cheong & Choi, 2007.

Com a liberação, o ácido linolênico é rapidamente oxidado por ação da lipoxigenase 13 (13-LOX) que incorpora um oxigênio à molécula, formando 13-hidroperóxido linolênico (13(S) - HPOT), que é desidratado pela enzima alelo óxido sintase (AOS). O composto intermediário formado por essa desidratação (ácido 12,13-epoxilinolênico) é ciclicizado pela enzima alelo óxido ciclase (AOC) formando o ácido ciclopentano 12-oxo-fitodienóico (OPDA). O OPDA é reduzido pela redutase de OPDA e posteriormente oxidado por três ciclos de beta-oxidação chegando ao JA. (Acosta & Farmer, 2010)

Em plantas silvestres de *A. thaliana*, essa rota ocorre normalmente, pois, conforme mencionado há uma grande concentração de ácido linolênico nas membranas celulares, mas para que isso ocorra, o ciclo dos ácidos graxos (Figura 2) deve estar com seu funcionamento correto.

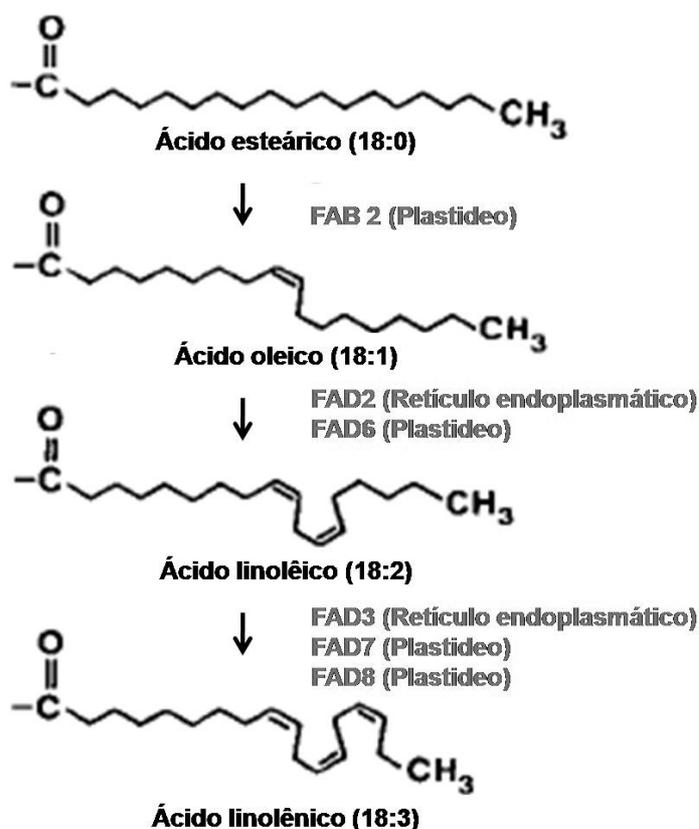


FIGURA 2. Rota de dessaturações dos ácidos graxos.

Alterações no ciclo dos ácidos graxos reduzem ou impedem a formação de ácido linolênico, fazendo com que não ocorra a produção de jasmonato e a sinalização do ataque de patógenos, tornando as plantas altamente suscetíveis. Este tipo de alteração pode ocorrer por mutação em genes da rota biossintética do JA ou genes codificantes de enzimas da rota biossintética dos ácidos graxos, impedindo a formação de ácido linolênico, como nos mutantes *fads*. (Kachroo & Kachroo, 2009). A rota biossintética dos ácidos graxos tem início nos plastídios por ação da Acetil-CoA carboxilase (ACCase) que converte acetil-CoA em Malonil-CoA e, após passar por vários ciclos da atividade de ácido graxo sintase (FAS), termina com a dessaturação dos ácidos graxos C16:0 e C18:0 por enzimas ácido graxo dessaturases FADs. As dessaturações de C16:0 para C16:1 são realizadas pela FAD4 e FAD5 com atividade na plastídeo. Por outro lado, a dessaturação de C18:0 para C18:1 é realizada pela FAB2 (biossíntese de ácido graxo), também com atividade no plastídio (Ohlrogge & Browse, 1995). O ciclo de dessaturação posterior é realizado pela FAD6 no plastídio onde dessatura o C16:1 para C16:2 (hexadecadienóico) e o C18:1 para C18:2 (ácido linoléico), que também é dessaturado pela FAD2 no retículo endoplasmático. Para se obter o ácido linolênico (18:3) e hexadecatrienóico (16:3), deve-se ter a atividade da FAD7 e FAD8 no plastídio e da FAD3 no retículo endoplasmático. (Schaller & Stintzi, 2009).

Após ser formado, o JA é transformado por JAR1 em JA-Ile, que é acoplado ao complexo SCF-COI1. O SCF-COI1 tem um sítio E2 ubiquitina ligase o qual, em presença de JA-Ile, adiciona uma cauda de ubiquitina no repressor (JAZ) marcando-o para degradação. O JAZ é uma proteína que se

liga ao fator de transcrição MYC2, fazendo com que genes responsivos ao ataque de patógenos e herbívoros, não sejam transcritos até que o JAZ seja sequestrado, poliubiquitinado e degradado no proteosoma 26S. Desse modo, os genes responsivos ao JA são transcritos, inclusive o próprio JAZ que pode retro-inibir a síntese, a não ser que sejam mantidos os estímulos e níveis de JA-Ile (Memelink, 2009; Wasternack & Kombrink, 2009; Browse, 2010)

2.5 Silenciamento gênico pós transcricional (PGTS).

O silenciamento, ou RNA de interferência, ocorre em vários organismos. Em animais é conhecido como RNAi e, em fungos, como “*quelling*”. Em plantas, a infecção por vírus aciona um mecanismo de defesa mediado por RNA, denominado de silenciamento de genes pós-transcrição (PTGS).

O silenciamento foi observado pela primeira vez em plantas, quando Napoli *et al.*, (1990), tentaram superexpressar o gene codificante da chalcona sintase, enzima envolvida na pigmentação de pétalas em petúnias. No entanto, algumas das plantas transformadas apresentaram perda na coloração das flores. Análises da acumulação de mRNA de chalcona sintases nestas petúnias, revelaram que o nível de transcritos era baixo, mostrando ter havido perda na atividade tanto do gene endógeno quanto do transgene, motivo pelo qual o fenômeno foi denominado co-supressão (Lecellier & Voinnet, 2004). Tal mecanismo consiste na degradação de duplas fita de RNAs, através da ativação da enzima Dicer-like (DCL). Os

dsRNAs são processados pela Dicer em pequenas moléculas de RNA de interferência (siRNAs) de fita dupla, com tamanho variando de 21 a 26 nucleotídeos. Esses pequenos fragmentos são acoplados em fita simples no complexo de silenciamento induzido por RNA “RNA-induced silencing complex” (RISC), o qual tem 200 kDa e é, geralmente, composto por uma helicase ATPase/RNA, com domínios PAZ, dois domínios catalíticos RNase III e um domínio de ligação ao C-terminal de dsRNA (Filipowicz, 2005). Posteriormente a essa ligação, o complexo RISC utiliza a fita de RNA como modelo para clivar RNA viral ou endógeno (Purkayastha & Dasgupta, 2009).

O maior conhecimento sobre o mecanismo de silenciamento de mRNA, estimulou sua utilização como uma ferramenta na genômica funcional. Sua aplicação tem sido estudada extensivamente e aprimorada para facilitar a investigação de diferentes fenômenos na biologia vegetal e auxiliar a genômica funcional. (Horiguchi, 2004; Godge *et al.*, 2008).

O PTGS é realizado de quatro formas principais. A primeira delas consiste na transformação estável utilizando sequências invertidas e complementares que, ao transcrever, originam um dsRNA em forma de grampo (hpRNA) (Miki *et al.*, 2005). A segunda forma de se obter PTGS é na introdução de transgenes com promotores fortes, pois, segundo Mello e Conte Jr. (2004), um alto nível de expressão do transgene acarreta defeitos no processamento do mRNA, como por exemplo, a falta da cauda de poli-A. Outra forma é a introdução direta de dsRNAs ou hpRNA exógenos na planta, produzidos *in vitro* ou em bactérias (Watson *et al.*, 2005). A quarta forma de se obter o silenciamento é através da infecção direta de vetores virais,

conhecido por silenciamento genético induzido por vírus (VIGS) (Purkayastha & Dasgupta, 2009).

2.5.1 Silenciamento genético induzido por vírus (VIGS)

O termo VIGS foi usado primeiramente por van Kammen em 1997 ao descrever o fenótipo de recuperação de plantas infectadas por vírus. No entanto, desde então, o termo tem sido usado exclusivamente para denominar a técnica envolvendo recombinação de vírus e o silenciamento de genes endógenos (Godge *et al.*, 2008).

Segundo McGinnis (2010), são necessários, no mínimo, 21 a 25 nucleotídeos idênticos de forma orientada entre o gene presente no vetor viral e o gene alvo que se quer silenciar, por outro lado Jackson *et al.*, (2003) obtiveram silenciamento com 11 nucleotídeos idênticos com a sequência alvo em cultura de células humanas. Entretanto, é comum o uso de fragmentos maiores do que 25 nucleotídeos, pois em determinados casos, apenas esses não são suficientes para iniciar o silenciamento. Geralmente, são utilizados fragmentos de 300 a 800 pb da sequência do gene alvo na construção dos vetores (Thomas & Jones, 2001).

Não só a similaridade de sequências é fundamental para a funcionalidade do VIGS. A interação do vírus com a planta hospedeira é, também, muito importante, pois todos os fatores de infecção e movimento, caso não sejam modificados, permanecem como o vírus selvagem e restringem o uso em determinadas espécies ou famílias de plantas (Godge *et al.*, 2008).

Para resolver esta especificidade de vetores a plantas específicas, foram desenvolvidos, nos últimos dez anos, diversos vetores virais. O primeiro a ser utilizado como vetor de VIGS foi o *Tobacco mosaic virus* (TMV), utilizado por Kumagai *et al.*, (1995), para silenciar o gene codificante da enzima fitoeno dessaturase (PDS) em *Nicotiana benthamiana*. Mais recentemente começou a ser utilizado o vetor originado do *potato virus X* (PVX) (Ruiz *et al.*, 1998), que é um vetor mais estável que o TMV, porém possui menos hospedeiros suscetíveis (Brunt, 1996). Entretanto, ambos têm dois sérios impedimentos para o uso na análise funcional, que são os sintomas virais, que muitas vezes prejudicam a avaliação do fenótipo de interesse (Ratcliff, 2001), e a baixa movimentação nas regiões meristemáticas e, conseqüentemente, baixa taxa de silenciamento dos genes destas regiões (Ratcliff, 2001; Hull, 2002). Esse último problema foi parcialmente resolvido com a utilização do vetor baseado no *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), que foi capaz de silenciar um gene meristemático, mas ainda não foi detectado nos meristemas (Peele *et al.*, 2001). Portanto, devido à alta exigência de hospedeiros, aos fortes sintomas virais e à falta de movimento até os meristemas, foi desenvolvido um vetor baseado no *Tobacco rattle virus* (TRV) (Liu *et al.*, 2002a; Ratcliff, 2001).

2.5.2 Vetor Tobacco Rattle Virus (TRV)

O vetor TRV é originado do vírus *Tobacco rattle virus* (TRV), membro típico do grupo tobavirus, tem o genoma bipartido constituído de RNA fita simples com polaridade positiva. O fragmento maior denominado RNA 1, tem três ORFs: a RdRp que corresponde a RNA-polimerase dependente de

RNA, a proteína do movimento (MP), e a 1b. O RNA 2 também tem originalmente três ORFs: CP que corresponde ao capsídeo e as proteínas 2b e 2c. O TRV tem grande dispersão no globo e afeta um grande número de espécies de importância econômica como batata, fumo, tomate e ornamentais bulbosas (Hernandez & Carette, 1996).

