

Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular
Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga – LIMPP

Prospecção de moléculas-alvo para intervenção da interação planta-praga

Rodrigo da Rocha Fragoso

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Fátima Grossi de Sá

Outubro 2006 – Brasília

Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular
Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga – LIMPP

Prospecção de moléculas-alvo para intervenção da interação planta-praga

Rodrigo da Rocha Fragoso

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Fátima Grossi de Sá

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

Outubro 2006 – Brasília

BANCA EXAMINADORA

Dr. Gilberto Sachetto Martins

Departamento de Genética
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra. Andréa Queiroz Maranhão

Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília – UnB

Dra. Natália Florêncio Martins

Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Departamento de Biologia Celular
Universidade de Brasília – UnB

Dra. Maria Fátima Grossi de Sá (Orientadora)

Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr. Osmundo Brilhante Oliveira Neto (Suplente)

Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Trabalho realizado no Laboratório de
Interação Molecular Planta-Praga
(LIMPP) da Embrapa – Recursos
Genéticos e Biotecnologia**

Outubro 2006 – Brasília

AGRADECIMENTOS

- Agradeço muito à minha orientadora de doutorado Dr^a. Maria Fátima Grossi de Sá (chefa) por todo meu crescimento profissional e aprendizado, também pelo exemplo de liderança e dedicação ao trabalho, além do apoio moral, confiança no meu trabalho, paciência, amizade e carinho.
- Pelo exemplo de amizade, conduta moral, respeito ao próximo, curiosidade científica, mente investigativa e questionadora, orientação didática e incentivadora, dedicação à pesquisa e enorme competência, agradeço muito ao Prof. Dr. João A.N. Batista, meu guru científico.
- Agradeço aos amigos, colegas e colaboradores da Embrapa, principalmente dos Laboratórios de Interação Molecular Planta-Praga, Bioinformática, Nematologia e Microscopia, e aos da UnB, especialmente do Laboratório de Biologia Molecular e meus queridos professores da Pós.
- Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da UnB pelo apoio financeiro dado por meio de bolsa da CAPES.
- Agradeço em especial aos componentes da banca examinadora, que aceitaram esse desafio num curto intervalo de tempo.
- Agradeço à Bela (Isabela Tristan Lourenço) pelo amor, admiração, respeito, paciência, companhia constante, enorme apoio moral, torcida pelo concurso, apoio técnico (refeições, internet banda larga e TV a cabo), tempo que estamos namorando, antecipadamente, pelo futuro que nos aguarda e por outras incontáveis e indescritíveis coisas e momentos vividos tão feliz e intensamente.

- Aos “picaretas”, amigos do peito, Antônio Américo, Rodrigo Tristan, Dr. Octávio e Marquito e, logicamente as respectivas patroas que tanto nos aturam Paulinha, Debs, Alinne e Dani. Sou o cara mais feliz do mundo porque tenho muitos amigos. Na verdade a lista é grande e não posso citar todos, nem esquecer nomes, mas, mesmo assim, moram no meu coração. Algumas dicas: Mari, Lizi, Osmy, Isa, Lulu, Diogão, Shirley, Simoneca & Raú, Poli, Fe, Genú, Ete & Rafa, Saulo & Carol, Mirtinha & Davi, Luiz & Rita, Quichi, Lele, mais uma galera incontável, a turma do Lab, muitos do semestre da Bela e todos da Confraria do Boteco.
- Agradeço muito às famílias que me adotaram. Acho que nem consigo agradecer tanto quanto devo à família da Bela e Rodrigo (Ricardo, Marlene & CIA), do Antônio Américo (Gerardo & Vera), da Paulinha (Carlos Eugênio & Fátima) e da Debs (Etelmar & Marlene).
- Agradeço à minha família, pequena em quantidade, porém enorme em qualidade. Pai, mãe e mano, ... não tenho palavras! Devo muito a vocês!
- Finalmente, agradeço ao nosso Deus.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii

I – INTRODUÇÃO

I.i. Fitonematóides Endoparasitas Sedentários.	01
I.ii. Biologia dos Nematóides Formadores de Galhas.	04
I.iii. Interação Planta-Nematóide.	06
I.iv. Genes de Parasitismo.	08
I.v. Evolução do Parasitismo de Plantas por Nematóides.	10
I.vi. Transferência Horizontal de Genes.	13
I.vii. Controle de Nematóides.	18
I.viii. Resistência Natural de Plantas.	19
I.ix. Transformação Genética de Plantas.	20
I.x. Proteinases.	21
I.xi. Interferência mediada por RNA.	23

II – JUSTIFICATIVA

25

III – OBJETIVOS

III.i. – Objetivo geral.	26
III.ii. – Objetivos específicos.	26

CAPÍTULO 1 – Caracterização de cDNAs codificadores de proteinases de *Meloidogyne* spp.

1.1. Resumo do primeiro capítulo.

27

1.2. Metodologia.

1.2.1. Varredura em banco de dados e análise de ESTs codificadoras de proteinases oriundas de nematóides.	29
1.2.2. Agrupamento de ESTs contíguas.	29
1.2.3. Cultura de nematóides <i>M. incognita</i>	29
1.2.4. Extração de ovos de <i>M. incognita</i>	30
1.2.5. Extração de larvas infectivas L2 de <i>M. incognita</i>	31

1.2.6. Extração de fêmeas adultas parasitas de <i>M. incognita</i>	32
1.2.7. Extração de RNA total.	32
1.2.8. Extração de DNA genômico.	32
1.2.9. Hibridização de <i>Mi-asp1</i> com RNA total por “northern blot”.	33
1.2.10. Amplificação de <i>Mi-asp1</i> por RT-PCR semi-quantitativo.	33
1.2.11. Localização do mRNA de <i>Mi-asp1</i> por hidridização <i>in situ</i>	34
1.3. Resultados.	
1.3.1. Análise <i>in silico</i> de ESTs codificadoras de AP de NFG.	35
1.3.2. Análise <i>in silico</i> de ESTs codificadoras de SP de NFG.	39
1.3.3. Análise <i>in silico</i> de ESTs codificadoras de CP de NFG.	42
1.3.4. Análise da expressão de <i>Mi-asp1</i> por “northern blotting”.	43
1.3.5. Análise da expressão de <i>Mi-asp1</i> por RT-PCR semi-quantitativo.	45
1.3.6. Análise da expressão de <i>Mi-asp1</i> por hibridização <i>in situ</i>	45
1.4. Discussão.	
1.4.1. Organização das ESTs codificadoras de AP em NFG.	47
1.4.2. Organização das ESTs codificadoras de SP em NFG.	49
1.4.3. Organização das ESTs codificadoras de CP em NFG.	50
1.4.4. Caracterização molecular de <i>Mi-asp1</i>	51
1.5. Conclusão.	58
1.6. Perspectivas.	59
CAPÍTULO 2 – Genômica funcional de larvas L2 de <i>Meloidogyne incognita</i>.	
2.1. Resumo do segundo capítulo.	60
2.2. Metodologia.	
2.2.1. Construção de biblioteca de ESTs de larvas L2 de <i>M. incognita</i>	60
2.2.2. Agrupamento de ESTs e análise computacional de seqüências.	62
2.3. Resultados e Discussão.	
2.3.1. Agrupamento de ESTs da biblioteca de cDNA de larva L2.	65
2.3.2. Anotação gênica e classificação funcional dos clusters de ESTs.	68
2.4. Conclusão.	75
2.5. Perspectivas.	77
IV – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
V – ANEXOS	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.i	Filograma de nematóides baseado em SSU rRNA.	02
Figura I.ii	Ciclo de vida de fitonematóides endoparasitas sedentários.	03
Figura I.iii	Anatomia de fitonematóides endoparasitas sedentários.	07
Figura I.iv	Representação esquemática da interação molecular planta-nematóide.	09
Figura I.v	Dendrograma contrastando ancestralidade com transferência horizontal de genes.	12
Figura 1.1	Gráfico da distribuição de ESTs codificadoras de proteinases de NFG.	36
Figura 1.2	Dendrograma das seqüências peptídicas preditas de ESTs codificadoras de SP em NFG e NFC.	41
Figura 1.3	Análise da expressão temporal de <i>Mi-asp1</i> por “northern blot”.	44
Figura 1.4	Análise da expressão temporal de <i>Mi-asp1</i> por RT-PCR semi-quantitativo	46
Figura 1.5	Localização dos transcritos de <i>Mi-asp1</i> por hibridização <i>in situ</i>	48
Figura 1.6	Dendrograma radial dos ortólogos de cathepsina D.	52
Figura 2.1	Análise da qualidade das amostras de RNA de larvas L2.	61
Figura 2.2	Auto-radiografia de gel alcalino.	63
Figura 2.3	Etapas de construção de uma biblioteca de cDNA.	64
Figura 2.4	Representação do vetor plasmidial pSPORT-1.	65
Figura 2.5	Gráfico dos tamanhos das ESTs singlets.	68
Figura 2.6	Distribuição dos contigs por tamanho de seqüência.	69
Figura 2.7	Gráfico em barras representativo do agrupamento.	70
Figura 2.8	Gráfico de setores do resultado do BLASTx.	71
Figura 2.9	Gráfico em barras das categorias KOG.	76

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1	ESTs de NFG codificadoras de APs encontradas por ferramenta de busca no NCBI mais BLASTn do banco de dados do site nematode.net, relativo ao “Parasitic Nematode Project”.	35
Tabela 1.2	Análise dos grupos de ESTs codificadoras de APs de NFG armazenadas no GenBank TM	37
Tabela 1.3	Número de ESTs de SP encontradas por ferramenta de busca do NCBI	40
Tabela 1.4	Número de ESTs de CP encontradas por busca no NCBI	42
Tabela 1.5	Número de ESTs de <i>Meloidogyne incognita</i> distribuídas por identidade com CPs de nematóides.	43
Tabela 1.6	Comparação de CPs do banco de dados com HGCP-I.	43
Tabela 1.7	Caracterização de APs pertencentes a subfamília de cathepsin D.	54
Tabela 2.1	Grupos de ESTs similares à proteínas de NFG e NFC (Tylenchida).	73
Tabela 2.2	Grupos de ESTs que demonstram alta identidade com proteínas bacterianas.	74
Tabela 2.3	Grupos de ESTs com maior abundância na larva L2 infectiva.	75

ABREVIATURAS

aa	aminoácido
AP	aspártico proteinase
cDNA	DNA complementar
CP	cisteíno proteinase
DNA	ácido desoxirribonucléico
dsRNA	RNA fita dupla
EST	“expressed sequence tag”, etiquetas de transcritos
GCG	“genetics computer group”
gDNA	DNA genômico
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
kb	quilobase – 10 ³ pares de bases
Maa	milhões de anos atrás
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	“national center for biotechnology information”
NFC	nematóide formador de cistos, <i>Heterodera</i> spp e <i>Globodera</i> spp.
NFG	nematóide formador de galhas, <i>Meloidogyne</i> spp.
pb	pares de base
PCR	reação de polimerização em cadeia (“polymerase chain reaction”)
RACE	“rapid amplification of cDNA ends”
RKN	“root-knot nematode”, nematóide formador de galhas, <i>Meloidogyne</i> spp.
RNA	ácido ribonucléico
RNAi	interferência mediada por RNA
rRNA	RNA ribossomal
RT	“reverse transcriptase”, transcriptase reversa
RT-PCR	transcrição reversa seguida de PCR
siRNA	RNA interferente pequeno
SP	serino proteinase
SSU	“nuclear small subunit”, subunidade menor
THG	Transferência Horizontal de Genes
tRNA	RNA transportador
UTR	“untranslated region”, região não traduzida

RESUMO

O nematóide formador de galhas *Meloidogyne incognita* (“southern root-knot nematode”, SRN) apresenta distribuição mundial, causando grandes perdas em várias culturas. Seu ciclo de vida compreende seis estádios de desenvolvimento (ovo, larva 1-4 e adulto). A larva L2, fase infectiva, penetra na raiz de planta hospedeira por força mecânica e degradação enzimática para, então, estabelecer a interação planta-patógeno. Em condições favoráveis, as larvas L2 se diferenciam em fêmeas adultas apomíticas, que completam o ciclo de vida após a deposição de mais de 2000 ovos. As práticas agrícolas atuais não são eficientes contra os fitonematóides, de modo que uma estratégia poderosa e promissora para o controle de nematóides é a produção de plantas transgênicas expressando moléculas que afetam o parasitismo. Proteinases são importantes alvos para o controle de nematóides e o primeiro capítulo descreve um estudo das ESTs codificadoras de aspártico, serino e cisteíno proteinases disponíveis em banco de dados, além da completa caracterização de cDNAs isolados anteriormente. Parece existir uma abundância de ESTs de aspártico proteinases em fase larval, quando comparado com ovos e fêmeas. Apenas em bibliotecas de ovos se encontram ESTs de serino proteinase. Por outro lado, ESTs de cisteíno proteinase são as mais abundantes e são encontradas em todas as fases. O cDNA *Mi-asp1* codifica uma catepsina D-tipo com vários ortólogos conhecidos em nematóides. Análises de expressão temporal e espacial mostram que *Mi-asp1* seja mais transcrito em ovos, do que larvas L2 ou fêmeas, sugerindo um importante papel na embriogênese do nematóide. Já no segundo capítulo, objetivando a identificação de genes envolvidos na infecção e nos processos vitais, uma biblioteca de cDNAs foi construída a partir de mRNA de larvas L2, usando o “Superscript Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning” (Invitrogen). A biblioteca de ESTs apresentou 2.137 seqüências validadas com 17% de redundância, distribuídas em 1.506 singlets e 197 contigs, gerados de 631 ESTs. A anotação gênica foi obtida por comparação dos resultados do BLASTx (GenBank). A análise *in silico* das seqüências obtidas foi feita para predição funcional, agrupamento filogenético, predição de transferência horizontal gênica e determinação da importância na interação planta-patógeno. A predição da função gênica por classificação em categorias KOG demonstrou que várias seqüências são relacionadas com mecanismos de transdução de sinais (13%) e modificações pós-traducionais, renovação de proteínas, chaperonas (12%). Os trabalhos de validação de genes-alvo estão em andamento e incluem ensaios *in vitro*, *in vivo* e *in planta*.