As limitações presentes nos outros vetores virais como a pequena gama de hospedeiros e a baixa movimentação nos meristemas, foram superadas com a criação do vetor baseado no TRV (Liu *et al.*, 2002a; Ratcliff *et al.*, 2001). O vetor TRV é capaz de infectar todos os tecidos das plantas, inclusive os meristemas, e também apresenta poucos sintomas de infecção viral se comparado com os demais vetores virais.

Nos últimos anos, o vetor TRV sofreu várias modificações para seu uso como ferramenta de VIGS, principalmente no RNA 2. Uma das primeiras modificações foi a clonagem de um sítio múltiplo de clonagem (MacFarlane, 1999), local usado para ligação das sequências similares aos genes endógenos que devem ser silenciados (Liu *et al.*, 2002a, b; Ratcliff *et al.*, 2001). Outras modificações também foram feitas no RNA 2 do TRV causando diversas alterações na interação com o hospedeiro, como a retirada das ORFs 2b e 2c por MacFarlane & Popovich (2000), e também a clonagem do gene codificante da proteína verde fluorescente (*gfp*).

O uso deste vetor para o silenciamento de genes endógenos tem aumentado muito não somente na espécie *N. benthamiana*, para qual foi desenvolvido, mas em diversas outras, como a espécie modelo *A. thaliana* (Turnage *et al.*, 2002), cevada (Holzberg *et al.*, 2002; Lacomme *et al.*, 2003), tomate (Liu *et al.*, 2002b), batata (Faivre-Rampant *et al.*, 2004), e outras

espécies de Solanáceas como *Capsicum annuum* (Chung *et al.*, 2004), *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana plumbagenifolia*, *Nicotiana glutinosa*, *Solanum pimpinellifolium*, *S. peruvianum*, *Solanum cheesmaniae*, *Solanum indicum* (Senthil-Kumar *et al.*, 2007), *Solanum nigrum* (Hard, 2008), *Solanum bulbucasantu* e *Solanum okadae* (Brignet, 2004).

Diversos genes ligados a resistência em diversas espécies de plantas, já foram silenciados utilizando o vetor TRV como ferramenta, conforme revisado por Purkayastha & Dasgupta, 2009. No entanto, poucos trabalhos mostram silenciamento viral em raiz, devido à falta de movimentação de muitos vetores virais nos meristemas (Ratcliff *et al.*, 2001). Já o vetor TRV com a inclusão da proteína auxiliar 2b, é capaz de se movimentar e infectar tecidos radiculares incluindo meristemas, silenciando genes endógenos nesses tecidos (Valentine & Shaw, 2004). Valentine & Shaw, (2004) demonstraram o silenciamento de diversos genes na raiz de *N. benthamiana*, *A. thaliana* e tomate. Foram silenciados *GFP* de plantas transgênicas, o gene (*RHL1*) e β tubulina ligado à formação de pelos radiculares, *TTG 1* ligados ao desenvolvimento radicular, raiz sem meristema 1 “root meristemless1” (*RML 1*) ligados ao crescimento de raízes secundárias e o *Mi* ligado a resistência a nematóides em tomate, o qual perdeu a resistência após o silenciamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e isolados de *Pythium* spp.

Plantas de *Arabidopsis thaliana*, ecótipo Columbia, e isolados de *P. deliense*, *P. dissotocum* e *P. ultimum* foram utilizados para a realização dos testes de avaliação da resistência. As sementes de *A. thaliana* e os isolados de *Pythium* utilizados fazem parte da coleção de isolados do Laboratório de Fitopatologia Molecular da UFRGS. Previamente à semeadura, sementes de *A. thaliana* foram submetidas à quebra de dormência por vernalização. As sementes foram imersas em água destilada e expostas a uma temperatura de 4°C durante 5 dias no escuro, segundo metodologia adaptada de Zhang *et al.*, (2006). Após este período, foi realizada a semeadura em bandejas de isopor contendo o substrato comercial Plantmax HT® autoclavado. As placas de isopor com 24 alvéolos foram colocadas em flutuação em bandejas plásticas com água destilada e mantidas em câmaras de crescimento com fotoperíodo de 16 h de luz e temperatura de 22 ± 2 °C (Zhang *et al.*, 2006). As plantas foram irrigadas por “flutuação” sendo que de 15 em 15 dias eram adubadas com solução nutritiva contendo 1g de NPK 20:20:20 por litro de água.

Os isolados foram mantidos em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura de farinha de milho “Corn meal” (CM), composto por 17 g.L⁻¹

de farinha de milho e 15 g.L^{-1} de ágar, acrescido de 100 mg.L^{-1} do antibiótico ampicilina e 20 mg.L^{-1} do fungicida Benomyl. As placas foram armazenadas a 4°C .

Dois experimentos foram realizados, utilizando diferentes formas para a produção do inóculo. Primeiramente, foram usados três isolados de *Pythium*, onde um bloco de $1 \text{ cm} \times 1$, contendo meio CM com micélio do patógeno foi retirado da placa estoque e re-inoculado em placas de Petri contendo meio CM e crescidos por 5 dias a 28°C no escuro. Após este período, novos cortes de blocos de 1 cm^2 foram misturados em um Erlenmeyer com 200 g de aveia autoclavada e mantidos por 30 dias a 28°C . Para homogeneidade do inóculo, passado os 30 dias os grãos de aveia foram macerados com 500 ml de água destilada autoclavada. No segundo experimento, foi utilizado somente micélio do isolado *P. deliense*. Um bloco de 1 cm^2 de meio CM com micélio do patógeno foi retirado da placa estoque e re-inoculado em placas de Petri contendo meio CM e crescidos por 15 dias a 28°C , no escuro. Após os 15 dias o meio de cultura da placa foi cortado em blocos de $1,3 \times 0,7 \text{ cm}$ que foram utilizados como inóculo.

3.2 Extração de RNA total e isolamento de mRNA

As raízes de *A. thaliana* armazenadas em nitrogênio líquido foram submetidas a extração de RNA total. O RNA total foi extraído de aproximadamente 100 a 200 mg de tecido triturado na presença de nitrogênio líquido segundo Bugos *et al.*, (1995). Foram acrescentados 400 μL de tampão de extração de RNA [100 mM de Tris-HCl (pH 9,0); 200 mM

de NaCl; 15 mM de EDTA; e 0,5 % de SDS], 2,3 μ L de 2-mercaptoetanol, 400 μ L de solução de fenol equilibrado com pH 8,0 e 80 μ L de uma mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v:v). Após a homogeneização em um agitador tipo vórtex por 2 min, foram acrescentados 28 μ L de acetato de sódio 3 M (pH 5,2). Nova agitação vigorosa foi realizada por 1 min, seguida de uma incubação no gelo por 15 min. Posteriormente, foi realizada centrifugação a 16.000 x g por 10 min a 4 °C. Ao líquido sobrenadante, foram acrescentados 400 μ L solução de fenol equilibrado com pH 8,0 e 80 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v:v), seguida de agitação vigorosa por 2 min e centrifugação a 16.000 x g por 5 min a 4 °C. Esse procedimento foi repetido com o líquido sobrenadante obtido após a centrifugação. Após, os ácidos nucleicos foram precipitados através da adição de 500 μ L de isopropanol, incubados por aproximadamente 1 h a -20°C, e centrifugados a 10.000 x g por 10 min a 4 °C. O líquido sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500 μ L de etanol 70 % ao precipitado, seguido de centrifugação a 10.000 x g por 5 min a 4 °C. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente. Após, o precipitado foi ressuspenso em 82,5 μ L de água ultra pura (Milli-Q) e incubado à temperatura ambiente por 10 min. A precipitação seletiva de RNA foi realizada com a adição de 37,5 μ L de cloreto de lítio 8 M e da incubação no gelo durante 3 h, seguida de centrifugação a 10.000 x g por 10 min a 4 °C. O líquido sobrenadante contendo o DNA foi retirado e a lavagem do precipitado foi realizada com 500 μ L de etanol 70 % seguida de centrifugação a 10.000 x g por 5 min a 4 °C. O precipitado permaneceu em temperatura ambiente

até secar e foi ressuspendido em 50 μL de água ultra pura. O RNA foi incubado por 10 min à temperatura ambiente antes de ser armazenado à -20 °C.

A concentração de RNA total foi estimada através da leitura em espectrofotômetro (Smart SpecTM Plus, Bio-Rad) pela absorvância a 260 nm (A_{260}), utilizando como padrão 1 ($A_{260}= 1$ equivale a uma concentração de 40 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ de RNA). A qualidade do RNA extraído foi avaliada por espectrofotometria pela relação OD260/280 nm e por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1 %, contendo tampão TBE [90 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 90 mM de H_3BO_3 e 2 mM de EDTA. O gel foi corado com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g. mL}^{-1}$), fotografado e analisado através do sistema de fotodocumentação computadorizado de análise de gel (Kodak Digital Science 1D-EDAS 120).

Para obtenção dos mRNAs das amostras foi utilizado aproximadamente 30 ng. μL^{-1} de RNA total extraído que foi submetido ao sistema “PolyAtract® mRNA Isolation System III” (Promega), segundo as instruções do fabricante.

3.3 Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA de fita simples (ss cDNA), os mRNAs foram submetidos à reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Para transcrição reversa (RT), foi adicionado ao mRNA 320 μM de cada dNTP, tampão 1x (Invitrogen), contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 3 mM de MgCl_2 e 6,6 mM ditioneitol (DTT); 1,32

μ M de oligonucleotídeo antisenso oligo dT (5' – TTTTTTTTTTTTTTTTTT – 3') e 6,4 U de enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen). A reação foi incubada a 37 °C por 1h.

3.4 Obtenção do clone atFAD7

Como o objetivo era silenciar os três genes codificantes de *FADs* (3, 7 e 8) comparou-se a sequência de nucleotídeos dos respectivos genes *FAD3* (AT2G29980), *FAD7* (AT3G11170), *FA8* (AT5G05580) pelo programa Clustal X 2.0.9 (Thompson *et al.*, 1997), a fim de identificar uma região conservada entre eles. Após, foram projetados oligonucleotídeos iniciadores para amplificar a região. Na extremidade 5' do oligonucleotídeo iniciador foram adicionados oligonucleotídeos para gerar um sítio de reconhecimento das enzimas de restrição (marcado em cinza na sequência). (FADsi F 5'- TGG TTA ACT GGA CKG CAA TGG CTG C -3' e FADsi R 5'- ATG AAT TCA CTG GTT TAG CWG CTT C -3'). Para projetar estes oligonucleotídeos iniciadores também foi levado em conta o tamanho do inserto a ser clonado, pois segundo Liu & Page (2008) este deve ter entre 200 e 1000 pb. Também foi considerada a similaridade entre as sequências de nucleotídeos dos mRNAs dos genes *FAD3*, *FAD7* e *FAD8*, a qual deveria ser a maior possível entre dois dos genes, a temperatura de pareamento, que é variável com a porcentagem de citosina e guanina (CG), a formação de homômeros, heterodímeros e estruturas secundárias.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados pela “Integrated DNA Technologies” (IDT[®]) e utilizados na reação de PCR a uma

concentração de 0.6 μM . A PCR foi composta também por 0,3 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Invitrogen); 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl; 3,75 mM MgCl_2 ; e 2 μL de cDNA de raiz de *A.thaliana* contendo aproximadamente 10 ng e água deionizada, totalizando um volume final de 20 μL . A PCR foi realizada em um termociclador PTC - 100™ (MJ Research, Inc.), com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 30s, pareamento a 52 °C por 30s, extensão a 72 °C por 1 min, seguido de uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os oligonucleotídeos iniciadores projetados deveriam então amplificar um fragmento com 325 pb.

O produto da reação foi analisado através do perfil eletroforético obtido em gel de agarose 2% contendo tampão TBE 1x, com o auxílio do marcador de massa molecular 1 Kb DNA Ladder (Gibco BRL), seguido da exposição em solução contendo brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g. mL}^{-1}$). O gel foi visualizado sob luz UV e fotografado através do sistema de fotodocumentação computadorizado Kodak Sciences 2d. Confirmado o tamanho previsto através da análise da sequência *in silico*, este fragmento foi clonado no vetor de clonagem pGEM T® Promega® conforme indicação do fabricante, utilizando 5 μL de 2X Tampão de ligação rápida T4 DNA Ligase, 1 μL de vetor pGEM®-T (50ng), 3 μL da reação de PCR e 1 μL de enzima T4 DNA Ligase.

O vetor pGEM T foi inserido em células eletrocompetentes da estirpe XL-1 Blue (Stratagene, CA, USA) de *Escherichia coli* utilizando o eletroporador MicroPulser™ (BIO RAD), seguindo as instruções do

fabricante. Primeiramente, 2 μL da reação de ligação foram misturados a 40 μL de células eletrocompetentes e incubadas durante 1 min no gelo, seguindo da eletroporação em cubetas de 0,1 cm (BIO RAD). Aplicou-se um pulso de 1,8 kV e, imediatamente, foi acrescentado 1 mL de meio LB (Luria-Bertani) líquido e, após serem ressuspendidas por pipetagem, as células foram transferidas para tubos de vidro e incubadas por 1 h a 37 °C sob agitação de 225 rpm. Após 1 h, uma alíquota de 100 μL das bactérias foi distribuída em meio LB sólido, acrescido de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IPTG e de 0,8 mg de X-Gal, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina e 15,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de tetraciclina e cultivada a 37 °C por 16h.

Sob condições assépticas, parte de cada colônia clara (recombinante) foi adicionada à reação da PCR com o auxílio de uma ponteira de 0,2 mL autoclavada e replicada em nova placa com LB sólido e mesmas condições. A reação de PCR foi constituída de 0,3 mM de cada dNTP; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM de KCl; 2,0 mM de MgCl_2 ; 0,5 μM de cada oligonucleotídeo pUC/M13 Senso (5'- CGC CAC GGT TTT CCC AGT CAC GAC -3') e pUC/M13 Antisenso (5'- TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C -3'); 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água ultra pura até completar o volume de 20 μL . A reação foi incubada no termociclador PTC-100™ (MJ Research) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, pareamento a 50 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 1 min, seguido de uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos da reação foram

visualizados por eletroforese em gel de agarose (Gibco/BRL) a 1,5 %, corado com brometo de etídio.

3.5 Reação de sequenciamento

O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal do Centro de Biotecnologia da UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), através do sistema “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit for MegaBACE DNA Analysis Systems” no sequenciador automático MegaBACE (Amersham Biosciences), utilizando 100 ng do produto de PCR da etapa anterior, tratado com as enzimas exonuclease I (EXO I) e a fosfatase alcalina de camarão (SAP), por 30 min a 37 °C e 15 min a 65 °C, conforme instruções do fabricante, e 0,25 µM do oligonucleotídeo iniciador universal pUC/M13 Antisenso (5'- TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C -3'), seguindo as instruções do fornecedor. Os eletroferogramas obtidos do sequenciamento foram analisados através do programa Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd). Após, foi realizada a comparação da sequência obtida com as sequências de nucleotídeos depositadas no GenBank (BLASTn): National Center of Biology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), através do programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

3.6 Extração de plasmídeos recombinantes

A extração de plasmídeos foi baseada na técnica descrita por Brasileiro & Carneiro (1998). Três colônias foram transferidas para 3 mL de meio LB líquido com adição de tetraciclina (15 µg. mL⁻¹) e de ampicilina

(50 μ g. mL⁻¹). O meio foi mantido sob agitação (225 rpm) em torno de 24 h a 37 °C. As células foram coletadas por centrifugação a 4.000 x g durante 5 min à 4 °C. Em seguida, foram ressuspensas em 200 μ L de solução P1 (RNase 100 μ g. mL⁻¹; Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM), seguida de adição de 200 μ L da solução P2 (NaOH 200 mM; SDS 1 %), invertendo o tubo para completa homogeneização e observando a formação de uma solução viscosa indicando lise celular. Após, foi adicionado 200 μ L da solução P3 (acetato de potássio 3 M, pH 5,5), invertendo o tubo para a homogeneização, seguida de centrifugação a 16.000 x g por 10 min. A fase superior foi transferida para novo tubo e foram realizadas duas extrações pela adição de igual volume (aproximadamente 500 μ L) de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v:v) e agitação, seguida de centrifugação 16.000 x g por 2 min. Para a precipitação do material, utilizou-se igual volume de isopropanol (aproximadamente 500 μ L) e 10 % de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e foi mantido durante 2 h a -20 °C e centrifugação a 16.000 x g durante 15 min a 4 °C. O precipitado obtido foi lavado com 1 mL de etanol 70 %, centrifugado a 16.000 x g por 5 min a 4 °C e ressuspensado em 50 μ L de água ultra pura. A concentração dos plasmídeos foi estimada pela análise do perfil eletroforético visualizado em gel de agarose 1 % (TBE 1x) com o auxílio do marcador de massa molecular λ HindIII (Invitrogen).

3.7 Transformação do vetor TRV

O vetor viral TRV (Figura 3) foi cedido gentilmente por Jane Shaw e Christophe Lacomme do Instituto de Pesquisa Agrícola da Escócia, Dundee.

O TRV é dividido em TRV1, que contém uma proteína responsável pela replicação, uma proteína ligada ao movimento viral e uma terceira proteína; o qual não é manipulado somente multiplicado e inserido em bactérias e o TRV2b-GFP, que tem a proteína responsável pela produção do capsídeo, a proteína 2b ligada ao movimento na raiz e o sítio de clonagem múltipla, o qual possui os sítios de restrição das enzimas *HpaI* e *EcoRI*, introduzidos pelos oligonucleotídeos projetados para a clonagem do fragmento conservado entre os genes *FAD3*, *FAD7* e *FAD8*.

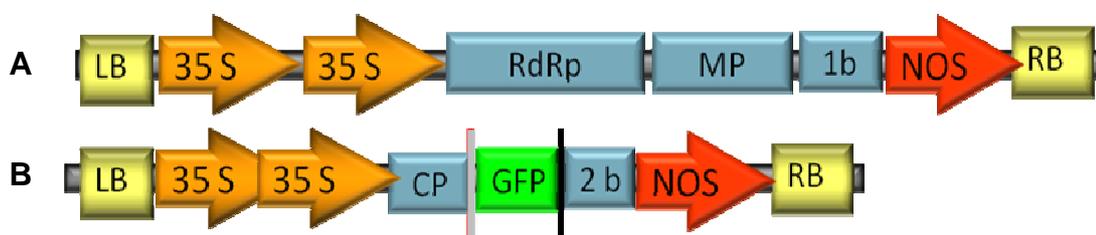


FIGURA 3. Representação gráfica do vetor TRV. A. Vetor TRV1. B. Vetor TRV2b-GFP. Linha cinza sítio de clivagem *EcoRI* e linha preta *HpaI*.

Após a confirmação por sequenciamento, o plasmídeo pGEM extraído e o vetor TRV2b-GFP foram digeridos com as enzimas *HpaI* e *EcoRI*. Para isso, 100 µl da suspensão de plasmídeo foi incubada a 37 °C por 12 h com 12 µl de tampão 4 (10 x) (BioLabs), 12 µg de BSA (BioLabs), 12 U de *HpaI* (BioLabs), 12 U de *EcoRI* (BioLabs) e água Milli-Q até o volume final de 120 µl. Após a digestão, os 120 µl das reações foram aplicados em gel de agarose (Invitrogen) a 1 % corado com brometo de etídio, depois o gel foi visualizado no transluminador e as bandas com os tamanhos referentes ao do TRV2b e do inserto atFAD7 foram isoladas e purificadas através do NucleoSpin®ExtractII (Macherey-Nagel) e quantificadas através da

visualização em gel de agarose 1 % (TBE 1x) com o auxílio do marcador de massa molecular λ HindIII (Invitrogen).

A ligação do inserto atFAD7 ao vetor TRV2b foi realizada com 2.5 μ l de tampão para ligações rápidas 2 X (Promega), 100 ng de vetor (13000 pb), 7 ng do inserto (260 pb), 1 U de T4 DNA ligase (Promega) e água Milli-Q para completar o volume final de 5 μ l. As reações foram incubadas a 4 °C por cerca de 12 h. Após, o produto da ligação foi transformada em *E. coli* XLI como descrito anteriormente, e foi verificada a inserção do inserto atFAD7 por PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos do vetor (TRV F 5'-GAG CAT AAT TAT ACT GAT TT -3' e TRV R 5'-CGA GAA TGT CAA TCT CGT AGG -3', posteriormente este fragmento foi sequenciamento como descrito no item 3.5. Após o plasmídeo recombinante TRV2b-FAD7, foi extraído conforme descrito no item 3.6 e transformado em *A. tumefaciens*.

3.8 Transformação de *A. tumefaciens*

Os plasmídeos TRV2b-FAD7 foram utilizados para transformação de células de *A. tumefaciens* GV3101, as quais contêm o gene que confere resistência ao antibiótico rifampicina. A seleção de bactérias transformadas foi realizada com a adição de canamicina ao meio de cultura, cuja resistência é conferida pelo vetor TRV2b-FAD7.

As células de *A. tumefaciens* GV3101 foram gentilmente fornecidas por José Antônio Peters, do departamento de Botânica, do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas e foram transformadas conforme descrito no manual de instruções do eletroporador Micro Pulser™

(BIO RAD). Primeiramente, 2 μL da reação de ligação foram misturados a 20 μL de células eletrocompetentes e incubadas durante 1 min no gelo, seguindo da eletroporação em cubetas de 0,1 cm (BIO RAD). Aplicou-se um pulso de 1,8 kV e, imediatamente, foi acrescentado um mL de meio LB (Luria-Bertani) líquido e, após serem ressuspendidas, por pipetagem, as células foram transferidas para tubos de vidro e incubadas por 3 h a 28 °C sob agitação de 180 rpm. Após 3 h, uma alíquota de 100 μL das bactérias foi plaqueada em meio LB sólido, acrescido de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicina e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de canamicina. As placas foram incubadas em estufa a 28 °C por 48 h até o momento da visualização das colônias bacterianas recombinantes.

3.9 Agro-infiltração

As plantas de *A. thaliana* foram infiltradas quando as mesmas tinham de 7-8 folhas, 25 dias após a emergência. Três colônias de *A. thumefaciens* GV3101 transformadas com o TRV2b-FAD7 e três transformadas com TRV1 foram cultivadas por 12 h a 28°C em 3 mL de LB líquido com 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicina e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de canamicina, posteriormente 50 μL de cada pré-inóculo foi adicionado a 50 mL de LB líquido com mesma concentração dos antibióticos. A cultura de bactérias foi cultivada até atingirem uma leitura de $\text{OD}_{600} = 1$, alcançada a concentração a cultura foi transferida para um frasco tipo Falcon e as bactérias foram precipitadas por centrifugação a 6000 rpm por 10 min. O precipitado de bactérias foi ressuspendido em 50 mL de tampão de inoculação, contendo 1mM de MES (pH 5), 10 mM de MgCl_2 e

100 μ M de acetoseringona, mantido a temperatura ambiente por 4 h até o uso na infiltração.

Após 4 h, a suspensão de *A. tumefaciens* com TRV1 foi misturada às células com *A. tumefaciens* com TRV2b-FAD7 (vetor de silenciamento) ou TRV2b-GFP (controle) em volumes iguais. Foram infiltradas 2 folhas superiores de cada planta com cerca de 20 μ L em cada folha com o auxílio de uma seringa de 1 mL. Foram infiltradas 16 plantas em cada bandeja com TRV2b-FAD7 e 8 plantas com TRV2b-GFP.