ABSTRACT

The southern root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (SRN) is worldwide distributed, causing great losses in several crops. Its life cycle comprises six developmental stages (egg, four juveniles and adult). The infective stage larva 2 (L2) enters the host root via mechanical force and enzymatic degradation, and establishes the host-pathogen interaction. Under favorable parasitism conditions the L2 differentiates into an apomitic female adult that resumes its life cycle by depositing up to 2000 eggs. Current agronomic traits are not effective against the SRN, so, a powerful and promising strategy to the nematode control is the production of transgenic plants expressing molecules that are able to hinder the infection process. In this way, the promising one is the anti-feeding strategy based upon digestive enzymes inhibition and the first chapter shows an analysis of EST encoding proteinase from the data bank, beyond the complete characterization of isolated cDNAs. Aspartic proteinase ESTs are more abundant in larval stages than eggs or females. Only eggs library showed serine proteinase ESTs. On the other hand, cysteine proteinase ESTs are the most abundant and are found in all life stages. The *Mi-asp1* cDNA encodes a cathepsin D-like with several known nematode orthologues. Temporal and spatial expression analysis showed that *Mi-asp1* is most transcribed in eggs than larva L2 or female, suggesting an important role during nematode embryogenesis. In the second chapter, in order to identify the genes involved in the infection and other vital processes, a cDNAs library was constructed from L2 mRNAs using the Superscript Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning (Invitrogen). Up to the moment, the L2 cDNA library was constructed, in which 2,137 valid sequences with 17% of redundancy, distributed in 1,506 singlets and 197 contigs, generated with 631 sequences. Sequence annotation was obtained by comparing BLASTx results (GenBank). *In silico* analysis of obtained sequences were performed functional prediction, phylogenetic grouping, horizontal-transferred genes prediction and determination of plant-pathogen interaction. Prediction of gene function by KOG categories classification demonstrated that several sequences are related to signal transduction mechanisms (13%) and postranslational modification, protein turnover, chaperones (12%). Validation works are in test and include *in vitro*, *in vivo* and *in planta* assays.

“Nothing in biology makes sense except in the light of evolution.”

– Theodosius Dobzhansky, *Evolution* (1977)

“Uma espécie biológica ... deve ser vista como um depósito de genes que são potencialmente transferíveis. Uma espécie não é meramente um volume de capa dura da biblioteca da natureza. Ela também é um livro de folhas soltas, cujas páginas individuais, os genes, podem estar disponíveis para uma transferência seletiva e modificação de outras espécies.”

– J. Rifkin, *O século da biotecnologia* (1999)

Desencadernando o Genoma Capa Dura!

O fichário molecular, que chamamos de genoma, desdobra-se em transcriptoma, proteoma, metaboloma, interatoma, enfim, X-oma (ou *oma, para os bioinformatas), com beleza e elegância, sendo fundamental como programa genético dos sistemas termodinâmicos complexos fora do equilíbrio (i.e. seres vivos) e igualmente essencial para o processo evolutivo. Como um livro, seu significado está muito além da sequência de letras no papel, mas está na mente abstrata do leitor. Entretanto, sua leitura é complexa. Há páginas e páginas em branco, às vezes intercalando textos importantes. Várias línguas distintas se misturam, ou pior, se sobrepõem. Não faltam rabiscos, rascunhos e rasuras! Além disso, esse fichário molecular apresenta extrema plasticidade. Algumas páginas são embaralhadas, copiadas, modificadas ou perdidas, entretanto, eventualmente, outras páginas são simplesmente adquiridas de outros fichários bem diferentes!

Admirável Mundo Novo do RNA!

O DNA armazena informação biológica para síntese de PTNs, que executam atividades metabólicas, estruturais, sinalizadoras, regulatórias, etc. Segundo esse paradigma, o RNA era praticamente um “office boy” que levava arquivos da biblioteca ao escritório. Entretanto, sua intensa participação na tradução (tRNA, rRNA e mRNA) já despertava maior interesse. As descobertas da Transcrição Reversa, Duplicação de RNA e Ribozimas abalaram o Dogma Central da Biologia Molecular, culminando na valorização do RNA e na proposta do Mundo do RNA, uma época do passado remoto, etapa fundamental da origem e evolução da vida. Recentes descobertas de silenciamento gênico por siRNA (RNAi resultante da interação dsRNA e DICER) e regulação da expressão gênica por microRNA (antigos snRNA) têm gerado uma supervalorização do RNA inquestionável, modificadora de paradigmas, extremamente revolucionária, trazendo à luz do conhecimento um mundo completamente novo e inimaginável.

I – INTRODUÇÃO

I.i. Fitonematóides Endoparasitas Sedentários.

Os nematóides, comumente chamados de vermes arredondados, são extremamente abundantes, representando 80% dos indivíduos do reino Animalia (Platt, 1999), e extensivamente diversificados, com estimativas de 100 mil a um milhão de espécies (De Ley e Blaxter, 2002), compondo o filo Nematoda. Apesar da estrutura relativamente simples, tubo dentro de tubo, eles exibem uma perfeita adaptação aos mais diferentes nichos ecológicos. A grande maioria das espécies de nematóides é de vida-livre, que se alimentam de bactérias, algas, fungos ou nematóides. Por outro lado, poucas espécies não relacionadas, de grande importância, parasitam hospedeiros de diferentes filos e reinos (**Figura I.i**), sugerindo uma certa predisposição adaptativa para a evolução do parasitismo (Baldwin *et al.*, 2004), seja em animais (vertebrados ou invertebrados) ou plantas (Parkinson *et al.*, 2004a; Scholl e Bird, 2005).

Os fitonematóides endoparasitas sedentários, divididos em três gêneros *Globodera*, *Heterodera* (ambos nematóides formadores de cisto, NFC) e *Meloidogyne* (nematóides formadores de galhas, NFG), são os patógenos mais danosos para várias culturas pelo mundo afora (Sasser, 1980), representando perdas agrícolas mundiais de US\$ 100 bilhões anualmente (Sasser e Freckman, 1987). Dentre esses, *Meloidogyne incognita* devido a sua distribuição mundial (Sasser *et al.*, 1983; Trudgill, 1995), reprodução apomítica e vasta gama de plantas hospedeiras (Jepson, 1987; Ehwaeti *et al.*, 1999), é provavelmente o mais importante patógeno de plantas (Trudgill e Blok, 2001).

O ciclo de vida de nematóides consiste de seis estádios fenológicos: ovo, quatro larvais e adulto (**Figura I.ii**). A larva de segundo estágio (L2), fase infectiva, penetra na raiz da planta hospedeira e migra pelo cilindro vascular, via força mecânica do estilete e degradação enzimática da parede celular e lamela média, para estabelecer as interações planta-patógeno (Eycken *et al.*, 1996; Gheysen e Fenoll, 2002). Após sucessivas ecdises, a larva L2 se diferencia em L3 e L4, assumindo uma forma salsichóide. Quando em condições desfavoráveis de parasitismo, o L4 se diferencia em macho adulto, vermiforme, que abandona o hospedeiro. Por outro lado, quando favorável, ocorre diferenciação em fêmea adulta, com forma de pêra, completando seu ciclo em menos de um mês ao depositar em torno de 2.000 ovos (Williamson e Gleason, 2003).

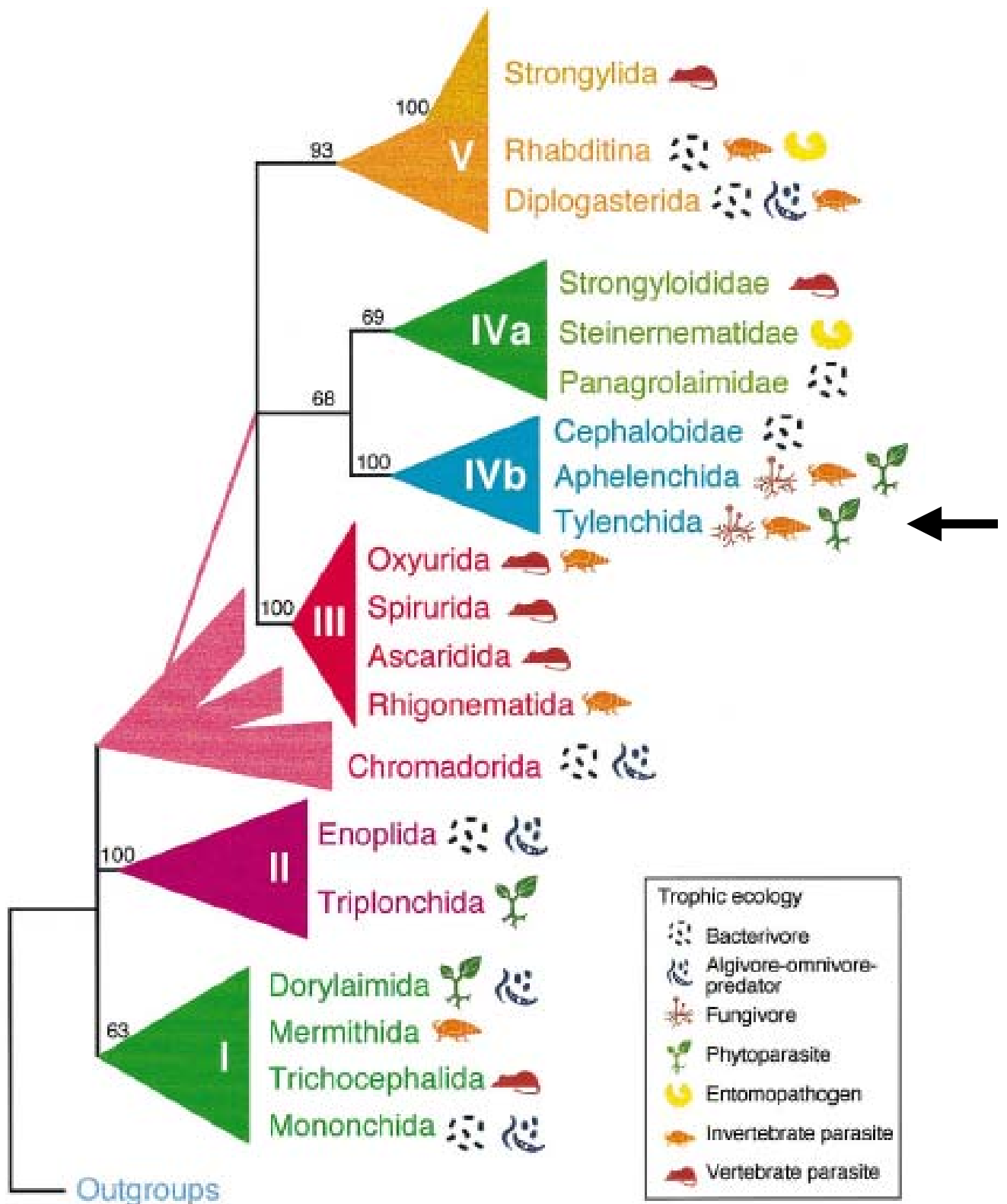


Figura I.i – Filograma de nematóides baseado em SSU rRNA. A baixa correlação entre a análise filogenética com as interações ecológicas demonstra que a evolução do parasitismo de nematóides por plantas, vertebrados e invertebrados é um tema recorrente, complexo e polifilético. Em destaque por seta, a ordem Tylenchida (CladoIVb), que agrupa os NFG e NFC, chamados conjuntamente de endoparasitas sedentários. Figura original de Dorris *et al.*, 1999.

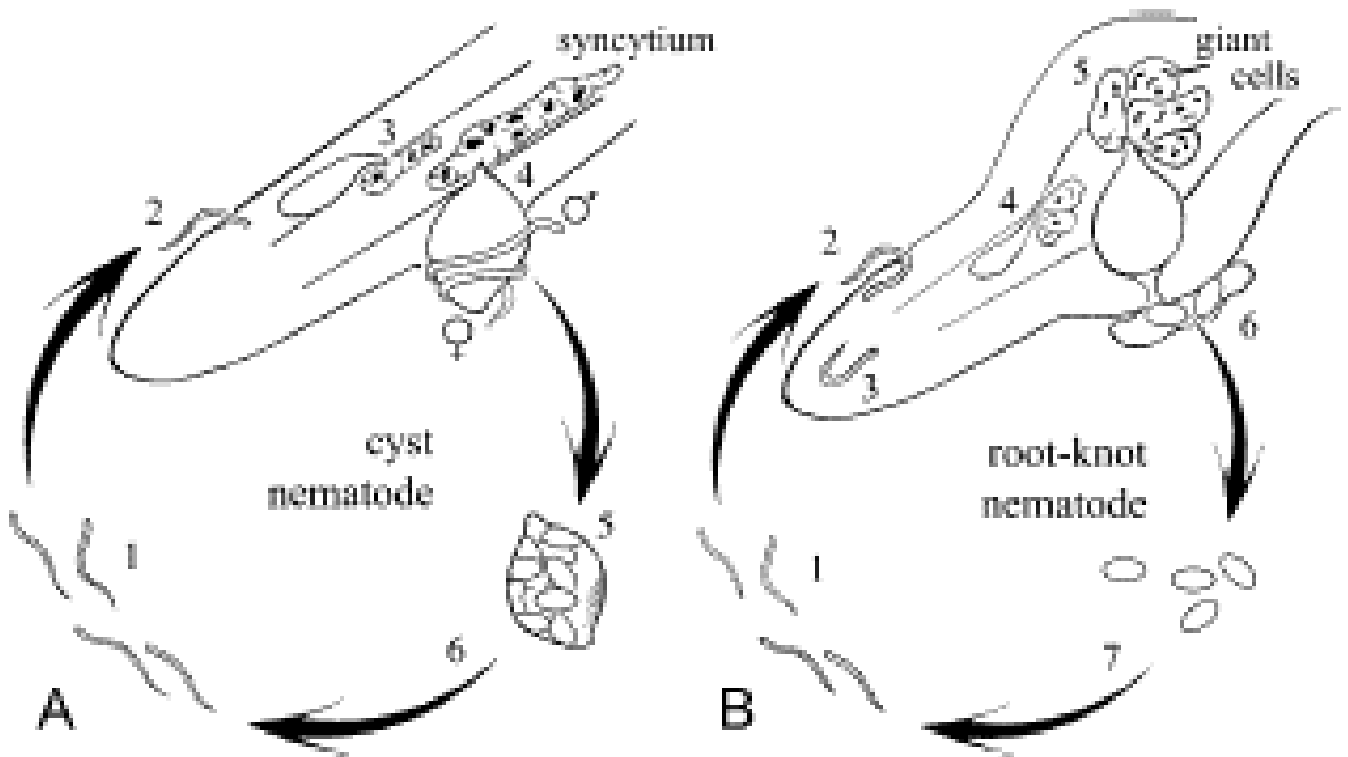


Figura I.ii – Ciclo de vida de fitonematóides endoparasitas sedentários. Devido à íntima e sofisticada interação molecular planta-nematóide, os endoparasitas sedentários habitam o hospedeiro interna e permanentemente. **(A)** Larvas L2 de NFC migram através de células vegetais rompidas mecanicamente e digeridas enzimaticamente, ao atingirem o cilindro vascular, rompem as células vizinhas para formação do sincício. As fêmeas sedentárias se transformam nos cistos, estrutura protetora dos ovos com alta persistência no solo. **(B)** Larvas L2 de NFG migram entre as células vegetais, facilitadas pela digestão da lamela média, e modificam a fisiologia celular para a formação de células gigantes e galhas. As fêmeas adultas depositam seus ovos em massa protéica.

I.ii. Biologia dos Nematóides Formadores de Galhas.

As estratégias reprodutivas de fitonematóides variam de anfimíticos (fecundação cruzada) obrigatórios a partenogênicos obrigatórios, com seus intermediários facultativos (Trudgill e Blok, 2001). Não por coincidência, as três principais espécies de NFG (*M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*), patógenos muito danosos devido à ampla gama de hospedeiros (polifagia), são todas apomíticas, ou seja, sua reprodução é por partenogênese mitótica obrigatória (Triantaphyllou, 1985). Desde então, relaciona-se apomixia com polifagia, assim como anfimixia ou partenogênese meiótica facultativa com especialização de hospedeiro, com raras exceções. De 60 espécies de NFG, 32 parasitam plantas dentro de alguma subclasse (Eisenbeck e Triantaphyllou, 1991). Além disso, os NFG apomíticos são excelentes fitopatógenos, possuindo como hospedeiros potenciais mais de 250.000 espécies de angiospermas (Trudgill, 1995), distribuídas em virtualmente todas as famílias de plantas (Jepson, 1987).

Diversas observações e estudos têm sido feitos para entender a evolução da partenogênese. Também é sabido que a evolução da partenogênese surgiu em grupos diversos e distintos como uma degeneração da anfimixia, podendo ser encontrada em invertebrados e vertebrados. Tal processo está associado ao aumento da taxa reprodutiva e da habilidade de colonização (Trudgill e Blok, 2001). Há duas teorias para o surgimento da partenogênese: endocruzamento ou hibridização interespecífica.

Sabe-se que os organismos de solo apresentam uma dificuldade de migração em seu ambiente (Dalmasso e Bergé, 1983), o que provavelmente seria resolvido pela partenogênese. Sabe-se que 40% das espécies de nematóides de solo são partenogênicas (Ritz e Trudgill, 1999). Nematóides de solo têm baixa capacidade de dispersão que, associado ao comportamento sedentário, resultam em grande taxa de endocruzamento (Trudgill e Blok, 2001). Por essa hipótese, modificações citogenéticas levariam as espécies para a partenogênese meiótica, como um passo intermediário, e, por fim, para a apomixia. De fato, durante a evolução do NFG, o genoma sofreu grandes modificações citológicas envolvendo poliploidias, aneuploidias e rearranjos cromossômicos (Semblat *et al.*, 2000), que, devido à natureza holocêntrica de seus cromossomos, esses não foram perdidos nas gerações subseqüentes (Triantaphyllou, 1981). Tudo indica que o número atual de cromossomos por genoma haplóide é 18 ($n=18$), mas que nas espécies ancestrais seria 9. Populações de *M. hapla*, geralmente partenogênicos facultativos, apresentam de 26 a 68 cromossomos, sendo diplóides, triplóides, tetraplóides e

hermafroditas não-funcionais (Triantaphyllou, 1984; 1991; 1993). Geralmente as espécies apomíticas possuem de 40 a 50 cromossomos, sendo provavelmente triplóides, porém já foram detectadas populações de *M. incognita* diplóides com 32 a 36 cromossomos (Triantaphyllou, 1979). A duplicação de cromossomos gerando tetraplóides foi relatada em *M. microcephala* ($4n=74$), em populações partenogênicas mitóticas (Triantaphyllou e Hirschmann, 1997), e em *M. hapla* ($4n=68$), quando partenogênico meiótico (Triantaphyllou, 1984).

A evolução da partenogênese por hibridização de espécies, ou seja, a origem reticulada, tem recebido mais crédito dos biólogos moleculares (Trudgill e Blok, 2001). O modelo utilizado é o observado para lagartos, onde o cruzamento de espécies anfimixas diferentes resulta em uma nova espécie híbrida partenogênica. Como o evento não é único, os lagartos partenogênicos apresentam grau de heterozigosidade maior que o esperado. A hibridização de *M. chitwood* com *M. fallax*, simpátricos, proximamente relacionados e partenogênicos facultativos, produz F1 de fêmeas viáveis. Sua F2 não é viável por partenogênese (Beek Van Der e Karssen, 1997), porém pode gerar larvas viáveis quando retrocruzado com um dos dois primeiros, formando uma espécie reticulada (Dalmaso e Bergé, 1983; Castagnone-Sereno *et al.*, 1993; Hugall *et al.*, 1999).

O suporte fundamental dessa hipótese é que a variação no DNA genômico dos NFG apomíticos é maior que a variação no DNA mitocondrial (Hugall *et al.*, 1999). Assim, acredita-se que os NFG apomíticos teriam surgido recentemente, de forma reticulada, e dispersados para todo o mundo acompanhando as fronteiras agrícolas (Trudgill e Blok, 2001).

Uma versão proposta é que *M. arenaria* seja um híbrido de duas espécies de NFG diferentes. Porém, *M. incognita* e *M. javanica*, que são os mais relacionados filogeneticamente, não demonstram ser os ancestrais de *M. arenaria*. Novas observações sugerem que a triploidia possa ser uma característica ancestral compartilhada pelos ancestrais dessas três espécies apomíticas e que as perdas e/ou fusões cromossomais tenham ocorrido mais recentemente (Triantaphyllou, 1985), hipótese mais recentemente apoiada por análises filogenéticas (Scholl e Bird, 2005)

I.iii. Interação Planta-Nematóide.

Os fitonematóides endoparasitas sedentários formam uma interação muito íntima e sofisticada com a planta hospedeira (Abad *et al.*, 2003), promovendo a invasão do tecido vegetal, a evasão dos mecanismos de defesa e a formação dos sítios de alimentação permanentes (Davis *et al.*, 2004).

Os NFG e NFC, quando larvas L2 recém eclodidas, procuram as raízes dos hospedeiros usando um apurado sistema sensorial que percebe exudados, por quimiotaxismo. Larvas infectivas não se alimentam até o estabelecimento do parasitismo e suas reservas energéticas são gotas de lipídeos (Abad *et al.*, 2003), armazenadas na porção posterior de seu corpo, suficientes para duas semanas. A penetração da raiz se dá na base da coifa, na zona meristemática. Após migração no tecido, facilitada por celulases, pectinases e proteases (Hussey *et al.*, 2002), intracelular em NFC e intercelular em NFG, os nematóides atingem o parênquima vascular, onde induzem a formação do sítio de alimentação.

Para um parasitismo bem sucedido, o fitonematóide depende muito da formação do sítio de alimentação (Van Der Eycken *et al.*, 1996), pois será sua única fonte de nutrientes durante todo seu ciclo de vida (Williamson e Gleason, 2003). O sítio de alimentação é o conjunto de células vegetais diferenciadas situadas na porção anterior do nematóide. Apesar de estrutural e funcionalmente equivalentes, afinal são grandes e funcionam como drenos de nutrientes do cilindro vascular para o fitonematóide, sua formação é diferenciada em NFC e NFG (**Figura I.ii**). Os NFC induzem a formação de sincício multinucleado, a partir da fusão citoplasmática de células da vizinhança. Já os NFG modificam o ciclo celular, balanço hormonal, sinalização celular, expressão gênica e fisiologia, induzindo a formação de três a cinco células gigantes multinucleadas (Bird e Kaloshian, 2003). Curiosamente, alguns poucos nematóides parasitas de animais também modificam a expressão de genes do hospedeiro (Gheysen e Fenoll, 2002; Jasmer *et al.*, 2003), gerando fenótipos convergentes similares às modificações induzidas por nematóides parasitas de plantas (Davis *et al.*, 2004).

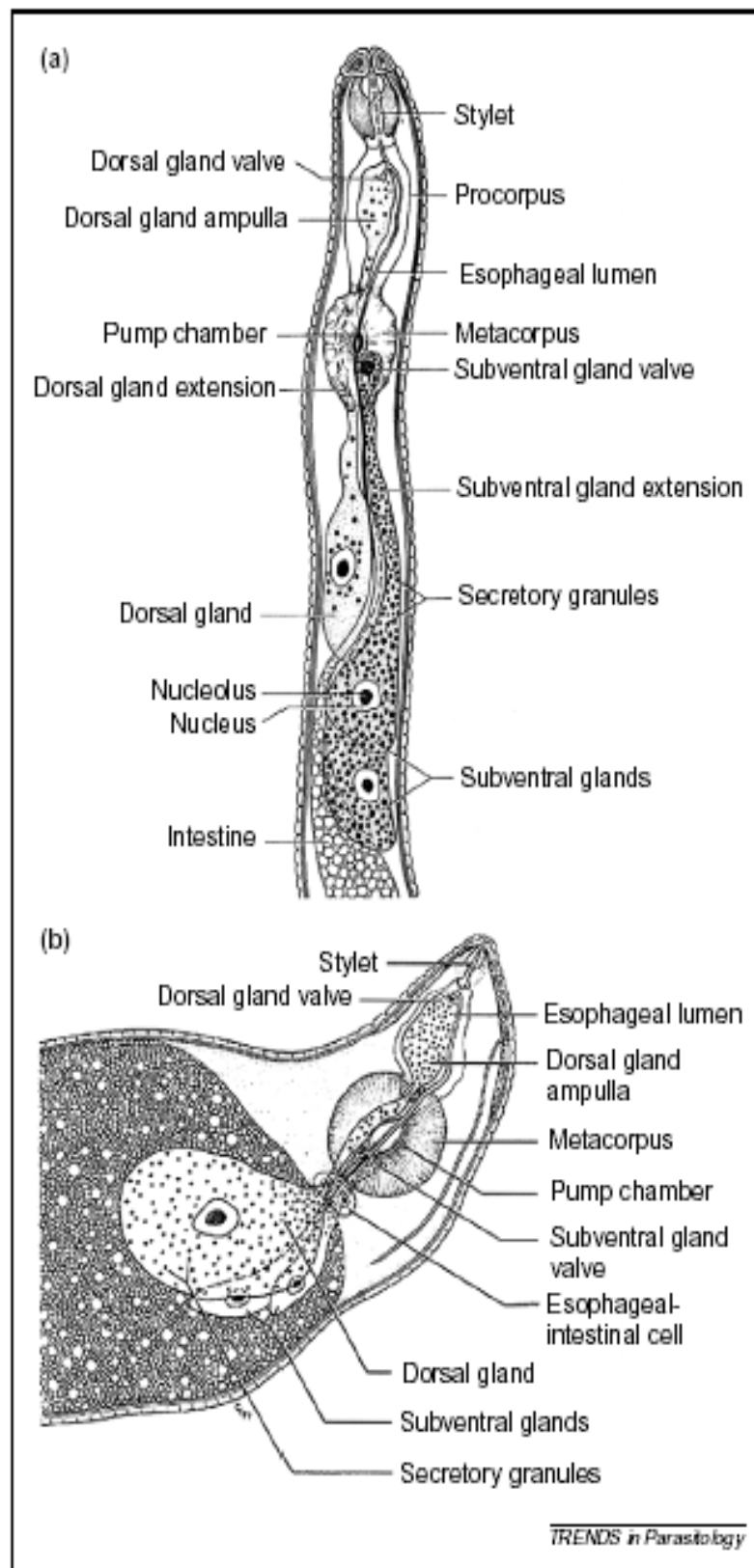


Figura I.iii – Anatomia de fitonematóides endoparasitas sedentários. (A) Larva infectiva L2 e sua estrutura interna. Destaca-se as duas glândulas subventrais hipertrofiadas (“Subventral glands”), relacionadas com o estabelecimento do parasitismo, enquanto a glândula dorsal (“Dorsal gland”) está atrofiada. (B) Fêmea adulta parasita com as glândulas subventrais atrofiadas e a glândula dorsal hipertrofiada, associada à manutenção do parasitismo. Figura original de Davis *et al.*, 2004.

I.iv. Genes de Parasitismo.

Nematóides sedentários produzem ampla gama de proteínas de secreção (Hussey *et al.*, 2002) que são então secretadas na interface do nematóide com as células hospedeiras que se diferenciam em sítio de alimentação (**Figura I.iii e I.iv**). Assim, sua formação e manutenção têm sido fortemente correlacionada com as secreções protéicas de nematóides (Vanholme *et al.*, 2004), nomeadas de proteínas do parasitismo, secretoma ou ainda parasitoma (Davis *et al.*, 2004), que promovem uma mudança radical na expressão de genes e regulação do metabolismo dessas células vegetais (Davis *et al.*, 2000). As duas glândulas subventrais são maiores e mais ativas durante a segunda fase larval L2 e, por isso, são relacionadas ao estabelecimento do parasitismo, especificamente invasão da raiz, migração nos tecidos e indução do sítio de alimentação (Huang *et al.*, 2003). Por outro lado, a fêmea adulta apresenta uma glândula dorsal super-desenvolvida e produtora de secreções diferentes e relacionadas à manutenção do parasitismo (Bird e Kaloshian, 2003).