3.10 Avaliação da interação entre *A. thaliana* e isolados de *Pythium* sp.

As plantas agro-infiltradas com *A. tumefaciens* GV 3101 (item 3.7), foram mantidas em sala de cultivo por mais 15 dias após a agro-infiltração. As plantas foram então inoculadas com os patógenos os quais foram colocados em cada uma das 24 células separadamente, entre estas células 16 plantas receberam TRV2b-FAD7 e 8 receberam o TRV2b-GFP, o qual não é esperado que cause alteração na quantidade de nenhum mRNA endógeno da planta. Neste experimento foi utilizado 3 ml de solução inóculo como descrito no item 3.1. A bandeja controle continha apenas as sementes de *A. thaliana* e os grãos de aveia autoclavados. Transcorridos 10 dias após a inoculação, as plantas foram avaliadas a fim de verificar a patogenicidade dos isolados, quando inoculados em plantas infiltradas com o vetor viral TRV2b-GFP ou com o vetor viral TRV2b-FAD7.

Os sintomas foram avaliados aos 10 dias após a inoculação, utilizando-se a escala diagramática, conforme Tabela 1, podendo as notas

serem oriundas da doença, senescência e infecção viral. Foi avaliado o comprimento das raízes, registrado em sistema digital e analisado no software ImageJ 1.4g. (Rasband WS, National Institute of Health, Bethesda, USA).

As raízes de todas as plantas foram congeladas em nitrogênio líquido para extração de RNA e análises de expressão gênica. Raízes de *A. thaliana* também foram separadas e analisadas por microscopia ótica quanto a presença de estruturas do patógeno.

TABELA 1. Escala de sintomas em *Arabidopsis thaliana*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2010.

Nota	Sintomatologia
0	Plantas sem sintomas
1	Até 20% das folhas amarelecidas
2	De 21 a 50% de folhas amarelecidas e 10% de folhas com murcha
3	De 51 a 80% das folhas amarelecidas e 50% das folhas com murcha e podridão
4	Mais de 80% das folhas amarelecidas e mais de 60% com murcha e podridão

3.11 Restituição do fenótipo

As plantas de *A. thaliana* foram cultivadas conforme item 3.1. Aos 25 dias após a emergência e com 7 a 8 folhas, as plantas foram agro-infiltradas conforme item 3.9. A inoculação foi realizada com o isolado de *P. deliense* após 15 dias da agro-infiltração. Foram utilizados dois blocos de CM de

inóculo como descrito no item 3.1. A bandeja controle recebeu apenas as sementes de *A. thaliana* e blocos de CM sem a presença de *P. deliense*.

O teste de restituição de fenótipo foi realizado 15 dias após a agro-infiltração. Foram utilizados dois tratamentos, sem e com MeJA (Sigma), cada um com seis bandejas, destas seis, três sem e três com *P. deliense*. As plantas de *A. thaliana* foram cultivadas conforme item 3.1 e agro-infiltradas conforme item 3.9. A cada dois dias foram adicionados 5 ml de MeJA na concentração de 15 μ M (Vijayan, 1998). A avaliação da resistência a inoculação ao isolado de *P. deliense* foi realizada aos 15 dias após a inoculação conforme Tabela 1. O comprimento das raízes foi avaliado conforme descrito no item 3.10 e estas foram congeladas em nitrogênio líquido para extração de RNA e análises de expressão gênica.

3.12 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

A expressão gênica nas raízes de *A. thaliana* foi determinada pelo método de quantificação relativa por PCR em tempo real. Os pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram Gapdh-F e Gapdh-2R para o controle endógeno, FAD3_F e FAD3_R para o gene *FAD3*, atFAD7_F e atFAD7_R para o gene *FAD7*, FAD8_F e FAD8_R para o gene *FAD8*, PDF_F e PDF_R para o gene *PDF1.2*. As sequências dos oligonucleotídeos são descritas na Tabela 2. A especificidade das condições aplicadas ao RT-qPCR foi verificada através de gel de agarose, conforme condições detalhadas no item 3.4 e da curva de dissociação realizada após a reação de amplificação de acordo com as seguintes condições: 95 °C (15 s), 60 °C (1 min), 95 °C (15 s) e 60 °C (15 s).

As amostras para realização da PCR consistiram de 8 µL de cDNA diluído (50 vezes), obtido conforme item 3.3. A reação da qPCR foi realizada com 0,1 mM de cada dNTP; 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM de KCl; 2,0 mM de MgCl₂; 1X Sybr® Green (Invitrogen), 0.025 U de Taq Platinum® (Invitrogen), 0,375 µM do fluoróforo ROX (Invitrogen) e 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador.

A reação de termociclagem foi executada em termociclador para PCR em tempo real modelo 7300 Applied Biosystems. As condições da reação consistiram de 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C e 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C. O sinal verde fluorescente do fluoróforo SYBR foi normalizado pela referência passiva (corante ROX) (Invitrogen). O limiar de fluorescência foi estabelecido no início da curva representando a taxa de amplificação do amplicom. O número de ciclos pelo qual a fluorescência passou o limiar (C_T) para cada reação foi calculado pelo programa “7000 System SDS – Sequence detection, version 1.4” (Applied Biosystem) e posteriormente exportados para planilhas do programa “Microsoft Excel” para análise.

TABELA 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR.

	Direto (5' a 3')	Reverso (5' a 3')	Tamanho (pb)
Gapdh F / 2R	GAAATGCATCTTGCACTACC AACTGTCTTGC	CTGTGAGTAACCCATTCA TTATCATACCAAGC	243
atFAD7 F / R	GAAATTGAGAGACGATAAGC AAAGTAGAAAAC	CCATTAGAACTTGAGCTCT CTCCCC	153
FAD3 F / R	ACTTGGTGGAGAGTTTGGTC GC	AAAGTGGGCTGGTTTATTC CTAATAGACG	168
FAD8 F / R	CAGTGAACCAGGCAGACAA GTTACATAAA	TATTTCAATTTGATCGAGAGT TTTACCACAGG	120
PDF 1.2 F / R	TCTTTGGTGCTAAATCGTGT G	AACAACAACGGGAAAATAA ACA	110

O nível de expressão de cada amostra de cDNA foi obtido através da normalização pelo gene endógeno Gapdh (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) (Shih *et al.*, 1991). Os níveis de quantificação relativa do transcrito pelo gene de referência (ΔC_T) foi determinado pela subtração do C_T do gene endógeno do C_T do gene alvo pela função $\Delta C_T = C_T(\text{gene alvo}) - C_T(\text{gene endógeno})$. Para comparar níveis de expressão entre plantas TRV2b-FAD7 e TRV2b-GFP, com e sem o patógeno, a função $\Delta\Delta C_T$ foi primeiramente determinada usando a equação segundo Livak & Schmittgen, 2001.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{planta tratada}) - \Delta C_T(\text{calibrador, planta não tratada})$$

3.13 Análise estatística

A análise estatística dos dados de severidade foi realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e foi utilizado o programa estatístico BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2005). A análise de variância foi realizada para o comprimento das raízes. Foi utilizado o programa estatístico System Análisis Statistic SAS versão 8 (SAS Institute, 2002). As médias dos comprimentos das raízes foram comparadas pelo teste de Duncan, ao nível de 5 % de probabilidade. As correlações entre o comprimento e as notas de severidade foram realizadas pela correlação de Spearman (Zar, 2009).

A análise estatística dos dados de expressão relativa foi realizada calculado o coeficiente de variação entre as repetições técnicas da reação de RT-PCR (Livak & Schmittgen, 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise *in silico*

Na análise do alinhamento das sequências de nucleotídeos, foi possível verificar similaridade entre os mRNAs dos genes *FAD3*, *FAD7* e *FAD8*. O alinhamento das sequências dos nucleotídeos do cDNA correspondente ao mRNA dos genes *FAD7* e *FAD8* possui uma similaridade de 86% e uma região idêntica de 87 nucleotídeos sequenciais (Apêndice 1), que conforme Liu & Page (2008), é longa o suficiente para causar o silenciamento. Esta sequência de 87 nucleotídeos sequenciais, é a maior do alinhamento entre os genes *FADs*, e foi selecionada para estar presente na região clonada.

O alinhamento da sequência de nucleotídeos do cDNA correspondente ao mRNA do gene *FAD3* e da região interna aos oligonucleotídeos iniciadores (Apêndice 2), possui uma similaridade de 63%, duas sequências de 11 nucleotídeos idênticos sequenciais e uma sequência de 12 nucleotídeos sequenciais. Jackson *et al.*, (2003) concluíram em seu trabalho que a identidade de apenas 11 nucleotídeos sequenciais são suficientes para induzir silenciamento em cultura de células humanas. Existindo assim a possibilidade de silenciamento dos três genes *FAD3*, *FAD7* e *FAD8*, com a agro-infiltração do vetor TRV2b-*FAD7*.

4.2 Clonagem de um fragmento do cDNA *FAD7*

O perfil eletroforético da reação de PCR, com os oligonucleotídeos iniciadores projetados a partir da sequência conservada confirmou o tamanho esperado (Figura 4 a).

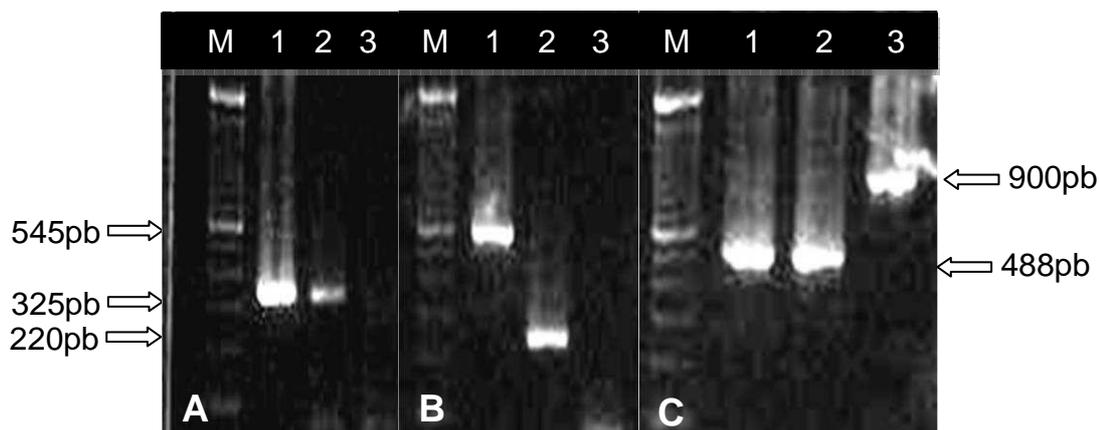


FIGURA 4. Perfis eletroforéticos em gel de agarose da amplificação de *FAD7*. A) 1 e 2 Amplificação de cDNA de *Arabidopsis thaliana* com oligonucleotídeos iniciadores FAD F e R. 3 Controle negativo B) Amplificação de plasmídeo pGEM T com oligonucleotídeos iniciadores M13 F e R, 1 Plasmídeo recombinante. 2 Plasmídeo vazio. 3 Controle negativo C) Amplificação de plasmídeo TRV2b com oligonucleotídeos iniciadores TRV F e R, 1 e 2 TRV2b-*FAD7* e 3 TRV2b-GFP. M= marcador de massa molecular 1 Kb (DNA Ladder, Invitrogen). UFRGS, Porto Alegre/RS, 2010

Após a transformação, as amplificações das colônias claras (recombinantes) apresentaram um produto amplificado de 545 pb compatível com a inserção do fragmento do gene *FAD7* e as colônias não recombinantes apresentaram um tamanho de 220 pb (Figura 4 b).