Grandes esforços têm sido aplicados por vários grupos de pesquisa para elucidar essa interação molecular parasita-hospedeiro e descobrir genes de parasitismo por meio de variadas estratégias e abordagens. Já existem várias bibliotecas de ESTs de nematóides diversos (Parkinson *et al.*, 2003) e algumas de *M. incognita* (Mccarter *et al.*, 2003) para descoberta de moléculas-alvo para interrupção do parasitismo. Uma recente técnica é a microaspiração das glândulas subventrais (**Figura I.iii**) para a construção de uma biblioteca de cDNAs específicos de glândulas ativas durante a fase infectiva e de estabelecimento do parasitismo (Gao *et al.*, 2001; Jaubert *et al.*, 2002b; Huang *et al.*, 2003). Apesar de muito elegante, essa estratégia negligencia genes de parasitismo expressos em anfídeos (Davis *et al.*, 2004), que são órgãos quimiossensitivos e secretórios, além de não considerar genes-alvo críticos no desenvolvimento, ecdise, digestão, reprodução, entre outros. Resumidamente, os trabalhos de identificação de genes de parasitismo, ou diretamente, de proteínas de parasitismo, têm resultado normalmente em proteínas totalmente desconhecidas, ou seja, pioneiras, e proteínas características de microrganismo, sem homologia com nenhuma proteína conhecida de metazóario.

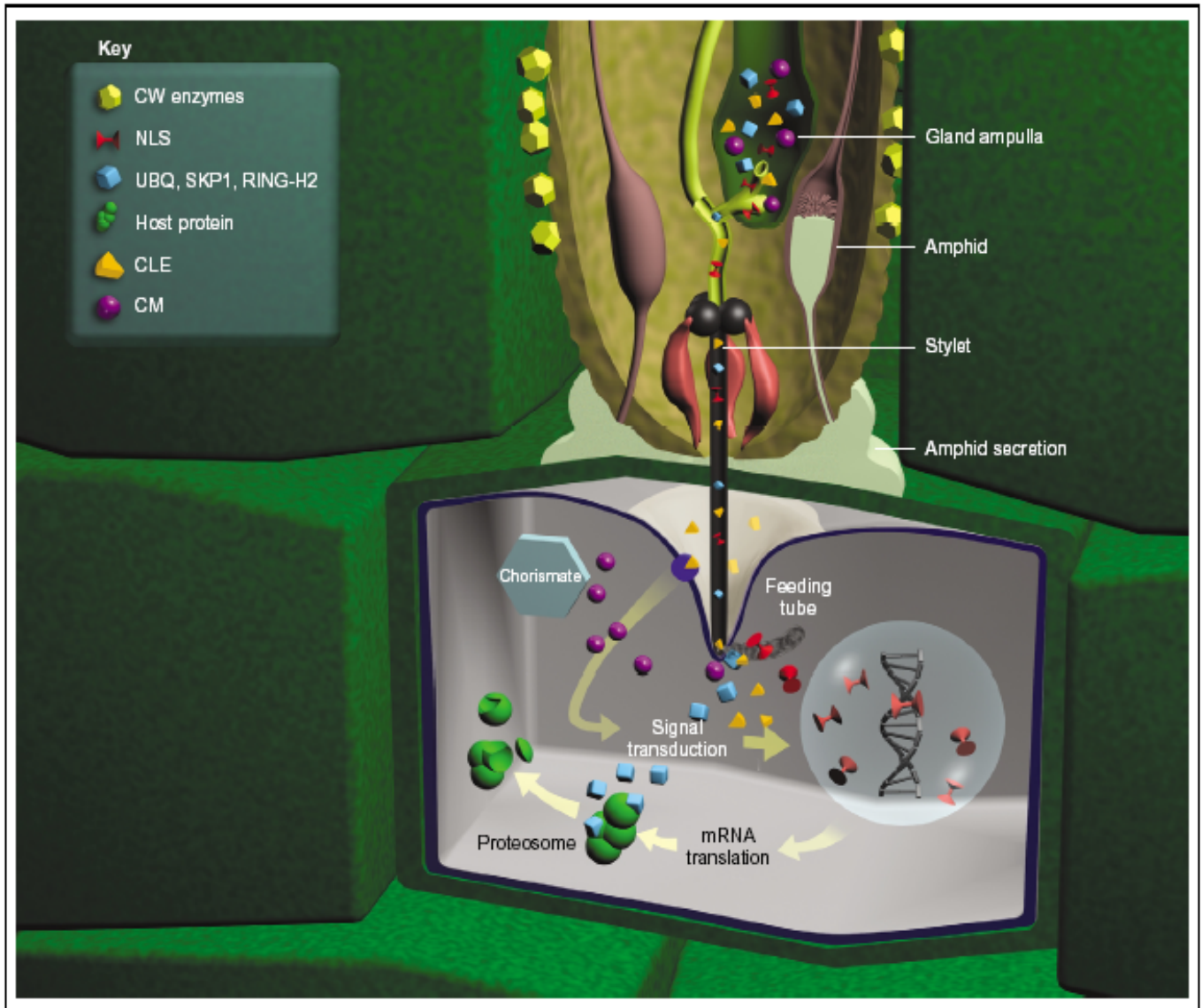


Figura I.iv – Representação esquemática da interação molecular planta-nematóide. A partir da secreção de proteínas de parasitismo, secretoma ou parasitoma, ocorre uma desprogramação da regulação da expressão gênica da célula vegetal hospedeira, a fim de transformá-la em dreno de nutrientes para os nematóides. Vários mecanismos de alteração da fisiologia celular têm sido abordados envolvendo alterações na síntese de hormônios vegetais, na transdução de sinais, na indução de mitose, na duração de mRNAs e proteínas vegetais e na ativação/inibição da expressão de genes do hospedeiro. Essas proteínas da secreção direta ou indiretamente modificam as células vegetais para a formação do sítio de alimentação em NFG (*Meloidogyne* spp.) ou sincício em NFC (*Heterodera* spp. e *Globodera* spp.). Figura de Davis *et al.*, 2004.

I.v. Evolução do Parasitismo de Plantas por Nematóides.

Considerando os rápidos avanços da nematologia atual na abordagem genômica, genômica funcional (transcriptômica e proteômica) e genética reversa (RNAi), as análises comparativas, para inferências e extrapolações de genes de parasitismo, dependem de uma compreensão prévia da filogenia dos nematóides e da evolução do parasitismo. O desafio é grande, pois acredita-se que o filo Nematoda tenha surgido antes do Cambriano (~ 750-650 Maa), existindo algumas estimativas mais generosas como 1.300 Maa (Peterson *et al.*, 2004; Blair e Hedges, 2005). Além disso, os nematóides são altamente diversificados (De Ley e Blaxter, 2002) e não deixam muitas pistas evolutivas na forma de registro fóssil. Tomando como base à sistemática molecular baseada em SSU (“nuclear small subunit”) rRNA, (**Figura I.i**), observa-se que não há forte correlação entre nicho, tipos de alimentação, parasitismo e hospedeiro, com sua filogenia. Provavelmente a adaptação de nematóides ao parasitismo evoluiu nove vezes distintas (Dorris *et al.*, 1999).

Pensando no hospedeiro, as plantas terrestres têm origem estimada em torno de 450 Maa, resultando num enorme período de coexistência com nematóides (Baldwin *et al.*, 2004). O parasitismo de plantas por nematóides provavelmente evoluiu separadamente três ou quatro vezes distintas, sendo então uma característica polifilética, gerada por convergência evolutiva (Dorris *et al.*, 1999). Considerando as espécies conhecidas, os fitonematóides estão distribuídos nas ordens Dorylaimida (Clado I), Triplonchida (Clado II), Aphelenchida (Clado IVb) e Tylenchida (Clado IVb), sendo os ancestrais desses três clados filogeneticamente distintos e distantes.

Inicialmente, existem vários estilos de parasitismo de plantas por nematóides, conforme os diferentes níveis de interação com a planta, sendo ectoparasitas migratórios, endoparasitas migratórios, ectoparasitas sedentários ou endoparasitas sedentários (Hussey *et al.*, 2002). Os endoparasitas parecem depender de enzimas de digestão de parede celular e os sedentários precisam dos sítios de alimentação (Jasmer *et al.*, 2003). No outro extremo, as ordens Dorylaimida e Triplonchida são exclusivamente ectoparasitas migratórios e incluem espécies que não são parasitas de plantas, apesar de possuírem estruturas de alimentação em plantas. Se por um lado não fazem interações tão sofisticadas com os hospedeiros, são vetores específicos de viroses que coevoluíram com esses nematóides (Baldwin *et al.*, 2004). Já os endoparasitas sedentários, incluídos na ordem Tylenchida, são tão intimamente relacionados que

modificam a fisiologia do hospedeiro, onde habitam e perdem a capacidade locomotora (Trudgill e Blok, 2001).

Considerando que as pressões seletivas para o parasitismo de plantas são exatamente iguais, acredita-se na convergência evolutiva de estruturas morfológicas (estilete, glândulas faríngeas e musculatura faríngea, discutidos nesse tópico) e aparato enzimático (celulases, pectinases, etc, discutidos no tópico seguinte **I.vi**). A parede celular vegetal é sem dúvida a principal barreira aos fitopatógenos, portanto sua digestão enzimática ou perfuração mecânica são necessidades fundamentais na interação planta-patógeno. Dessa forma, a característica primordial e ubíqua de nematóides que se alimentam de plantas é o estilete (“stylet” na **Figura I.iv**), estrutura pontiaguda, protrusível, capaz de perfurar a parede celular, injetar moléculas dentro da célula e sugar seus nutrientes citoplasmáticos. Também se associa a presença de glândulas faríngeas desenvolvidas e especializadas, que auxiliam na digestão extracorpórea do citoplasma vegetal, penetração na raiz, migração no tecido vegetal e/ou indução dos sítios de alimentação (Hussey *et al.*, 2002). Por fim, associa-se a musculatura faríngea bastante reduzida, pois não há grande necessidade de sucção e nenhuma de mastigação. Apesar das semelhanças estruturais e funcionais, essas três características morfológicas compartilhadas pelos fitonematóides não representam ancestralidade comum, mas são resultantes da modificação convergente de diferentes estruturas ou etapas durante o desenvolvimento embrionário (Baldwin *et al.*, 2004).

A maioria dos genes de parasitismo não apresenta homologia, ou apenas com bactérias (Hussey *et al.*, 2002; Jaubert *et al.*, 2002b; Abad *et al.*, 2003; Bird e Kaloshian, 2003; Davis *et al.*, 2004; Vanholme *et al.*, 2004). Dessa forma alguns mecanismos evolutivos são sugeridos para explicar a origem do parasitoma, como: adaptação de genes pré-existentes para codificar novas funções; duplicação gênica e divergência dos parálogos; e finalmente transferência horizontal de genes (**Figura I.v**).

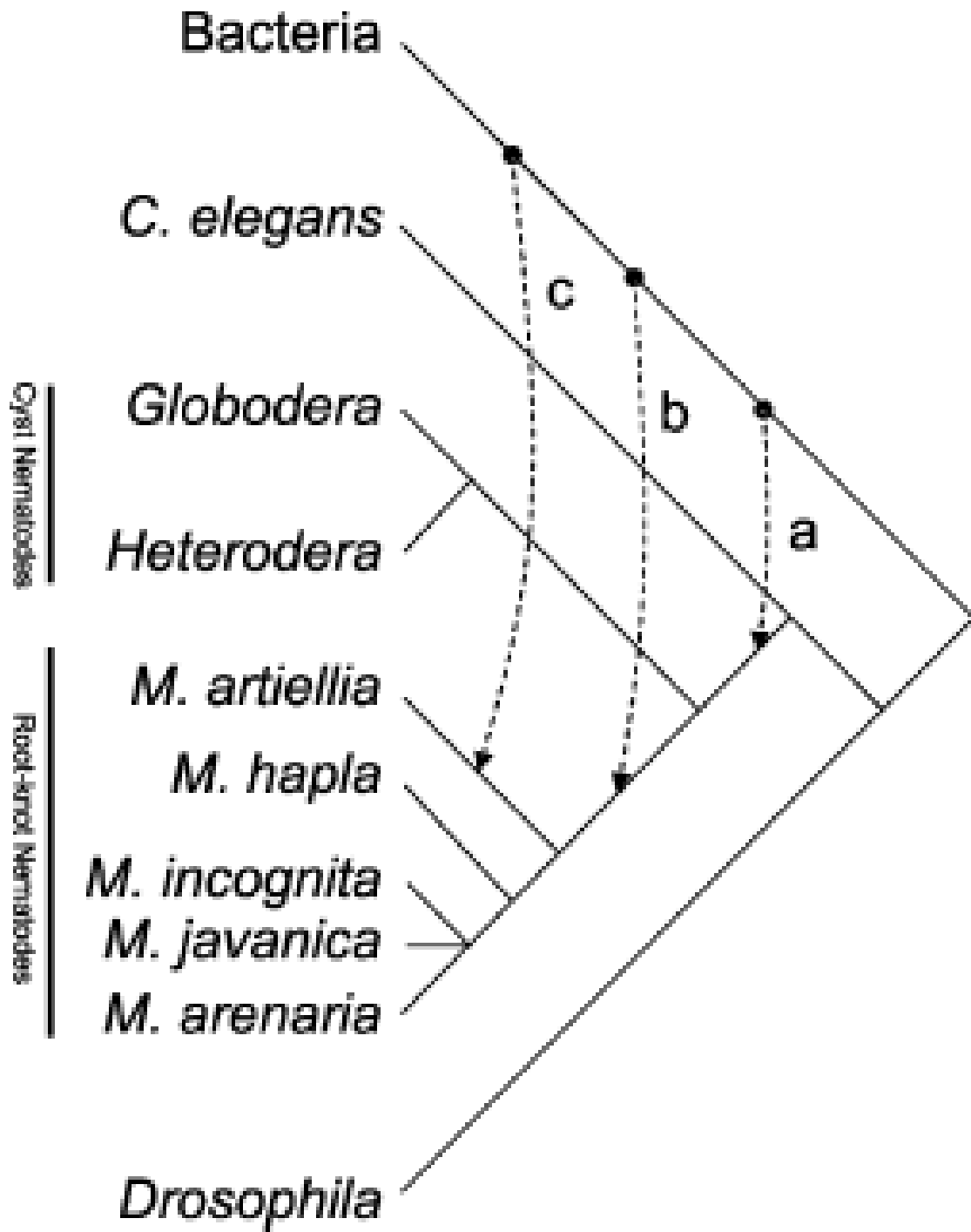


Figura I.v – Dendrograma contrastando ancestralidade com transferência horizontal de genes. (a) Evento muito antigo de transferência horizontal de genes de bactérias para nematóides ancestrais de *Heterodera* spp., *Globodera* spp. e *Meloidogyne* spp. **(b)** Evento antigo, gênero-específico, com a transferência horizontal de genes de bactérias ao ancestral de *Meloidogyne* spp. **(c)** Transferência horizontal recente de gene bacteriano para *Meloidogyne artiellia*, ou seja, evento espécie-específico. Modificado de Bird *et al.*, 2003.

I.vi. Transferência Horizontal de Genes.

Muitos seres vivos se alimentam apenas de, ou principalmente de, plantas. Certamente, uma barreira comum para esses seres (herbívoros, decompositores e fitopatógenos) é a digestão da celulose, o principal constituinte das plantas e o carboidrato mais abundante do planeta. Dessa forma, inúmeras relações simbióticas foram detectadas nos mais diversos animais para a digestão de celulose. A simbiose é regra, afinal: Apenas microrganismos apresentam celulasas (β -1,4-endoglucanase) para digestão de celulose.

Alguns nematóides parasitas de plantas fogem a regra. Inicialmente quatro genes de celulasas foram identificados em *H. glycines* e *G. rostochiensis*, dois de cada (Smant *et al.*, 1998). Ensaio de hibridização *in situ* comprovaram sua transcrição em glândulas subventrais livres de endossimbiontes. Sutil e cuidadosamente, os autores sugeriram a Transferência Horizontal de Genes (THG) como explicação para a fabulosa descoberta. Nos anos subsequentes, outros genes tipicamente bacterianos foram identificados em nematóides: dois de celulasas em *H. schachtii* (De Meutter *et al.*, 1998), um de celulase em *M. incognita* (Rosso *et al.*, 1999), um de corismato mutase em *M. javanica* (Lambert *et al.*, 1999), dois de celulasas em *G. tabacum* (Goellner *et al.*, 2000), um de pectato liase de *G. rostochiensis* (Popeijus *et al.*, 2000), um de poliglutamato sintetase em *M. artiellia* (Veronico *et al.*, 2001), dois de celulasas em *Pratylenchus penetrans* (Uehara *et al.*, 2001), um terceiro de celulase em *H. glycines* (Yan *et al.*, 2001), um de poligalacturonase em *M. incognita* (Jaubert *et al.*, 2002a), um de pectato liase em *M. javanica* (Doyle e Lambert, 2002), um de pectato liase em *H. glycines* (De Boer *et al.*, 2002) e um de celulase em *H. glycines* (Gao *et al.*, 2002). Após apenas quatro anos, se somavam 19 genes de nematóides que codificavam sete grupos de enzimas tipicamente bacterianas. Após essas descobertas, a hipótese de THG de bactérias para nematóides ficou mais sustentada, servindo como paradigma para busca de genes de parasitismo.

Uma biblioteca de ESTs de *M. incognita* com 1.625 grupos apresentou 51 ESTs codificadoras de uma proteína similar a fator de nodulação L (NodL) de *Rhizobium leguminosarum* (Mccarter *et al.*, 2003). Uma nova abordagem foi possível devido ao grande número de ESTs em bancos de dados (Parkinson *et al.*, 2003), além de genomas completos de *C. elegans* e *Drosophila melanogaster*. Partindo de análises *in silico*, 12 genes de THG (seis já caracterizados como THG e seis candidatos novos) foram identificados a partir de aproximadamente 5.000 ESTs (Scholl *et al.*, 2003).

Resumidamente, as ESTs de NFG foram selecionadas seguindo os critérios: principal identidade peptídica com bactérias; ausência nos genomas de *C. elegans* e *Drosophila*; e, por fim, ausência nas seqüências de animais do GenBank não-reduntante (nr). Quatro genes (dos seis candidatos) apresentarem identidade alta com proteínas de rizóbios e, principalmente, por codificarem enzimas relacionadas com a formação do nódulo. Já era sabido que NFG e *Sinorhizobium melioli* apresentavam uma sobreposição nas vias de transdução de sinais de plantas que eram ativadas nas interações parasitárias e simbióticas (Koltai *et al.*, 2001). Apesar dos autores sugerirem a convergência evolutiva para tal “coincidência”, não deixaram de sugerir THG também. Mais recentemente, houve uma comprovação que exatamente a mesma via de transdução de sinais é ativada e que as modificações do citoesqueleto nas células vegetais são similares às aquelas observadas durante a formação das células gigantes, assim como às encontradas na formação dos nódulos (Weerasinghe *et al.*, 2005). Conjuntamente consideradas, as evidências sugerem que essas interações parasitárias e simbióticas são tão parecidas porque, justamente, são orquestradas por genes homólogos.

Os rizóbios, bactérias de solo, são extremamente importantes no processo de fixação biológica de nitrogênio. A inoculação de rizóbios em sementes de soja anteriormente ao plantio representa uma economia anual de US\$ 3 bilhões na produção brasileira de soja, relativa ao custo da adubação com nitrogênio evitada. Vários rizóbios (*Rhizobium* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Sinorhizobium* spp., *Mesorhizobium* spp.) interagem simbioticamente com leguminosas, acumulando-se nos nódulos radiculares por elas induzidos. Os nódulos são formados a partir da modificação fisiológica das células vegetais, resultantes da re-programação da expressão de genes, condicionada por proteínas de nodulação (NodA, NodB, NodC, NodD, NodL, NodX e NodN).

Os gêneros *Agrobacterium*, *Rhizobium* e *Phyllobacterium* encontram-se dentro da mesma família Rhizobiaceae. Na verdade, alguns taxonomistas têm proposto a classificação de *Agrobacterium* como *Rhizobium*. Curiosamente, *Agrobacterium tumefaciens* (ou *Rhizobium radiobacter*) parece ter perdido parte do repertório genético para a simbiose, mas utiliza alguns genes remanescentes em interações de parasitismo (NodL, NodX e NodN), gerando tumores vegetais, na doença galha-de-coroa. Diferente de outras interações de parasitismo, *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. vitis* e *A. rubi* são capazes de introduzir seus genes de virulência (entre as bordas de T-DNA do plasmídeo Ti) em plantas hospedeiras, por meio de um evento de THG entre diferentes domínios da vida (de Bacteria para Eukarya) extremamente conhecido e documentado. As

bactérias *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes* têm sido amplamente utilizadas como ferramenta de engenharia genética para a inserção de genes de interesse (clonados no lugar dos oncogenes) em plantas, gerando então as plantas transgênicas, ou melhor, os organismos geneticamente modificados (OGM). Em condições especiais de laboratório é possível também transformar fungos e células animais, embora os mecanismos de transferência e recombinação não sejam totalmente conhecidos.

O plasmídeo Ti não é funcional quando inserido em *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, mas induz tumor em plantas quando inserido em *Rhizobium trilolli*, *Rhizobium leguminosarum* e *Phyllobacterium myrsinacearum*. Parece que o mecanismo de transformação de plantas requer proteínas codificadas pelo DNA cromossomal. Dessa forma, o plasmídeo Ti só é funcional em bactérias filogeneticamente relacionadas. Recentemente, foi publicado que *Sinorhizobium meliloti* e *Mesorhizobium loti*, munidas do plasmídeo Ti, conseguem transformar plantas com genes repórteres. Muito se especula sobre o papel das bactérias, principalmente da família Rhizobiaceae, nos eventos de THG ocorridos na evolução das plantas. Da mesma forma, considerando os mecanismos intrínsecos de THG em rizóbios e seus genes de simbiose/parasitismo, a evolução do parasitismo de plantas por nematóides pode ter sido facilitada por THG (Bird *et al.*, 2003).

Foi mostrado que a presença de *M. incognita* nas plantas aumenta o número de bactérias endofíticas, quando comparado com plantas não inoculadas, exceto por poucas espécies que sofrem redução. Marcante é o fato de *Pseudomonas* spp. e *Agrobacterium* spp. serem muito abundantes independentemente da presença do NFG (Hallmann *et al.*, 1998). Foi também detectado um grande número ($2,6 \times 10^5$) de bactérias vivas em cistos de NFC (Nour *et al.*, 2003). Ou seja, algumas bactérias e nematóides são simpátricos e compatíveis, um requisito mínimo para THG, e podem ter sido simbioses.

Outros genes de THG foram identificados em nematóides, um de expansina (Qin *et al.*, 2004) e dois de pectato liase em *M. incognita* (Huang *et al.*, 2005), confirmando as hipóteses iniciais. Por outro lado, estudos com nematóides da ordem Aphelenchida, *Bursaphelenchus xylophilus* e *Bursaphelenchus mucronatus*, levantaram novas hipóteses. O primeiro é um importante parasita de pinheiros no Japão, que também se alimenta de fungos. Já o segundo, vive apenas em plantas mortas colonizadas por fungos, seu verdadeiro alimento. Uma família gênica de celulases com 45 membros foi identificada em *B. xylophilus* (Kikuchi *et al.*, 2004), curiosamente mostrando maior semelhança com celulases de fungos, sendo as celulases de Tylenchida mais

semelhantes as de bactérias. Também foi isolado o gene de endo- β -1,3-glucanase (Kikuchi *et al.*, 2005), para digestão de parede celular de fungos, com grande semelhança à genes bacterianos. Por fim, foram isolados dois parálogos de pectato liase em cada *B. xylophilus* e *B. mucronatus* (Kikuchi *et al.*, 2006). Esses genes de pectato liase, quando comparados com os genes dos nematóides da ordem Tylenchida, resultaram em alguns poucos sítios de íntrons conservados e um dendrograma bastante disperso parecendo ser uma característica polifilética. Adicionalmente, genes de celulases também foram encontrados em nematóides filogeneticamente dispersos *Paratrichodorus minor*, *Rotylenchus reniformis*, *Ditylenchus dipsaci* e *Pratylenchus agilis* (Baldwin *et al.*, 2004). Levanta-se a questão, todos os genes de celulases de nematóide são ortólogos de um ancestral remoto, ou houve múltipla THG com perda gênica em algumas linhagens.

A posição comum de alguns íntrons nesses genes sugere um evento remoto de THG em um ancestral comum, seguido de inserção de íntrons de posições conservadas, especiação dos nematóides e inserção de íntrons recentes em posições não compartilhadas. Entretanto, em *C. elegans* parece haver um viés de inserção de íntrons (Coeghlan e Wolfe, 2004), então esses sítios conservados podem ser resultado de convergência evolutiva e não ancestralidade comum. Em suma, a posição do íntron não parece ser um bom indicador de ancestralidade ou THG (Kikuchi *et al.*, 2006).

Os NFG apresentam parálogos de pectato liase que formam dois grupos distintos. Todos os parálogos de NFC permanecem juntos dentro de um dos grupos de NFG. Já os genes de *B. xylophilus* e *B. mucronatus* formam um terceiro grupo praticamente equidistante dos dois grupos de NFG. A explicação mais provável, sem considerar NFG, sugere que o ancestral comum de Tylenchida e Aphelenchida tenha recebido e domesticado um gene de pectato liase por THG de uma bactéria. Inicialmente deve ter ocorrido especiação, para após ocorrer duplicação e adaptação gênica, formando-se os parálogos. Agora, considerando NFG, devemos considerar a duplicação e adaptação gênica anterior a especiação e perda de um dos parálogos nos ancestrais, mas manutenção em NFG. Mais especulativo ainda seria um segundo evento de THG apenas em NFG.

Um questionamento óbvio é: Como assegurar que o gene é de nematóide e não de alguma bactéria contaminante ou simbiótica? Genes bacterianos e genes eucarióticos apresentam algumas diferenças estruturais em decorrência dos mecanismos diferenciais de transcrição, processamento e tradução. Alguns parâmetros são sutis e outros bem

evidentes. Genes eucarióticos nucleares apresentam algumas características não encontradas em genes bacterianos. Esses aparatos são utilizados como marcadores de origem eucariótica, como cauda poliA, íntrons e seqüência líder.

Todos genes preditos de THG apresentam cauda poliA, necessária para a tradução e durabilidade do mRNA. Durante a construção de uma biblioteca de cDNA existe a etapa da transcrição reversa do mRNA que é iniciada a partir do oligonucleotídeo dT (“primer” dT que anela na cauda poliA). Dessa forma, já existe um forte viés para exclusão de genes bacterianos e inclusão de genes eucarióticos.

Os genes de THG também apresentaram íntrons, como comprovação de sua origem não bacteriana. Curiosamente, os íntrons dos genes de THG são relativamente maiores que a média dos íntrons em genes de “nematóides” (Huang *et al.*, 2005). Deve haver então um mecanismo de inserção de íntrons, seguido de outro de encurtamento de íntrons para economia.

Além disso, nematóides realizam um processamento Trans de mRNA, onde a grande maioria dos transcritos primários recebem na extremidade 5’ UTR uma seqüência líder SL (“trans-spliced leader sequence”) altamente conservada (Nilsen, 2001). Muitos genes de THG apresentam SL como indicativo de sua origem de nematóides, não sendo uma regra, entretanto. Em pelo menos três genes de THG, a SL é ausente, não servindo como bom marcador de THG (Veronico *et al.*, 2001). A facilidade de amplificar por PCR um grande número de cDNAs, usando oligonucleotídeos desenhados para pareamento na SL e poliA (Wang *et al.*, 2001), apesar de interessante, curiosamente não atendeu a expectativa inicial em relação a descoberta de genes de parasitismo. Afinal, os 20% dos genes sem SL parecem representar uma fração rica dos genes de THG, que se correlacionam com os genes de parasitismo tão procurados (Scholl *et al.*, 2003).