A clonagem pode ser verificada na Figura 4 c, onde os produtos de 900 pb são amplificações de plasmídeos não digeridos, portanto com o GFP (737 pb) mais as bordas do vetor TRV (163 pb), e as amplificações de 488

pb são oriundas de colônias recombinantes (325 pb atFAD7) mais as bordas do vetor TRV (163 pb). A comparação do fragmento sequenciado (Apêndice 3) com a sequência correspondente do gene *FAD7* depositada no GENBANK mostrou uma identidade de 100%.

4.3 Efeito da agro-infiltração de TRV2b-FAD7 na resistência a *Pythium* sp.

Trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Fitopatologia Molecular da Faculdade de Agronomia da UFRGS demonstraram que *P. deliense*, *P. dissotocum* e *P. ultimum* são patogênicos a *A. thaliana* e diferem na severidade da doença (Trivilin, 2008; Medeiros, 2008). Segundo Medeiros (2008) a infecção por *P.ultimum* em plântulas de tomate é mais rápida, levando a morte, já o isolado da espécie *P. deliense* apresenta uma severidade inferior ao *P. ultimum*, mas porém, superior ao *P. dissotocum* e *P. inflatum* que não diferem entre si. Trivilin (2008) em seu trabalho relatou em *A. thaliana* resultados de severidade similares aos encontrados por Medeiros (2008) entre os isolados de *Pythium* sp., onde a maior incidência de plantas com sintomas era nas inoculadas com *P. ultimum* seguida pela incidência de plantas inoculadas com *P. deliense* e ainda menores os sintomas da infecção por *P. dissotocum* e *P. inflatum*.

A Figura 5 apresenta a escala de alterações do fenótipo das plantas agro-infiltradas com TRV2b-GFP e TRV2b-FAD7, inoculadas com os três isolados de *Pythium*.

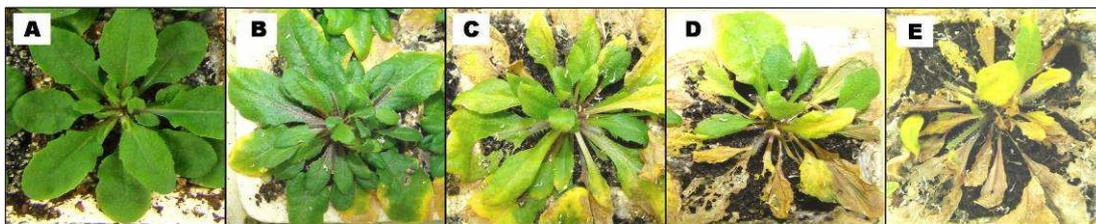


FIGURA 5. Plantas de *Arabidopsis thaliana* agro-infiltradas. As letras A, B, C, D e E referem-se às notas 0, 1, 2, 3 e 4, respectivamente. UFRGS, Porto Alegre/RS, 2010

Através da comparação das médias de notas das plantas agro-infiltradas com o vetor TRV2b-GFP e inoculadas com os diferentes isolados de *Pythium* sp. (Figura 6), verifica-se que somente as plantas inoculadas com o isolado *P. ultimum* diferiram significativamente das plantas sem inoculação. Este isolado foi o mais patogênico, dados que corroboram com os encontrados por Medeiros (2008), onde o isolado de *P. ultimum* foi o melhor sucedido na infecção, causando um rápido aumento da severidade da doença. Os demais tratamentos, com a agro-infiltração do vetor TRV2b-GFP não diferiram significativamente do tratamento controle.

Por outro lado, quando comparadas as médias das plantas agro-infiltradas com o vetor de silenciamento TRV2b-FAD7 (Figura 6), as plantas inoculadas com o isolado *P. deliense* e *P. ultimum* diferiram significativamente das plantas não inoculadas, mas não apresentaram diferença significativa entre si. Uma vez que o isolado *P. deliense*, apresentou-se tão agressivo quanto *P. ultimum*. A alteração do fenótipo de resistência para suscetibilidade observada nas plantas agro-infiltradas com TRV2b-FAD7, quando inoculadas com *P. deliense* foi a razão pela qual, o isolado foi selecionado para posterior análises.

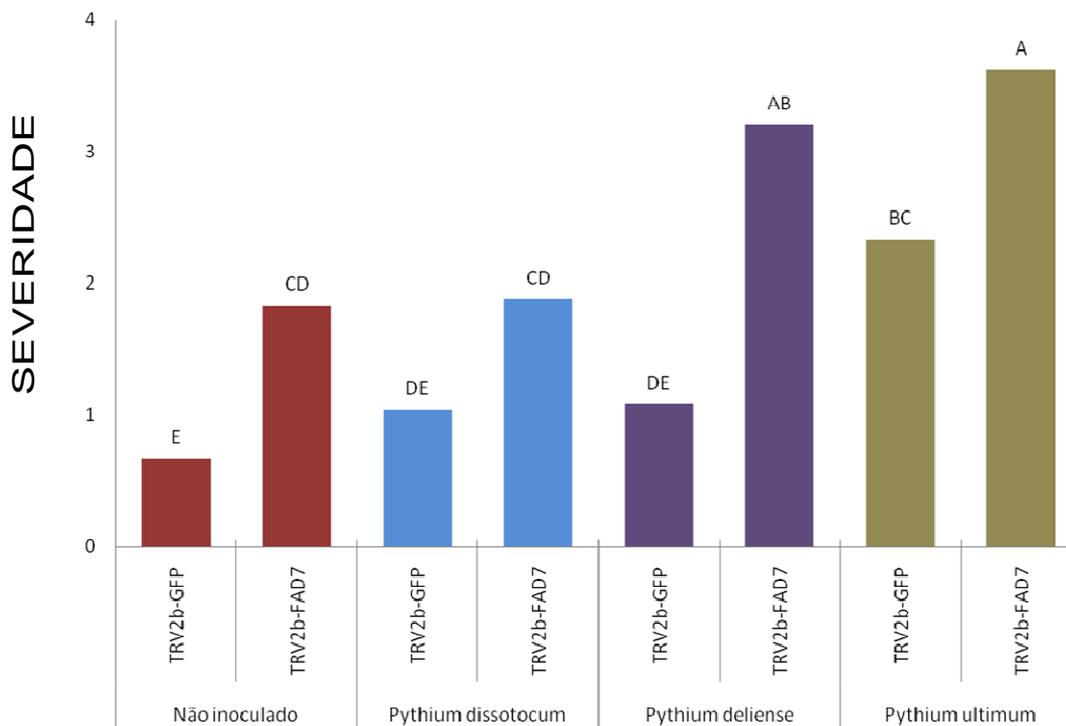


FIGURA 6. Resistência de *Arabidopsis thaliana* a isolados de *Pythium* sp. Médias de notas atribuídas ao fenótipo das plantas não inoculadas e inoculadas com os isolados de *Pythium* sp. e agro-infiltradas com TRV2b-GFP (controle) e TRV2b-FAD7. Diferentes letras entre tratamentos indicam diferença significativa (Duncan $P \leq 0,05$). UFRGS, Porto Alegre/RS, 2010.

As médias das notas de severidade em todas as plantas agro-infiltradas com o vetor TRV2b-FAD7 apresentaram aumento significativo. Este fato é devido principalmente a importância das enzimas traduzidas pelos mRNAs dos genes silenciados. Como no ocorrido nos mutantes triplos para *fad3*, *fad7* e *fad8*, que se tornaram altamente suscetíveis a *Pythium mastophorum* (Vijayan *et al.*, 1998). Também as plantas sem a inoculação do patógeno e agro-infiltradas com o vetor TRV2b-FAD7, apresentaram aumento significativo nas notas. Uma hipótese é que este aumento pode estar relacionado ao sintoma viral. Hard *et al.*, (2008) citam que vetores clonados com sequências em torno de 300 pb, como o TRV2b-FAD7,

possibilitam uma maior replicação e conseqüentemente, o aumento dos sintomas virais, devido ao maior gasto metabólico com a síntese de proteínas virais. Outra hipótese é que esse aumento nas notas está relacionado a importância dos ácidos graxos saturados na detoxificação das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Mène-Saffrané *et al.*, 2009), uma vez que estas aumentam significativamente com estresses, sejam por ataque de patógenos ou ambientais (Gara *et al.*, 2003). Com o acúmulo de ROS, a planta entra em estresse oxidativo, acabando por completo com sistema fotossintético levando-a inicialmente a um amarelecimento e podendo chegar à morte (Apel & Hirt, 2004). Fato este que pode ter levado a este aumento significativo nas notas atribuídas ao fenótipo das plantas não inoculadas com *Pythium* sp..

Na comparação das médias dos comprimentos de raiz, a análise estatística utilizada não permitiu a detecção das diferenças existentes entre as médias dos comprimentos das raízes das plantas, pois a variação visual existente (Figura 7) não foi detectada estatisticamente. As diferenças poderiam ser maiores re-analizando o experimento somente com os dados de comprimento de raiz das plantas inoculadas com o vetor TRV2b-FAD7 que foram efetivamente silenciadas, pois como demonstra a Figura 7 as plantas agro-infiltradas com o TRV2b-FAD7 tem uma grande variabilidade no comprimento das raízes.



FIGURA 7. Plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas com *Pythium deliense*. A; Plantas agro-infiltradas com TRV2b-FAD7. B; Plantas agro-infiltradas com TRV2b-GFP (controle). Barra representa 3 cm. UFRGS, Porto Alegre/RS, 2010.

A correlação entre os comprimentos de raízes com as respectivas notas de severidade de cada tratamento (Tabela 3), indicou que o comprimento das raízes de todos os tratamentos agro-infiltrados com TRV2b-FAD7 estão correlacionados significativamente, e situam-se na classe de correlação alta (> 80 %).

A alta correlação entre a redução das raízes e o aumento das notas aferidas ao fenótipo, indicam que existe um forte relação entre estes dois parâmetros de avaliação da severidade da doença. Como esta análise é realizada entre plantas individuais a correlação é significativa, indicando que a análise individual de plantas efetivamente silenciadas poderiam indicar uma diferença significativa também no comprimento das raízes.

TABELA 3. Coeficientes médios de correlação de Spearman. Correlação entre os comprimentos das raízes e notas atribuídas ao fenótipo das plantas de *A. thaliana* nos diferentes tratamentos.

Inoculação / agro-infiltração	Coeficiente (r)	Significância (p)
Não inoculado / TRV2b-GFP	-0.75	< 0.0001
Não inoculado / TRV2b-TRVFAD7	-0.45	0.02
<i>P. dissotocum</i> / TRV2b-GFP	-0.85	< 0.0001
<i>P. dissotocum</i> / TRV2b-TRVFAD7	-0.89	< 0.0001
<i>P. deliense</i> / TRV2b-GFP	-0.49	0.015
<i>P. deliense</i> / TRV2b-TRVFAD7	-0.86	< 0.0001
<i>P. ultimum</i> / TRV2b-GFP	-0.32	0.1322
<i>P. ultimum</i> / TRV2b-TRVFAD7	-0.82	< 0.0001

A correlação entre as notas referentes ao fenótipo e comprimento de raízes das plantas efetivamente silenciadas, inoculadas com *P. deliense* não pode ser realizada uma vez que a coleta destas raízes foi misturada. Não havendo portanto a possibilidade de correlacionar os dados de comprimento e nota do fenótipo a respectiva quantidade de mRNA de cada planta. Podendo-se somente avaliar os dados de média geral, fato que possivelmente esteja reduzindo e impedindo a percepção das diferenças do comprimento de raiz entre as plantas inoculadas com TRV2b-GFP ou TRV2b-FAD7.

Outro indicio de que o silenciamento aumenta a suscetibilidade a *P. deliense* é a presença de menos oósporos em raízes de plantas de *A. thaliana* agro-infiltradas com o vetor TRV2b-GFP (Figura 8 A) quando comparada com as agro-infiltradas com o TRV2b-FAD7 (Figura 8 B). A redução do mRNA dos genes *FAD3*, *FAD7* e *FAD8* reduz a biossíntese

ácido linolênico, conseqüentemente a síntese de JA e a resistência (Vijayan *et al.*, 1998).



FIGURA 8. Raízes de *Arabidopsis thaliana* inoculadas com *Pythium deliense*. A Raízes de plantas agro-infiltradas com TRV2b-GFP. B Raízes de plantas agro-infiltradas com TRV2b-FAD7. Setas indicam os oósporos. Barra representa 1 mm. UFRGS, Porto Alegre/RS, 2010.

4.4 Análise da expressão gênica

A expressão relativa dos genes *FADs* 3, 7 e 8 em plantas silvestres pode ser visualizada na Figura 9.

A expressão relativa do *FAD* 3 diferiu significativamente pelo teste *t* a 5 % de significância da média da expressão relativa dos genes *FAD7* e *FAD8*, em 33 vezes a mais.

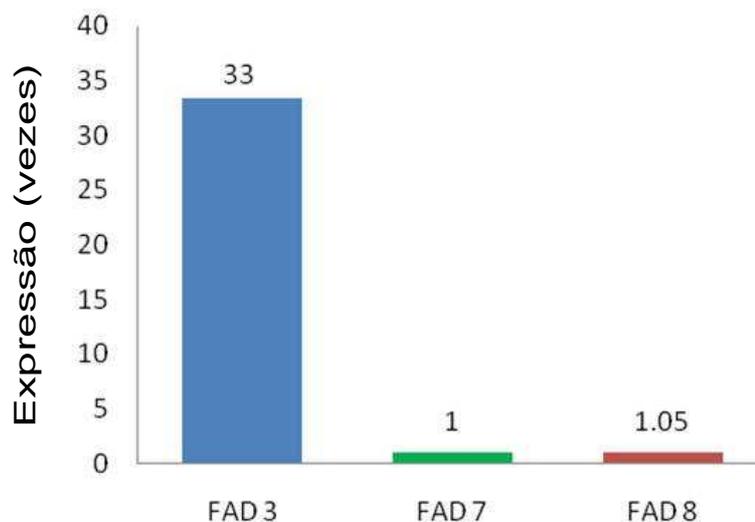


FIGURA 9. Expressão dos genes *FAD3*, *FAD7* e *FAD8* em *A. thaliana*. Expressão relativa ao gene *FAD7* em plantas silvestres de *A. thaliana*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2010.

A indução dos genes *FAD3*, *FAD7* e *FAD8* quando inoculados com *P. deliense* pode ser visualizada na Figura 10, sendo no gene *FAD7* onde ocorre a maior indução, um aumento de 3,5 vezes comparando com a expressão da planta não inoculada, o gene *FAD3* dobra a expressão, e o *FAD8* não é induzido pela inoculação.

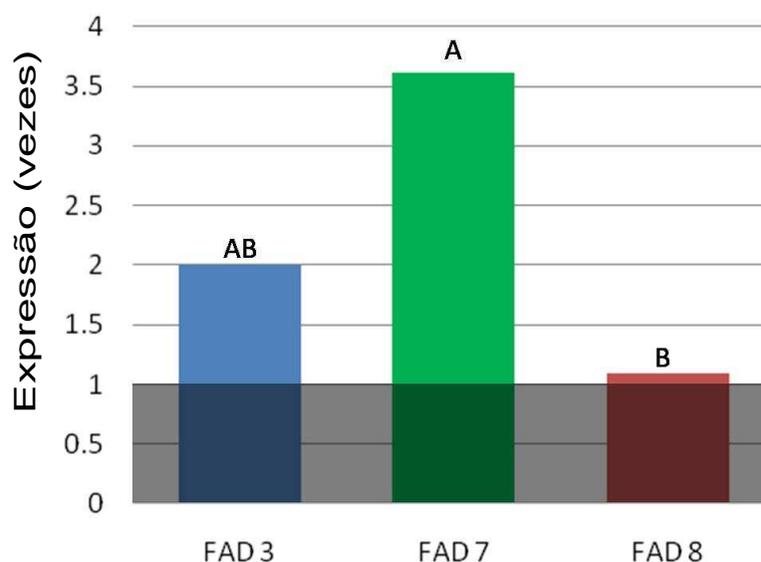


FIGURA 10. Expressão dos genes *FAD3*, *FAD7* e *FAD8* em *A. thaliana* agro-infiltradas com TRV2b-GFP e inoculada com *P. deliense*. Área sombreada; expressão das plantas controle (Agro-infiltradas com TRV2b-GFP e não inoculadas). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2010.

A eficiência do silenciamento dos genes *FADs* pode ser vista na Tabela 4. A eficiência do silenciamento do gene *FAD 3* (Tabela 4) indica que em 50% das plantas ocorreu silenciamento, o que também foi verificado no trabalho de Valentine & Shaw, 2004, em que 50 % das raízes de *A. thaliana* apresentaram uma redução na expressão da GFP 15 dias após a agro-infiltração. As plantas que sofreram silenciamento do gene *FAD 3* apresentaram uma redução média na quantidade de mRNA de 3,52 vezes. Já a eficiência do silenciamento do gene *FAD 7* foi um pouco menor, 43 % com uma redução de 2,18 vezes, quando comparado com a quantidade de mRNA de plantas inoculadas com *P. deliense* e agro-infiltradas com TRV2b-GFP. Diferente dos *FAD 3* e *FAD 7* o *FAD 8* não sofreu redução no acúmulo de mRNA.

TABELA 4. Eficiência do silenciamento dos genes *FAD 3*, *FAD 7* e *FAD 8* em *Arabidopsis thaliana*.

Genes	Eficiência de silenciamento	Redução (vezes)
FAD3	8/16 (50%)	3,52
FAD7	7/16 (43%)	2,18
FAD8	0/16 (0%)	0
FAD3/ FAD7	5/16 (31%)	2,74

O gene *FAD3* possui uma identidade menor que os genes *FAD7* e *FAD8* com o vetor TRV2b-FAD7, esperava-se então, que o evento de silenciamento de plantas induzido por vírus fosse menos eficiente e estivesse presente em um número menor de plantas. No entanto, os resultados evidenciaram um comportamento contrário ao esperado. Cabe ressaltar, que a média da expressão relativa do gene *FAD3* em plantas

silvestres foi maior (Figura 9), e que ocorre uma indução de 2 vezes na expressão do gene *FAD 3*, podendo estes fatos serem determinante para as diferenças verificadas entre o silenciamento dos genes *FAD3*, *FAD7* e *FAD8*. Resultados encontrados por Mik *et al.*, (2005) corroboram para o entendimento deste caso, pois em seu trabalho quando silenciou uma família gênica de arroz obteve uma variação no silenciamento de cada gene, sendo que foi menos efetivo o silenciamento do gene menos expresso devido a falta de substrato para a RNA polimerase dependente de RNA da planta, essencial na fase de amplificação do silenciamento.

O silenciamento de genes em plantas apresenta um número considerável de variáveis, dentre elas, a quantidade de inóculo presente em cada folha, a similaridade da sequência inserida no TRV2b com o RNA alvo, a expressão do gene alvo, estabilidade dos fragmentos clivados e a capacidade de quantificação do silenciamento pelos oligonucleotídeos iniciadores.

Na análise conjunta das 5 plantas silenciadas dos genes *FAD3* e *FAD7* (Figura 11), verifica-se que nas plantas em que ocorreu silenciamento de ambos os genes ocorreu uma menor expressão relativa do gene codificante da defensina PDF1.2.

A correlação da expressão de PDF1.2 com a resistência e sua indução por patógenos necrotróficos são conhecidas (Glazebrook *et al.*, 2005). Vijayan *et al.*, (1998) em seu trabalho com triplo mutantes de *A. thaliana fad3*, *fad7* e *fad8*, os quais tem a resistência altamente reduzida em comparação as plantas silvestres, não apresentavam indução do gene

PDF1.2 quando inoculadas com *P. mastophorum*, A expressão e resistência são restituídas através da complementação bioquímica de MeJA.

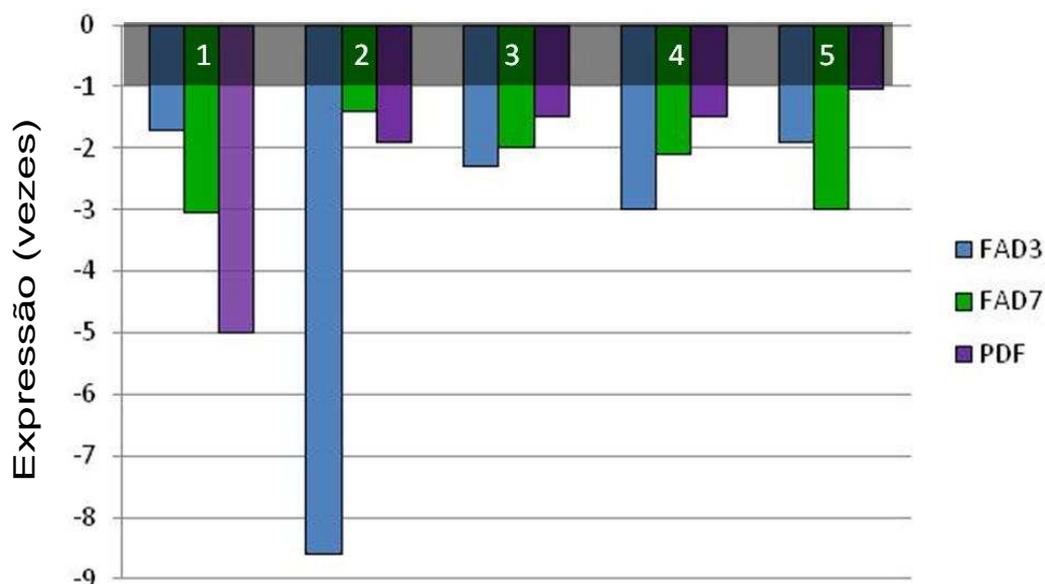


FIGURA 11. Acúmulo de mRNA dos genes *FAD3*, *FAD7* e *PDF 1.2* em plantas de *A. thaliana* silenciadas com TRV2b-*FAD7* e inoculadas com *P. deliense*. 1 a 5, plantas de *A. thaliana* com redução no acúmulo de mRNA de ambos os genes *FAD3* e *FAD7*. Área sombreada; expressão das plantas controle (Agro-infiltradas com TRV2b-GFP e inoculadas com *P. deliense*). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2010.

4.5 Complementação bioquímica do silenciamento.

A complementação bioquímica obtida através da adição do MeJA, alterou o fenótipo das plantas de *A. thaliana* silenciadas e inoculadas com *P. deliense*, restituindo assim a resistência ao *P. deliense* (Figura 12).

A restituição da resistência se deve a presença de MeJA, o qual permite o sequestro e a degradação do inibidor JAZ através do complexo enzimático SCF-COI1 (Wasternack & Kombrink, 2009), liberando com isso o fator de transcrição MYC2 para a realização da síntese de genes de resistência (Memelink, 2009), fenômeno este, verificado naturalmente na

planta inoculada com *P. deliense* não silenciada, tornando-a resistente ao patógeno.