Os genes de THG apresentam alguns aparatos relacionados com genes eucarióticos nucleares. Por outro lado, codificam proteínas com alta semelhança às bacterianas e sem qualquer homólogo nos genomas e transcriptomas de animais. Daí surgem duas hipóteses: houve THG de bactérias para nematóides; ou então, esses genes estavam presentes nos ancestrais de metazoários e, após a múltipla perda gênica em linhagens independentes, desapareceram da grande maioria, exceto alguns nematóides parasitas de plantas. Obviamente, a primeira alternativa é muito mais parcimoniosa e justifica a hipótese de THG entre domínios da vida (Scholl *et al.*, 2003).

Em conclusão, parece que os genes adquiridos por THG sem vantagem adaptativa foram perdidos e os com função importante foram mantidos e domesticados. A domesticação envolve aquisição de seqüências regulatórias (promotores e “enhancers”), íntrons, sítio de poliadenilação e, eventualmente, sítio para processamento Trans (adição de SL). A domesticação também resulta em modificação do percentual de GC e de códon preferencial (“codon usage”). Assim, a seqüência de DNA é muito variada entre genes de THG e seus homólogos bacterianos, onde GC% e códon preferencial não são informativos. A única conservação está na seqüência da proteína, principal indicador do evento de THG (Scholl *et al.*, 2003).

I.vii. Controle de Nematóides.

As práticas agrícolas atuais não são efetivas no controle desses nematóides (Atkinson *et al.*, 2003; Williamson e Gleason, 2003). Apenas em casos específicos, o uso de nematicidas, agentes de controle biológico, rotação de culturas e/ou variedade resistente têm tido sucesso (Williamson e Gleason, 2003). De maneira geral, a aplicação de nematicidas é excessivamente cara, muitas vezes ineficiente (Shomaker e Been, 1999), além representar sérios riscos de contaminação do meio ambiente e de intoxicação do agricultor e consumidor (Jeyaratnam, 1990). Em relação aos agrotóxicos, estima-se que o custo do controle de nematóides pode equivaler a três vezes a soma dos gastos contra insetos, fungos e plantas daninhas (Bird e Kaloshian, 2003).

O principal agente de controle biológico (ACB) é a bactéria de solo *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), que durante sua esporulação produz um cristal entomotóxico gerado por uma ou várias proteínas Cry. Inicialmente as bactérias, produzidas industrialmente em fermentadores, eram pulverizadas diretamente nas folhas e caules das culturas assoladas por insetos. O custo das aspersões, associados à baixa permanência e viabilidade de *Bt*, respectivamente devido à exposição às chuvas e à radiação solar, além da impossibilidade do aspersor atingir certos órgãos vegetais, motivou a transformação genética de plantas com genes *Cry*. Atualmente, o gene *Cry* é o principal transgene das culturas de Milho, Algodão e Soja, amplamente plantado em todo o mundo. Excepcionalmente eficientes e específicas, as proteínas Cry são atualmente classificadas conforme seqüência de aminoácidos e estrutura de domínios conservados, em contra partida à classificação antiga que levava em conta a ordem dos insetos-alvo e a estrutura do cristal. Algumas classes já demonstraram atividade contra nematóides.

Uma linha de pesquisa bastante interessante para o controle de nematóides seria o isolamento de genes Cry específicos para nematóides, ou ainda, um embaralhamento de DNA (“DNA shuffling”) de genes Cry com seleção de mutantes por bioensaios contra nematóides.

As bactérias de solo *Pasteuria* spp. se aderem à cutícula do nematóide, invadindo e colonizando ovos, larvas e adultos. Quase a totalidade da literatura sobre controle biológico de NFG e NFC se trata respectivamente de *P. penetrans* e *P. nishizawae*. Apesar de muito promissora, até o momento não existe aplicação em grande escala dessa bactéria, principalmente porque não há uma forma de produção em larga escala e sua alta especificidade restringe os nematóides-alvo (Bird *et al.*, 2003). Alguns trabalhos relatam que a taxa de mutação nas proteínas da cutícula dos nematóides, necessárias para interação com *P. penetrans*, é muito alta, inviabilizando um uso amplo e duradouro desse ACB (Trudgill e Blok, 2001).

Dessa forma, existe uma grande demanda por outras tecnologias para o controle de fitonematóides. Uma solução têm sido encontrar, a partir de variedades com resistência natural, genes R, que logo são incluídos em programas de melhoramento genético de plantas perenes e anuais no sentido de melhorar o controle de nematóides por práticas ambientalmente seguras (Roberts, 1992).

I.viii. Resistência Natural de Plantas.

Aparentemente todas as plantas são parasitadas por nematóides. Entretanto, de fato, algumas significativas exceções têm sido descritas. Ou seja, algumas plantas evoluíram mecanismos de escape, devido à enorme pressão seletiva, das mais diversas formas possíveis. De maneira geral, essas plantas são classificadas em plantas antagonistas, armadilhas, não-hospedeiras e resistentes. Eventualmente, essa classificação é controversa, com sobreposição de classes e diferentes autores difusamente nomeiam as classes ou classificam as plantas.

A princípio, plantas antagonistas são aquelas que secretam substâncias nematicidas no solo e contribuem para a diminuição da população de nematóides. A natureza dessas substâncias tem sido discutida e alguns pesquisadores acreditam que sejam derivadas da síntese de metabólitos secundários, ou seja, de natureza não-protéica, mas um terpeno ou alcalóide.

Plantas armadilhas também apresentam a capacidade de matar os nematóides, mas, além disso, suas raízes são atrativas para os nematóides. Funcionam com armadilhas, pois atraem as larvas L2 infectivas, mas não permitem o estabelecimento do parasitismo e a continuidade do ciclo de vida. Geralmente plantas antagonistas e armadilhas não têm valor econômico direto, apenas indireto por aumentar a produtividade da planta de interesse que é semeada junta em consórcio ou, posteriormente, na rotação de cultura.

Plantas não-hospedeiras não liberam exudados atrativos no solo, ou liberam repelentes, de forma que os nematóides não migram em sua direção e não tentam estabelecer parasitismo.

Por outro lado, as plantas resistentes são invadidas pelos nematóides, mas o parasitismo não é estabelecido devido a mecanismos de resistência espacial, temporal e funcionalmente distintos conforme cada caso (Trudgill e Blok, 2001). Plantas e seus patógenos operam, muitas vezes, num sistema de interação gene-a-gene. Assim, o patógeno pode apresentar um gene de avirulência, cujo produto avisa sua presença à planta. Por outro lado, a planta pode apresentar um gene de resistência, cujo produto detecta o patógeno e desencadeia uma resposta hiperssensitiva. Para que de fato ocorra resistência, cada qual deve possuir o gene de avirulência e resistência.

I.ix. Transformação Genética de Plantas.

O melhoramento genético clássico para geração de plantas resistentes a nematóides é limitado principalmente pelo reduzido número de fontes naturais de resistência e incompatibilidade sexual entre espécies diferentes, além da grande dificuldade de avaliar e quantificar a resistência a nematóides (Lilley *et al.*, 1999b). Apesar de apresentar outras dificuldades, a transformação de plantas por engenharia genética é a alternativa mais promissora para o desenvolvimento de plantas resistentes a nematóides (Atkinson *et al.*, 2001).

A transformação genética de plantas visando à obtenção de cultivares resistentes tem gerado grandes expectativas como uma ferramenta específica, efetiva e poderosa no controle de nematóides. Estratégias anti-nutricionais (“anti-feeding strategy”) ocorrem normalmente em interações naturais entre hospedeiros e seus parasitas e pragas, baseadas na produção de inibidores enzimáticos, como observado em plantas tolerantes à insetos e patógenos (Lilley *et al.*, 1999a). Nematóides do cisto e da galha possuem

proteínases que asseguram a digestão do conteúdo citoplasmático do sítio de alimentação (Lilley *et al.*, 1996; Lilley *et al.*, 1997; Urwin *et al.*, 1997a; Neveu *et al.*, 2003; Fragoso *et al.*, 2005). De fato, a estratégia de controle de nematóides mais promissora está baseada no bloqueio ou redução do processo digestivo (Atkinson *et al.*, 2003). Trabalhos iniciais baseavam-se na transformação de plantas com genes codificadores de inibidores protéicos potentes e específicos contra as proteínases de fitonematóides (Urwin *et al.*, 1997b; Urwin *et al.*, 1998; Atkinson *et al.*, 2001). Entretanto, a utilização da pró-região das proteínases cognatas como inibidor (Silva *et al.*, 2004) pode trazer várias vantagens devido a maior especificidade e capacidade inibitória, além da pró-região ser muito menor, o que pode minimizar problemas de clonagem de múltiplos fatores em um único transcrito, de expressão heteróloga em bactéria e de modificação pós-traducional na planta transgênica.

I.x. Proteínases.

Proteínases são importantes alvos para intervenção do parasitismo devido seu papel fundamental em vários processos metabólicos e na interação parasita-hospedeiro (Beynon e Bond, 1994). As proteases são classificadas principalmente conforme os mecanismos de hidrólise da ligação peptídica, os resíduos catalíticos, a especificidade de substratos e seqüência de aminoácidos, existindo vários níveis hierárquicos. O maior deles as divide em Aspártico Proteínase (AP), Serino Proteínase (SP), Cisteíno Proteínase (CP) e Metal-Protease (MP). Proteases dessas quatro principais classes já foram descritas em helmintos parasitas (Sakanari, 1990) e várias funções têm sido sugeridas para essas enzimas no mecanismo de parasitismo, incluindo invasão de tecidos, evasão do sistema imune, além da digestão de proteínas do hospedeiro pelo parasita (Coombs e Mottram, 1997). As estratégias anti-nutricionais, nas interações hospedeiro-parasita naturais, envolvem a produção de inibidores enzimáticos, como é visto em plantas que são resistentes ou tolerantes à insetos e patógenos (Carlini e Grossi-De-Sa, 2002). Por exemplo, o acúmulo de inibidores de serino proteínase detectado em órgãos subterrâneos de solanáceas pode contribuir para a defesa da planta contra NFG (Trudgill e Blok, 2001).

Atividade proteolítica de SP e CP predominam em intestinos de nematóides parasitas de plantas (Lilley *et al.*, 1996) enquanto aspártico, cisteíno e metalo-proteases predominam em intestinos de nematóides parasitas de animais (Chappell e Dresden,

1986; Longbottom *et al.*, 1997; Redmond *et al.*, 1997). Todos os três gêneros de fitonematóides sedentários (NFC e NFG) apresentam marcante atividade proteolítica. Um homogenato protéico de fêmeas do nematóide da batata *G. pallida* (“potato cyst nematode”, PCN) contém atividade proteolítica majoritariamente de SP e secundariamente de CP (Koritsas e Atkinson, 1994). As diferentes espécies de NFG variam com relação a composição e afinidade de proteinases, como demonstrado por ensaios proteolíticos usando extratos brutos de *M. hapla*, *M. javanica* e *M. incognita* (Michaud *et al.*, 1996). Estudo com o nematóide da soja *H. glycines* (“soybean cyst nematode”, SCN) resultaram em isolamento de genes codificadores de três SPs, *hgsp-I*, *hgsp-II* e *hgsp-III* (Lilley *et al.*, 1997) e de duas CPs, *hgcp-I* e *hgcp-II* (Urwin *et al.*, 1997a).

A indução de resistência a nematóides em plantas hospedeiras devido à expressão de inibidores de proteinases tem sido descrita (Urwin *et al.*, 1997b; Urwin *et al.*, 1998). Assim, *Arabidopsis thaliana* transgênica expressando um mutante de inibidor de CP isolado do arroz (Oc-IAD86) apresentou resistência à *H. schachtii* e *M. incognita* (Urwin *et al.*, 1997b). Os principais efeitos observados incluem redução no tamanho das fêmeas e na fecundidade, como resultado da desnutrição. Ampliada resistência foi obtida usando uma construção gênica dupla, contendo um inibidor de SP, o CpTI (“cowpea tripsina inhibitor” isolado de *Vigna unguiculata*), e Oc-IAD86 (Urwin *et al.*, 1998).

Apesar de inúmeros estudos apontarem a enorme importância de APs nas interações parasitárias entre nematóides e seus hospedeiros animais (Chappell e Dresden, 1986; Harrop *et al.*, 1996; Jolodar e Miller, 1997; Longbottom *et al.*, 1997; Jolodar e Miller, 1998; Brown *et al.*, 1999; Williamson *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003; Williamson *et al.*, 2003a; Williamson *et al.*, 2003b; Williamson *et al.*, 2003c; Jolodar *et al.*, 2004; Morales *et al.*, 2004; Williamson *et al.*, 2004; Asojo *et al.*, 2005a; Asojo *et al.*, 2005b; Goud *et al.*, 2005), em nematóides parasitas de plantas, apenas um cDNA codificador de AP foi isolado e sua expressão localizada em intestino (Gao *et al.*, 2001).

Aspártico protease (AP) são enzimas hidrolíticas que catalizam a quebra de ligações peptídicas pelo mecanismo de ácido-base (Pranav Kumar e Kulkarni, 2002), particularmente entre resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Domingos *et al.*, 2000), e demonstram várias funções envolvendo degradação protéica em baixo pH de meios ácidos (Carginale *et al.*, 2004). Ubíquas, elas constituem uma superfamília de proteínas amplamente distribuídas (Coombs *et al.*, 2001), que compartilham um alto percentual de

identidade em suas seqüências de aminoácidos (Wittlin *et al.*, 1999), especialmente, quando comparadas com outras classes de proteases.

Nematóides, trematóides, apicomplexans, fungos e aracnídeos parasitas de animais possuem APs com papéis principais na interação entre eles e seus animais hospedeiros, normalmente sendo associadas a digestão da pele, tecido e hemoglobina do hospedeiro (Jean *et al.*, 2001; Williamson *et al.*, 2003b; Morales *et al.*, 2004; Kalkanci *et al.*, 2005).

I.xi. Interferência mediada por RNA.

O silenciamento pós-transcricional de genes específicos por intermédio de moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) é chamado de interferência mediada por RNA, ou simplesmente RNAi (Sharp, 1999; Boshier e Labouesse, 2000; Hunter, 2000; Kuwabara e Coulson, 2000). Extremamente ubíquo no domínio Eukaria, foi primeiramente associado a um sistema de defesa contra vírus e, mais recentemente, a um mecanismo de regulação da expressão de genes (Ruvkun, 2003).

O mecanismo de RNAi inclui um complexo enzimático que reconhece o dsRNA e o digere, resultando em fragmentos menores (siRNA), libera a fita senso e, finalmente, localiza e destrói mRNA específicos. O efeito de RNAi pode variar de silenciamento total (“knockout”) ou parcial (“knockdown”) conforme o caso. Em nematóides, o silenciamento é normalmente sistêmico e duradouro.

Suspeitas iniciais desse mecanismo molecular ainda obscuro surgiram do então misterioso controle de vírus por transformação de plantas com genes virais. Após, grande parte desse mecanismo ser desvendado (Tabara *et al.*, 1998; Boshier *et al.*, 1999; Hunter, 1999) e largamente utilizado em nematóide modelo *C. elegans* (Bargmann, 2001; Barstead, 2001; Alder *et al.*, 2003). Essa estratégia tem sido utilizada também para identificação de função de genes em nematóides parasitas de animais (Aboobaker e Blaxter, 2003; Lustigman *et al.*, 2004; Mitreva *et al.*, 2004; Behm *et al.*, 2005).

A primeira aplicação de RNAi em fitonematóides (Urwin *et al.*, 2002) foi eficaz no silenciamento gênico de proteinases. A diferença marcante é o tratamento com neurotransmissores para obrigar a deglutição, já que normalmente larvas L2 não se alimentam fora do hospedeiro. Para NFC usa-se octopamina (Urwin *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005) e para NFG o resorcinol tem mostrado melhores resultados (Bakhietia *et al.*,

2005a; Bakhetia *et al.*, 2005b; Huang *et al.*, 2006). Já foi demonstrado que mesmo ovos podem absorver dsRNA para silenciamento gênico eficiente (Fanelli *et al.*, 2005).

Uma série de experimentos de RNAi, *in vitro* e *in planta*, tem mostrado um enorme potencial para o estudo dos fenótipos individuais de genes de parasitismo e para o controle de fitonematóides (Bakhetia *et al.*, 2005b). A transformação de plantas para produção de dsRNA, específico para genes de parasitismo ou genes letais em nematóides, não implica em novas proteínas, evitando assim uma enorme série de preocupações com relação à contaminação do meio ambiente ou resposta alérgica do consumidor. Até o momento essa estratégia parece ser a mais promissora.

II – JUSTIFICATIVA

O nematóide *Meloidogyne incognita* é considerado isoladamente o pior fitopatógeno da agricultura mundial. Sua ampla distribuição geográfica, alta taxa reprodutiva, grande adaptabilidade e vasta gama de hospedeiros são as características marcantes desse fitonematóide sedentário. Como ainda não existe nenhuma forma de controle de baixo custo e alta eficiência, muitos esforços têm sido dedicados ao estudo detalhado do patógeno, isolamento de agentes de controle biológico, descoberta de plantas resistentes para estudo dos fatores de resistência, estudo da interação planta-nematóide em nível celular e molecular, citogenética, transcriptômica e proteômica.

As proteinases de nematóides têm sido estudadas como alvos potenciais para intervenção de processos de invasão do hospedeiro, migração nos tecidos, evasão dos mecanismos de defesa e digestão dos constituintes celulares, entre outros. Entretanto, outros alvos moleculares têm sido descritos mais recentemente, diversificando as estratégias de controle possíveis.

O enfoque da pesquisa nos nematóides visa melhor compreender as demandas e fragilidades do patógeno na interação molecular com a planta hospedeira. A caracterização de cDNAs codificadores de proteinases e seleção de moléculas-alvo para intervenção do parasitismo, aplicando a genômica funcional de larva 2 de *M. incognita* (biblioteca de ESTs) na obtenção de grande número de seqüências de cDNAs, análise de seqüências (agrupamento e comparação com banco de dados) e ontologia gênica (classificação funcional dos genes). Novos genes de parasitismo podem lançar luz no mecanismo de parasitismo, favorecendo novas idéias e estratégias de rompimento do parasitismo, usando a transformação de plantas com genes codificadores de inibidores. Da mesma forma, a determinação de genes letais, específicos de nematóides, representa uma etapa fundamental para a obtenção futura de plantas transgênicas inibidoras de funções vitais por interferência mediada por RNA.

III – OBJETIVOS

III.i. Objetivo geral.

O objetivo principal deste trabalho é a identificação e caracterização molecular de genes de *Meloidogyne incognita* codificadores de proteínas importantes no estabelecimento e manutenção do parasitismo, assim como proteínas relacionadas com processos vitais, digestivos e reprodutivos do parasita, situando-se numa etapa intermediária para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a fitonematóides.

III.ii. Objetivos específicos.

- Construir uma biblioteca de ESTs a partir de larva infectiva L2 de *Meloidogyne incognita*, seqüenciar e anotar as ESTs, determinar a ontologia gênica, selecionar genes de parasitismo e genes-alvo, candidatos à intervenção do parasitismo a fim de induzir resistência em plantas hospedeiras.
- Analisar quantitativa e qualitativamente as ESTs codificadoras de serino, aspártico e cisteíno proteinases, em diferentes etapas do desenvolvimento de *Meloidogyne spp.*, que estão disponíveis em bancos de dados públicos.
- Determinar o padrão de expressão temporal e espacial de *Mi-asp1* por “northern blot”, RT-PCR semi-quantitativo e hibridização *in situ*.

CAPÍTULO 1 – Caracterização de cDNAs codificadores de proteinases de *Meloidogyne* spp.

1.1. Resumo do primeiro capítulo.

Este capítulo descreve as análises *in silico* de seqüências expressas (EST) armazenadas em bancos de dados públicos (dbEST), oriundas de nematóides formadores de galhas (NFG), em diferentes estádios de desenvolvimento, que codificam aspártico proteinases (APs), serino proteinases (SPs) e cisteíno proteinases (CPs).

Objetivando construir uma visão global do papel e importância das principais proteinases descritas para nematóides parasitas de plantas, procederam-se buscas por palavras-chaves, além da comparação de seqüência de dois cDNAs isolados e previamente caracterizados, descritos na dissertação de mestrado (Fragoso, 2003) e um terceiro cDNA, isolado pelo Dr. João A. N. Batista, variante de *hgcp-I* (Urwin *et al.*, 1997a). Essas caracterizações complementares foram então acrescentadas para compor os manuscritos relativos aos cDNAs *Mi-aspl* (em fase de submissão), *Mi-ser1* (Fragoso *et al.*, 2005) e *hgcp-Iv* (Silva *et al.*, 2004).

As comparações das ESTs dos bancos de dados sugerem a existência de uma família gênica codificadora de APs, cuja expressão é provavelmente sincronizada com as etapas de desenvolvimento. Pelo menos dois grupos de APs específicas de nematóides são claramente distinguíveis em NFG: catepsina D-tipo e pepsinogênio-tipo. A proteína predita *Mi-aspl* pertence indubitavelmente ao primeiro, com identidade alta (60-66%) aos seus integrantes (**Anexo V.i**).

Aparentemente não existe grande número de genes de SPs e sua expressão, principalmente em intestinos, na fase adulta, está fortemente relacionada com o processo digestório de NFG e NFC. De maneira geral, as comparações com os bancos de dados resultaram em alinhamentos com identidades relativamente baixas de 23 a 27%, incluindo SPs de insetos, mamíferos e outros nematóides. A classificação final de *Mi-ser1* é de quimotripsina-tipo SP, apesar de ESTs confirmarem também a existência de tripsina SP (**Anexo V.ii**).

A pró-região de uma CP isolada de *H. glycines*, PROHGCP, uma catepsina L, inibiu *in vitro* a atividade proteolítica da HGCP-Iv cognata, ambas produzidas em *E. coli*, assim como inibiu extrato protéico bruto de fêmeas adultas de *M. incognita* (Silva *et al.*, 2004). Isso se baseia no mecanismo de controle da proteólise, onde a pró-região

do zimógeno se dobra sobre a região de acesso do substrato ao sítio ativo. A ativação proteolítica se dá quando a ligação peptídica entre a pró-região e a proteinase madura é clivada ou, pelo menos, a pró-região é afastada do sítio ativo, liberando a passagem do substrato à proteinase madura. Normalmente, a ativação é realizada por outras proteinases e/ou pela própria, muitas vezes em resposta a alterações de pH. A principal questão foi explicar como a pró-região de uma catepsina L de *H. glycines* tinha alto poder inibitório de extratos protéicos de *M. incognita*, quando não havia nenhum cDNA codificador de CP isolado de NFG, mas apenas dois isolados de NFC. Atualmente tal cDNA já foi isolado e publicado (Neveu *et al.*, 2003).

Este capítulo também descreve a caracterização complementar de *Mi-asp1*, um cDNA codificador de aspártico proteinase (AP) isolado de larvas L2 do nematóide formador de galhas (NFG) *Meloidogyne incognita*. O isolamento e a caracterização prévia desse cDNA estão detalhadamente descritos em dissertação de mestrado (Fragoso, 2003) e no manuscrito de artigo científico em fase de submissão (**Anexo V.i**). Objetivando prever uma função à *Mi-asp1*, algumas abordagens foram adotadas para responder à diferentes perguntas específicas. Uma questão específica considerada foi a determinação do padrão de expressão espacial e temporal de *Mi-asp1*. A segunda foi o estudo aprofundado de AP de nematóides para correlação com *Mi-asp1*.

A determinação da expressão temporal de *Mi-asp1* foi inicialmente tentada por “northern blot” e, posteriormente, por RT-PCR. O primeiro não discriminou *Mi-asp1* de outras APs e apresentou sinais de hibridização pouco evidentes. Contornando esses obstáculos, as amplificações por RT-PCR demonstraram uma predominância de mRNA de *Mi-asp1* em ovos, em relação a larvas L2 e fêmeas adultas. A determinação da expressão espacial foi iniciada com ensaios de hibridização *in situ*, demonstrando sinais em ovos. Esse não é o resultado definitivo, mas até o momento corrobora as demais análises.

Os ortólogos de *Mi-asp1* têm forte correlação com a penetração da pele, migração no tecido, evasão do complemento imunológico e digestão de hemoglobina do hospedeiro em nematóides parasitas de animais. Por outro lado, o ortólogo de *Mi-asp1* do nematóide de vida-livre *C. elegans* está bem descrito como o principal executor de morte celular por necrose em processos neurodegenerativos. Provavelmente *Mi-asp1* atua além da digestão celular ou luminal, mas também na formação do sistema nervoso durante a embriogênese ou na metamorfose durante a ecdise larval.

1.2. Metodologia.

1.2.1. Varredura em banco de dados e análise de ESTs codificadoras de proteinases oriundas de nematóides.

As seqüências nucleotídicas de *Mi-ser1*, *Mi-aspl* e *hgcp-Iv* foram submetidas para alinhamentos por BLASTn com genoma de *Caenorhabditis elegans* armazenado no WormBase (<http://www.wormbase.org>) e com dbEST de nematóides parasitas do “Parasitic Nematode Sequencing Project” (www.nematode.net). Também foi realizada uma varredura no GenBankTM com a ferramenta de busca do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e uma combinação de palavras-chaves para discriminação dos nematóides, estádios de desenvolvimento e anotação gênica.

1.2.2. Agrupamento de ESTs contíguas.

As ESTs selecionadas foram alinhadas pelo CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) para formação de grupos, os grupos. Seqüências contíguas permitiram a aglutinação de grupos de ESTs codificadoras de um mesmo cDNA, correspondendo a seqüências consensos construídas *in silico*, eliminando redundâncias e erros de seqüenciamento. Essas seqüências consensos foram submetidas ao BLASTx para determinação das regiões das proteinases que estavam codificando. A partir desse resultado, os grupos eram então etiquetados.

1.2.3. Cultura de nematóides *M. incognita*.

A cultura de parasitas obrigatórios requer, quase sempre, um hospedeiro propício, sendo normalmente um processo difícil e limitante. Considerando os gêneros *Heterodera*, *Globodera* ou *Meloidogyne*, a multiplicação de nematóides se dá apenas em planta hospedeira infectada. A espécie em questão, *M. incognita*, devido a seu hábito polífago, que é a adaptação generalista em relação à gama de possíveis hospedeiros, está predisposta a proliferar em inúmeras espécies de plantas. Em contrapartida, outras espécies de nematóides apresentam adaptação oposta, ou seja, são especialistas em relação aos possíveis hospedeiros. Tendo em vista o leque de opções, um grande rendimento de *M. incognita* é obtido pela infecção de *Lycopersicon esculentum* L. (tomateiro), da variedade susceptível Santa Cruz e cultivar Kada Gigante. Então, objetivando a manutenção e multiplicação desse nematóide, as sementes de tomateiro são germinadas em bandeja coletiva com substrato esterilizado em autoclave

e, após duas semanas, transplantadas, duas a duas, para sacos plásticos de 20 L. Quando atingem de 30 a 40 centímetros de altura, os tomateiros são infectados com ovos, solos ou raízes contaminados, obtidos de culturas anteriores. Os inóculos iniciais de *M. incognita* Raça 1 e *M. javanica*, com identificação assegurada por análise de isoenzimas de fêmeas por eletroforese, foram gentilmente cedidos pela especialista Dra. Regina Carneiro (EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia). Durante o intervalo de 2-6 meses após a infecção, a raiz dos tomateiros apresenta grande quantidade de galhas, período ideal para a coleta. Como as raízes de tomateiros comportam grande quantidade de nematóides, é necessário um programa regular de irrigação e adubação para não comprometer o hospedeiro e inviabilizar a produção. Os nematóides podem ser coletados em larga escala nos estádios de ovos, larvas L2 ou fêmeas adultas. Numa escala menor, os nematóides podem ser coletados manualmente, visualizados em lupa e manipulados com pincel, em outros estádios de desenvolvimento como larvas L3, larvas L4 e macho adulto. Além disso, manualmente, é possível discriminar melhor diferentes etapas do desenvolvimento, como o ovo da larva L1, não eclodida, que é co-purificada com os ovos, e as larvas L3 e L4 que são co-purificados com fêmeas parasitas adultas.