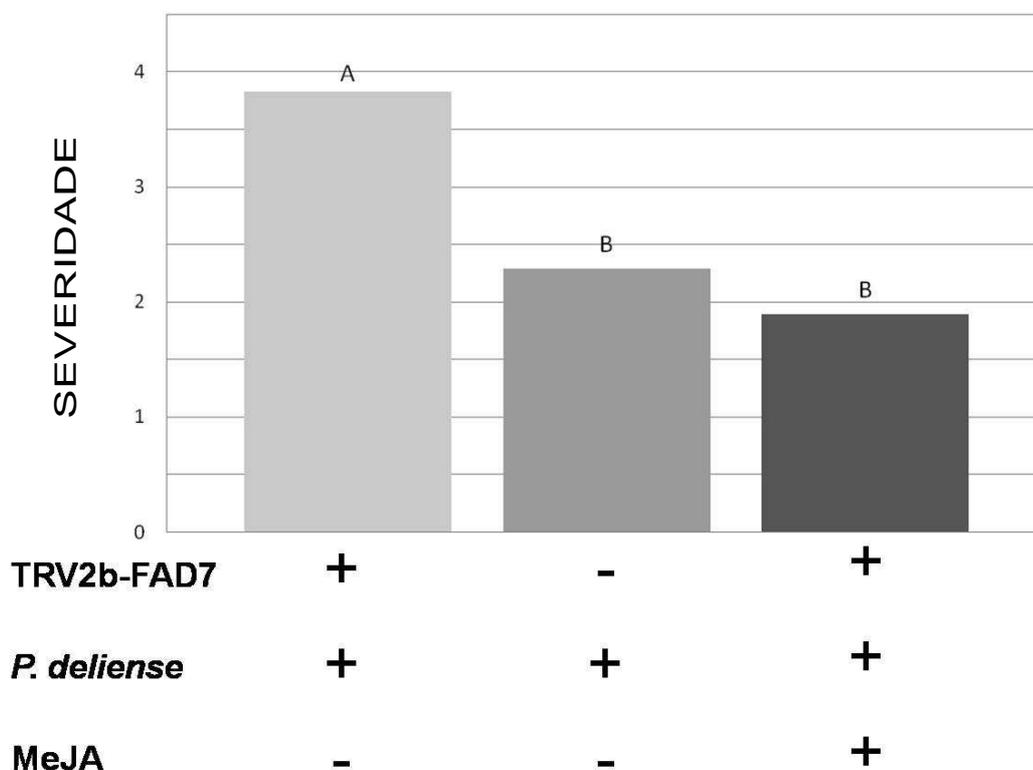


FIGURA 12. Resistência de *Arabidopsis thaliana* a *Pythium deliense*. Médias de notas atribuídas ao fenótipo das plantas inoculadas com *Pythium deliense* e agro-infiltradas com TRV2b-FAD7 (+) e TRV2b-GFP (-). Diferentes letras entre tratamentos indicam diferença significativa Duncan $P \leq 0,05$. UFRGS, Porto Alegre/RS, 2010.

A Figura 13, apresenta a redução da expressão dos genes *FAD 3*, *FAD 7* e *PDF 1.2* em plantas silenciadas, demonstrando como no primeiro experimento que o silenciamento dos genes *FAD 3* e *FAD 7* reduz a indução da defensina PDF 1.2 e a indução do gene responsável pela defensina PDF1.2 é liberada pela adição exógena de MeJA (Figura 14). A indução da expressão do gene *PDF1.2* esta ligada a restituição da resistência nas

plantas silenciadas e que receberam MeJA complementando-o bioquimicamente (Vijayan *et al.*, 2005).

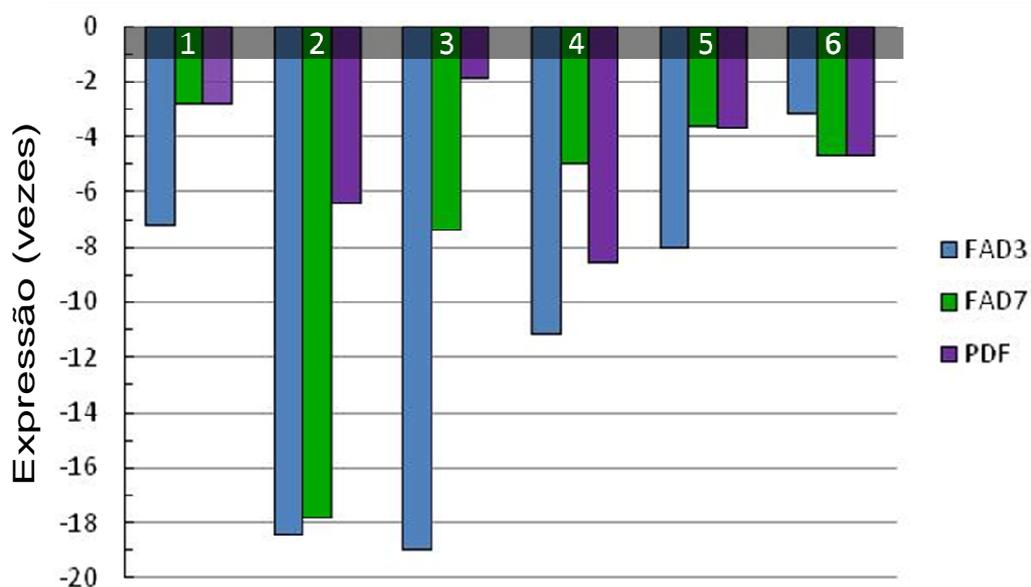


FIGURA 13. Acúmulo de mRNA dos genes *FAD3*, *FAD7* e *PDF1.2* em plantas de *A. thaliana* agro-infiltradas com TRV2b-*FAD7*, inoculadas com *P. deliense* e sem adição de MeJA. Área sombreada; expressão das plantas agro-infiltradas com TRV2b-GFP com inoculação de *P. deliense* e sem a adição de MeJA. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2010.

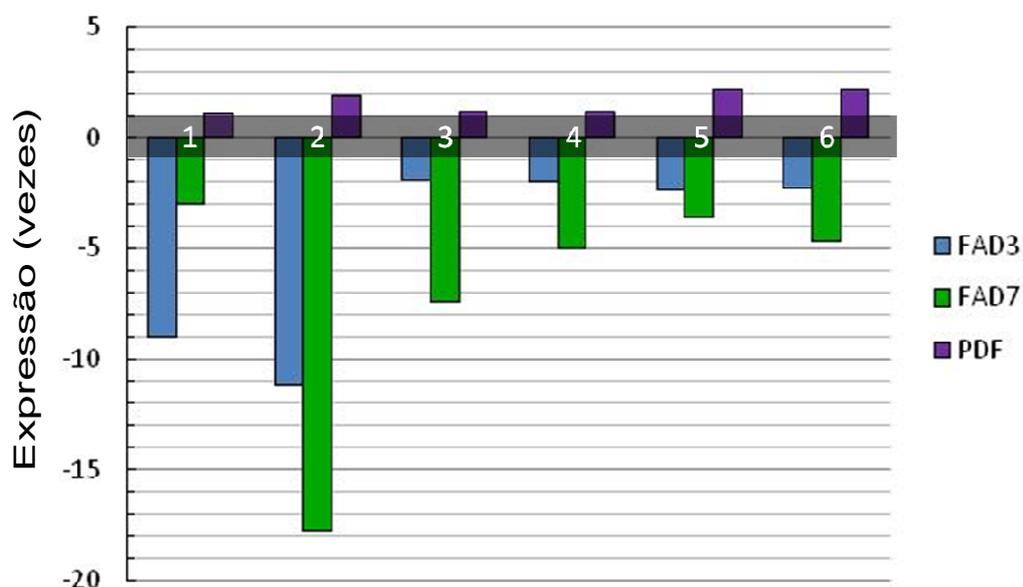


FIGURA 14. Acúmulo de mRNA dos genes *FAD3*, *FAD7* e *PDF1.2* em plantas de *A. thaliana* agro-infiltradas com TRV2b-*FAD7*, inoculadas com *P. deliense* e com adição de MeJA. Área sombreada; expressão das plantas agro-infiltradas com TRV2b-*FAD7*, inoculadas com *P. deliense* e sem adição de MeJA. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2010.

5 CONCLUSÕES

O vetor viral TRV2b-FAD7 induziu o silenciamento dos genes *FAD7* e *FAD3* em plantas de *A. thaliana*.

O vetor viral TRV2b-FAD7 não induziu o silenciamento do gene *FAD8*.

O silenciamento dos genes *FAD3* e *FAD7* torna as plantas de *A. thaliana* suscetíveis ao isolado *P. deliense*.

As plantas de *A. thaliana* quando silenciadas possuem uma expressão menor do gene *PDF1.2*.

A adição de Metil Jasmonato restitui o fenótipo de resistência das plantas de *A. thaliana* inoculadas com *P. deliense* e com membros dos genes FAD silenciadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOFF, M.D.; MAGALHAES, P.J.; RAM, S.J. Image Processing with ImageJ. **Biophotonics International**, Los Gatos, v.11, p.36–42, 2004.

ACOSTA, I. F.; FARMER, E. E. Jasmonates. In: THE ARABIDOPSIS Book. Lausanne, 2010. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/pdf/10.1199/tab.0129>. Acesso em: 29 jan. 2010

ALONSO, J.M.; ECKER, J.R. **Moving forward in reverse**: genetic technologies to enable genome-wide phenomic screens in *Arabidopsis*. 2006. Disponível em: <[http://www.hort.purdue.edu/hort/courses/HORT301/Webtopics&Essays/NatureRev\(2006\)Alonso.pdf](http://www.hort.purdue.edu/hort/courses/HORT301/Webtopics&Essays/NatureRev(2006)Alonso.pdf)>. Acesso em: 29 jan.2010

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, Oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399. 2004.

AYRES, M. *et al.* **BioEstat 5.0**: aplicações estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. 5th edn. Belém : Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá; MCT; CNPq, 2005.

BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA, A. Ethylene response factor1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.17, p.763-770, 2004.

BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA, A.; SOLANO, R. Constitutive expression of Ethylene response factor1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. **The Plant Journal**, Oxford, v.29, p.23-32, 2002.

BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Eds.). **Manual de Transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-Cenargen, p. 17-33, 1998.

BRIGNETI, G. *et al.* Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. **The Plant Journal**, Oxford, v.39, p.264–272, 2004.

BROWSE, J. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 60, p.183-205, 2009.

BROWSE, J. The power of mutants for investigating jasmonate biosynthesis and signaling. **Phytochemistry**, Pullman, v.70, n.13-14, p.1539-1546, 2009.

BUGOS, R.C. *et al.* RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine. **BioTechniques**, Natick, v.19, n.5, p.734-737, 1995.

FAIVRE, O. *et al.* Potato virus X-induced gene silencing in leaves and tubers of potato. **Plant Physiology**, Lancaster, v.134, p.1308–1316, 2004.

FILIPOWICZ, W. RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. **Cell**, Cambridge, v.122, p.17-20, 2005.

GARA, L.; PINTO, M.C.; TOMMASI, F. The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant–pathogen interaction. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 41, p. 863-870, 2003.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p.205-227, 2005.

GODGE, M. R. *et al.* Virus-induced gene silencing for functional analysis of selected genes. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p.209–219, 2008.

GOLD, S.E.; STANGHELLINI, M.E. Effects of temperature on *Pythium* root rot of spinach grown under hydroponic conditions. **Phytopathology**, Berlin, v.75, n.3, p.333-337, 1985.

HARDHAM, A. R. Cell biology of plant-oomycete interactions. **Cellular Microbiology**, Berkeley, v.9, n.1, p. 31-39, 2007.

HARD, M. *et al.* Optimized virus-induced gene silencing in *Solanum nigrum* reveals the defensive function of leucine aminopeptidase against herbivores and the shortcomings of empty vector controls. **New Phytologist**, Lancaster, v.179, p.356–365, 2008.

HENDRIX, F. F.; CAMPBELL, W. A. *Pythium* as a plant pathogen. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.11, p.77-98, 1973.

HERNÁNDEZ, C. *et al.* Serial passage of tobacco rattle virus under different selection conditions results in deletion of structural and non-structural genes in RNA2. **The Journal of Virology**, Washington, v.70, p.4933–4940, 1996.

HOLZBERG, S. *et al.* Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. **The Plant Journal**, Oxford, v.30, p.315– 327, 2002.

HORIGUCHI, G. RNA silencing in plants: a shortcut to functional analysis. **Differentiation**, Londres, v.72, p.65-73, 2004.

HUFFAKER, A.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. **The**

Proceeding of the National Academy of Sciences USA, Washington, v.103, p.10098-10103, 2006.

HULL, R. **Matthews' plant virology**. 4th ed. New York : Academic Press, 2002. 1031p.

KACHROO, A.; KACHROO, P. Fatty Acid–Derived Signals in Plant Defense. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.47, p.153-176, 2009.

KAMOUN, S.; HUITEMA, E.; VLEESHOUWERS, V.G.A.A. Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? **Trends in Plant Science**, Oxford, v.4, p.196-200, 1999.

KONG, P. *et al.* Single-strand conformational polymorphism analysis of the ribosomal internal transcribed spacer 1 for rapid species identification within the genus *Pythium*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.240, p.229–236, 2004.

KUCHAREK, T.; MITCHELL, D. **Diseases of agronomic and vegetable crops caused by *Pythium***. University of Florida, Plant Pathology Fact Sheet, p.14, 2000. Disponível em: <http://128.227.207.24/takextpub/FactSheets/pp53.pdf>. Acesso em: jan/2010.

KUMAGAI, M.H. *et al.* Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. **The Proceeding of the National Academy of Sciences**, Washington, v.92, p.1679–1683. 1995.

KUMAR, C.; RZHETSKY, A. Evolutionary relationships of eukaryotic kingdoms. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.42, p.183–193, 1996.

LACOMME, C.; HRUBIKOVA, K.; HEIN, I. Enhancement of virus-induced gene silencing through viral-based production of inverted-repeats. **The Plant Journal**, Oxford, v.34, p.543–553, 2003.

LATIJNHOUWERS, M.; DE WIT, P.J.G.M.; GOVERS, F. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. **TRENDS in Microbiology**, Cambridge, v.11, n.10, p. 462-469, 2003.

LECELLIER, C.H.; VOINNET, O. RNA silencing: no mercy for viruses? **Immunological Reviews**, Copenhagen, v.198, p.285-303, 2004.

LIU, E.; PAGE, J. E. Optimized cDNA libraries for virus-induced gene silencing (VIGS) using tobacco rattle virus. **Plant Methods**, Lancaster, v.4, n.5, p.1-13, 2008.

LIU, Y. *et al.* Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. **The Plant Journal**, Oxford, v.30, p.415–429, 2002b.

LIU, Y.; SCHIFF, M.; DINESH-KUMAR, S.P. Virus-induced gene silencing in tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v.31, p.777–786, 2002a.

LOPES, A.C.; REIS, A.; MAKISHIMA, N. **Como prevenir o “tombamento” em mudas de hortaliças**. Brasília : Embrapa.CNPH, 2005. (Comunicado técnico, n. 28). Disponível em: http://www.cnph.embrapa.br/paginas/publicacoes/publicacoes_2005/pdf_vfinal_2005. Acesso em: jan 2010.

LORENZO, O. *et al.* Ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **The Plant Cell**, Rockville, v.15, p.165–178, 2003.

MACFARLANE, S. A. The molecular biology of the tobnaviruses. **Journal of General Virology**, St Andrews, v.80, p.2799–2807, 1999.

MACFARLANE, S.A.; POPOVICH, A.H. Efficient expression of foreign proteins in roots from tobnavirus vectors. **Virology**, Evanston, v.267, p.29–35, 2000.

MEDEIROS, M.S. **Caracterização da interação de *Pythium* spp. com plântulas de *Solanum lycopersicum***. 2008. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MELLO, C. C.; CONTE JR., D. Revealing the world of RNA interference. **Nature**, New York, v.431, p. 338-342, 2004.

MEMELINK, J. Regulation of gene expression by jasmonate hormones. **Phytochemistry**, Pullman, v.70, n.13-14, p.1560-1570, 2009.

MÈNE-SAFFRANÉ. L. *et al.* Nonenzymatic Oxidation of Trienoic Fatty Acids Contributes to Reactive Oxygen Species Management in *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.284, n. 3, p. 1702–1708, 2009.

MIDDLETON, J.T. The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *Pythium*. **Memoirs of the Torrey Botanical Club**, New York, v.20, p.1-171, 1943.

MIKI, D.; ITOH, R.; SHIMAMOTO, K. RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. **Plant Physiology**, Lancaster, v.138, p.1903-1913, 2005.

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**, Rockville, v.2, p.279-289, 1990.

OHLROGGE, J.; BROWSE, J. Lipid biosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, p.957-970, 1995.

OWEN-GOING, N.; SUTTON, J.C.; GRODZINSKI, B. Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. **Canadian journal of plant pathology-revue canadienne de phytopathologie**, Ontario, v. 25, p. 155-167, 2003.

PAQUIN, B. *et al.* The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. **Current Genetics**, New York, v.31, p.380–395, 1997.

PEELE, C. *et al.* Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. **The Plant Journal**, Oxford, v.27, p.357–366, 2001.

PLAATS-NITERINK, J. VAN DER. **Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology**, v.21, 1981. Disponível em: http://www.cbs.knaw.nl/simonline/sim_021/sim21.htm. Acesso em: jan. 2010.

PURKAYASTHA, A.; DASGUPTA, I. Virus-induced gene silencing: a versatile tool for discovery of gene functions in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v.47, n.11-12, p.967-976, 2009.

RATCLIFF, F.; MARTIN-HERNANDEZ, A.M.; BAULCOMBE, D.C. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. **The Plant Journal**, Oxford, v.25, p.237–245, 2001.

RUIZ, M.T.; VOINNET, O.; BAULCOMBE, D.C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. **The Plant Cell**, Rockville, v.10, p.937–946, 1998.

SCHALLER, A.; STINTZI, A. Enzymes in jasmonate biosynthesis - structure, function, regulation. **Phytochemistry**, Pullman, v.70, n.13-14, p.1532-1538, 2009.

SENTHIL-KUMAR, M. *et al.* A systematic study to determine the extent of gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other Solanaceae species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing. **New Phytologist**, Lancaster, v.176, p.782–791, 2007.

STANGHELLINI, M.E. *et al.* Control of root rot of peppers caused by *Phytophthora capsici* with a nonionic surfactant. **Plant disease**, Saint Paul, v. 80, p. 1113-1116, 1996.

STASWICK, P.E.; YUEN, G.Y.; LEHMAN C.C. Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. **The Plant Journal**, Oxford, v.15, p.747-754, 1998.

SUTTON, J.C. *et al.* Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.32, n.4, p.307-321, 2006.

THOMAS, C.L. *et al.* Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. **The Plant Journal**, Oxford, v.25, p.417–425, 2001.

THOMPSON, J.D. *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v 25, 4876–4882, 1997.

TRIVILIN, A.P. **Superexpressão do gene codificante do peptídeo AtPep1 em *A. thaliana* visando a obtenção de resistência à isolados de diferentes espécies do gênero *Pythium*.** 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

TURNAGE, M.A. *et al.* Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v.30, p.107–117, 2002.

TYLER, B.M. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.40, p.137–167, 2002.

VALENTINE, T. *et al.* Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector. **Plant Physiology**, Lancaster, v.136, p.3999–4009, 2004.

VAN DE PEER, Y.; DE WACHTER, R. Evolutionary relationships among the eukaryotic crown taxa taking into account site-to-site rate variation in 18S rRNA. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 45, p. 619–630, 1997.

VAN KAMMEN, A. Virus-induced gene silencing in infected and transgenic plants. **Trends in Plant Science**, London, v.2, p.409-411.1997.

VAN WEST, P. *et al.* Oomycete plant pathogens use electric fields to target roots. **Molecular plant-microbe interactions**, Sain Paul, v.15, p.790-798, 2002.

VAN WEST, P.; APPIAH, A.A.; GOW, N.A.R. Advances in research on oomycete root pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 62, p.99-113, 2003.

VIJAYAN, P. *et al.* A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. **The Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.95, p.7209–7214, 1998.

WASTERACK, C.; KOMBRINK, E. Jasmonates: Structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. **ACS Chemical Biology**, Washington, v.5, n.1, p.63-67, 2010.

WATERHOUSE, G. Key to *Pythium* Pringsheim. **Mycological Papers**, Great Britain, v.109, p.1-15, 1967.

WATSON, J. M. *et al.* RNA silencing platforms in plants. 2005. Disponível em: <<http://www.aloj.us.es/bioqplantas/tema3/RNAifebs2.pdf>>. Acesso em: 29.jan. 2010.

ZAR, JH. **Bioestatistical analysis**. 5 ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2009. 944 p.

ZHANG, X. *et al.* Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. **Nature Protocols**, London, v. 1, n.2, p.641 - 646, 2006.

Continuação APÊNDICE 1. Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos mRNAs dos genes *FAD7* e *FAD8*. Em destaque, as sequências referentes a região de maior identidade (Cinza), em minúsculo itálico negrito sequência de oligonucleotídeos iniciadores, sublinhado região interna aos oligonucleotídeos iniciadores.

```

fad7 GATGCTTGCATACCCCTTCTACTTGTGGGCTCGAAGTCCGGGGAAAAAGGGTTCTCATT 779
fad8 AATGCTCGCATACCCCTTCTACTTGTGGAACAGAAGTCCAGGGAAACAAGTTCTCATT 758
*****
fad7 CCATCCAGACAGTACTTGTTCCTCCCTAAAGAGAGAAAGGATGTCTCACTTCTACTGC 839
fad8 TCATCCGACAGTACTTGTTCCTCCAAAAGAGAAGAAAGATGTTCTGACATCAACTGC 818
*****
fad7 TTGTtggaactgcaatggctgcCTGCTTGTGTTGTCTCAACTTCACAATCGGTCCAATCA 899
fad8 CTGTtggaactgcaatggctgcTTGCTTGTGTTGTCTCAACTTTGTCATGGGTCCAATCCA 878
*****
fad7 AATGCTCAAACCTTTATGGAATTCCTTACTGGATAAATGTAATGTGGTTGGACTTTGTGAC 959
fad8 GATGCTCAAACCTATATGGCATCCCTTATGGATATTTGTAATGTGGTTGGACTTCGTCAC 938
*****
fad7 TTACCTGCATCACCATGGTCATGAAGATAAGCTTCCCTGGTACCGTGGCAAGGAGTGGAG 1019
fad8 TTACTTGCACCACCATGGACATGAAGACAAGCTCCCTGGTATCGTGGAAAGGAATGGAG 998
*****
fad7 TTACCTGAGAGGAGGACTTACAACATTTGGATCGTGACTACGGATTGATCAATAACATCCA 1079
fad8 TTACCTGAGAGGAGGGCTCACAACATTAGATCGTGACTACGGATGGATCAATAACATCCA 1058
*****
fad7 TCATGATATTGGAACCTCATGTGATACATCATCTTTTCCCGCAGATCCCACATTATCATCT 1139
fad8 CCACGATATTGGAACCTCATGTGATACATCATCTTTTCCCGCAGATCCCACATTATCATCT 1118
*****
fad7 AGTAGAAGCAACAGAagcagctaaccagtATTAGGGAAGTATTACAGGAGCCTGATAA 1199
fad8 AGTAGAAGCAACAGAagcagctaaccagtACTAGGAAAGTACTACAGAGAACCGAAAA 1178
*****
fad7 GTCTGGACCGTTGCCATTACATTTACTGGAAATTCTAGCGAAAAGTATAAAAAGAAGATCA 1259
fad8 CTCTGGACCTCTGCCACTTCACTTACTGGGAAGCCTCATAAAGAGTATGAAACAAGACCA 1238
*****
fad7 TTACGTGAGCGACGAAGGAGAAGTTGTATACTATAAAGCAGATCCAAATCTCTATGGAGA 1319
fad8 TTTCTGTAAGCGATACAGGAGATGTCGTGTACTATGAGGCAGATCCAAAATCAATGGACA 1298
*****
fad7 GGTCAAAGTAAGAGCAGATTGA 1341
fad8 A---AGAACATGA----- 1308
*****

```