1.2.4. Extração de ovos de *M. incognita*.

A preparação de ovos inicia-se com o corte do tomateiro na base do caule e desestruturação mecânica do solo com impactos firmes da mão contra o saco plástico. Os golpes são dados no saco de 20 L, após ter sido posto em outro saco plástico maior, 100 L, e mais resistente. De fato, o ideal é não regar por 2-3 dias os vasos cujas raízes serão extraídas para que o solo fique menos friável e que raízes mais finas não sejam rompidas e desperdiçadas. O solo contaminado fica então depositado dentro de sacos plásticos grandes que podem seguir dois destinos: ou são utilizados para infectar uma nova geração de tomateiros, sendo misturado ao solo estéril com mudas de 30-40 centímetros; ou, então, são esterilizadas em autoclave para descarte. Após, efetua-se a limpeza do sistema radicular em água corrente para a retirada dos agregados de solo. Em seguida, as raízes são trituradas no liquidificador com solução 0,5% (v/v) de hipoclorito de sódio (água sanitária comercial) e o material resultante é separado por conjunto de peneiras de 100 e 400 mesh. A solução de hipoclorito de sódio dissolve a massa protéica que mantém os ovos aglomerados, facilitando sua coleta. Por outro lado, um contato por tempo prolongado pode diminuir a taxa de eclosão, dessa forma essa etapa é feita rapidamente. A fração coletada na peneira de 400 mesh é misturada com

caulim (substrato inerte de gesso) e centrifugada a 2500 x g por 10 minutos. O sobrenadante é descartado, já o precipitado é ressuspenso em sacarose 50% (m/v). Após nova centrifugação a 2500 x g por 1 minuto, os ovos são coletados do sobrenadante em peneira de 400 mesh. O rendimento da preparação de ovos varia de $8-40 \times 10^3$ ovos por grama de raiz.

1.2.5. Extração de larvas infectivas L2 de *M. incognita*.

A produção de larvas infectivas de segundo estágio L2 de nematóides parasitas de plantas se baseia no sistema de eclosão in vitro dos ovos coletados conforme descrito anteriormente. Como as larvas L2, assim coletadas, de fato não entram em contato com planta hospedeira aplica-se o termo larvas L2 pré-parasitas. Por outro lado, numa escala menor, é possível obter larvas L2 após a infecção da planta hospedeira, utilizando lupa, bisturi e pincel para retirar as larvas individualmente do sistema radicular, que são então denominadas de larvas L2 parasitas. Existem vários sistemas de eclosão, mas que têm em comum a imersão dos ovos em água destilada e esterilizada para futura coleta das larvas L2, que eclodem e sedimentam na região mais profunda dos recipientes. O sistema adotado faz uso de pequenas vasilhas e peneiras, ambas de plástico (uso doméstico) e de mesmo diâmetro. O volume de água é então ajustado para gerar uma lâmina d'água na peneira, de forma que o conteúdo da peneira fique submerso. Sobre a peneira ainda é posicionado um papel toalha em dupla camada, que funciona como uma peneira, separando os ovos das larvas eclodidas. Assim, os ovos coletados (descrito anteriormente) são depositados nesse papel toalha, sobre uma peneira plástica, ficando em total imersão. Espontaneamente, os ovos se desenvolvem em larvas L1, que continuam retidas na cutícula do ovo. Após, essas larvas L1 se desenvolvem em larvas L2 que eclodem, migram do papel toalha para a vasilha e sedimentam para o fundo do recipiente. Uma alíquota é retirada para cálculo da taxa de eclosão. As larvas L2 são então coletadas por centrifugação do conteúdo das vasilhas a 2500 x g por 30 minutos em tubo Falcon de 50 mL. Após a retirada cuidadosa do sobrenadante, as larvas L2 são ressuspenso em volume menor e transferidas para tubo de microcentrífuga de 1,5 mL (Eppendorf) e novamente precipitadas a 7000 x g por 3 minutos. Toda água é retirada e as larvas L2 são imediatamente congeladas em nitrogênio líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. A taxa de eclosão dos ovos observada varia entre 7-25%.

1.2.6. Extração de fêmeas adultas parasitas de *M. incognita*.

A extração de fêmeas se inicia com a separação cuidadosa de solo do sistema radicular, utilizando água corrente. Após 16 horas de incubação em solução de pectinase 25% (v/v), isolada de *Aspergillus niger*, as raízes tornam-se gelatinosas devido à digestão da pectina, facilitando assim a extração das fêmeas. As fêmeas são separadas com peneira de 100 mesh, onde ficam retidas. Normalmente as larvas L3 e L4 são liberadas do tecido radicular digerido, mas atravessam a peneira de 100 mesh. Em seguida, são sedimentadas por centrifugação a 2500 x g por 10 minutos em suspensão de caulim (substrato inerte). Após a ressuspensão do precipitado em sacarose 40% (p/v), segue-se nova centrifugação a 2500 x g por 1 minuto. As fêmeas, concentradas sobre a solução de sacarose, são retidas em peneira de mesma malha, lavadas com água destilada e transferidas para béquer. Uma separação visual, com micropipeta de 1 mL (P1000), assegura maior integridade e pureza das fêmeas coletadas. Usam-se duas ponteiros azuis, uma cortada para pipetar as fêmeas, sem danificá-las, para um tubo de microcentrífuga (eppendorf) e outra amassada na ponta para retirar a sujeira residual da coleta. Após, a amostra é sedimentada por centrifugação a 2000 x g por 1 minuto para completa retirada de água e armazenada a – 80 °C. Em média, obteve-se 8 mg de fêmeas por grama de raiz.

1.2.7. Extração de RNA total.

O RNA total de ovos, larvas L2 ou fêmeas adultas de *M. incognita* foi extraído utilizando o kit RNeasy (Qiagen) e seguindo as instruções do fornecedor. A purificação baseia-se na adsorção diferencial do RNA a uma resina de sílica gel, sob alta concentração salina, enquanto DNA e proteínas são eliminados por múltiplas lavagens. Resumidamente, os juvenis ou fêmeas são lisados e homogeneizados em tampão desnaturante, com isotiocianato de guanidina, a fim de inibir a atividade ribonucleásica endógena, e o lisado aplicado numa microcoluna com a resina de sílica gel. A coluna é então lavada três vezes e o RNA eluído com água e armazenado a – 80 °C.

1.2.8. Extração de DNA genômico.

Aproximadamente 500.000 ovos de *M. incognita* foram triturados em nitrogênio líquido (– 196 °C) com pistilo e almofariz. O pó resultante foi transferido para microtubo contendo 1 ml de tampão de lise (100 mM Tris–HCl pH 8; 50 mM EDTA;

20 µg/mL RNase A; 0,5% SDS), homogeneizado suavemente e incubado a 37°C por 45 minutos. Foi adicionada proteinase K para concentração final de 100 µg/mL e incubado a 50°C por 1,5 hora com agitações periódicas. Foram feitas três extrações com solvente orgânico (700 µL de clorofil por tubo). Após adição de acetato de amônio (2 M final), o DNA genômico foi precipitado com 2,5 V de etanol absoluto (800 µL por tubo). O precipitado foi lavado em 70% de etanol e o DNA foi ressuspense em 150 µL de 20 mM Tris-HCl (pH 8). Esse protocolo é uma modificação da metodologia padrão (Sambrook *et al.*, 1989). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro, indicando um rendimento de aproximadamente 90 µg de DNA. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

1.2.9. Hibridização de *Mi-asp1* com RNA total por “northern blot”.

As amostras de RNA total (22 µg) de ovos, larvas L2 e fêmeas adultas de *M. incognita* foram separadas por eletroforese em gel desnaturante (Sambrook *et al.*, 1989). O RNA foi transferido para membrana de nylon Hybond N⁺ (Amersham) em condições salinas. A sonda, feita a partir do cDNA completo de *Mi-asp1*, foi preparada utilizando o kit Megaprime (Amersham), sendo marcada com α -[³²P]dCTP. A hibridização foi conduzida a 65°C, por 16 horas, e a membrana foi lavada com solução de 1X SSC/0.2% SDS.

1.2.10. Amplificação de *Mi-asp1* por RT-PCR semi-quantitativo.

A partir das amostras de ovos, larvas e fêmeas coletadas como descrito acima, o RNA total foi extraído em pequena escala usando o kit de extração RNeasy (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. Cada cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total usando o iniciador oligo dT e a transcriptase reversa MMLV de forma padronizada. O RT-PCR foi realizado usando oligonucleotídeos específicos para *β -actina* ou *Mi-asp1* e como molde uma diluição 1:20 do cDNA de diferentes fases de desenvolvimento. Como controle de eventuais contaminações com DNA genômico, as mesmas reações foram feitas com gDNA como molde. As condições da PCR foram uma etapa de desnaturação de 92 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 92 °C por 45 s, 45 °C por 45 s e 72 °C por 1,5 min. Cinco pontos de amplificação (27, 29, 31, 33 e 35) foram tomados para determinação da curva sigmóide. As densidades ópticas foram determinadas usando o programa Zero-Dscan (Scanalytics) a partir das imagens

digitalizadas pelo transluminador Eagle Eye II (Stratagene) dos géis corados com brometo de etídio.

1.2.11. Localização do mRNA de *Mi-asp1* por hidridização *in situ*.

Amostras de ovos, L2 e fêmeas adultas foram submetidas a tratamentos idênticos, conforme protocolo de hibridização *in situ* (Vanholme *et al.*, 2002). As amostras foram fixadas por incubação em 200 µL de Paraformaldeído 2%, a 4 °C, por 16 h. Após centrifugação por 5 min a 12.000 g, o sobrenadante foi descartado e as amostras precipitadas foram ressuspensas e lavadas em tampão M9. Várias lâminas de vidro para microscopia, revestidas de fita adesiva dupla face e papel alumínio, foram preparadas para facilitar o seccionamento dos nematóides. As amostras foram então depositadas nas lâminas formando uma fina camada. Após o congelamento a – 80 °C, por 16 h, em recipiente com sílica gel, os nematóides depositados nas lâminas foram seccionados manualmente com bisturi, em cortes paralelos distando em torno de 100 µm. Os cortes paralelos foram então repetidos em todas as direções, garantindo que a maioria dos nematóides estivesse cortada em fragmentos de 50-100 µm. Os fragmentos foram recuperados das lâminas com tampão M9 em tubo de microcentrífuga. O tampão foi removido por centrifugação e as amostras foram incubadas em 200 µL de Proteinase K 5 mg/mL por uma hora em agitador na temperatura ambiente. A Proteinase K foi removida por centrifugação e os pedaços de nematóides foram congelados por um minuto em nitrogênio líquido, incubados por um minuto em metanol 100% a – 20 °C e incubados finalmente em acetona 100% por um minuto a – 20 °C.

As sondas de RNA (Ribo Probe) foram preparadas a partir do cDNA de *Mi-asp1* clonado no vetor plasmidial pGEMT-easy. Após separar o DNA em duas alíquotas, cada uma foi linearizada com uma enzima de restrição, *Sal I* ou *Nco I*, para transcrição *in vitro* com RNA polimerases de bacteriófagos, T7 ou SP6 respectivamente, gerar uma sonda de RNA antisense (para hidridizar com o mRNA de *Mi-asp1*) e sense (controle). No kit de marcação a nucleotídeo uridina é ligado a digoxigenina, um epitopo para um anticorpo ligado a enzima fosfatase alcalina.

As condições de hibridização são relativamente semelhantes às de um “northern blot”. Após a hibridização e lavagens, as amostras foram incubadas com o substrato incolor da fosfatase alcalina, resultando em um produto colorido (azul escuro), então analisado por microscopia óptica.

1.3. Resultados.

1.3.1. Análise *in silico* de ESTs codificadoras de AP de NFG *Meloidogyne* spp.

O “Parasitic Nematode Project” (<http://www.nematode.net/>) tem gerado números crescentes de ESTs, próximo de 200.000 (Parkinson *et al.*, 2001) a 400.000 (Parkinson *et al.*, 2003), em apenas dois anos, e atualmente totalizam mais de 600.000 ESTs. Onde, 125.412 ESTs são de NFG e NFC, e por volta de 20.000 ESTs são de *M. incognita*. De fato, a mineração de dados de transcriptoma é uma ferramenta poderosa para estudar vários aspectos biológicos dos nematóides (Parkinson *et al.*, 2004a). Desejando gerar uma visão global da diversificação e padrão de expressão de APs, foram realizadas buscas por ESTs de NFG nos bancos de dados que resultaram em 26 ESTs codificadoras de APs (**Tabela 1.1**). A título de normalização das análises, foram realizadas buscas por ESTs codificadoras de *tubulina* (**Figura 1.1**). De fato, a premissa de que o gene *tubulina* tem expressão constitutiva foi confirmada, apresentando uma média de uma EST para *tubulina* por mil ESTs totais, quando comparando diferentes estádios de desenvolvimento que já possuem grande número de ESTs. Cinco ESTs codificadoras de APs foram encontradas em ovos de NFG, duas de *M. paranaensis* e uma de cada *M. chitwoodi*, *M. javanica* e *M. arenaria*. Vinte ESTs foram identificadas em larvas L2 de NFG, quatro de *M. incognita*, sete de *M. hapla* e nove de *M. arenaria*. Apenas uma EST foi detectada em fêmeas de NFG, especificamente de *M. hapla*.

Tabela 1.1

ESTs de NFG codificadoras de APs encontradas por ferramenta de busca no NCBI mais BLASTn do banco de dados do site [nematode.net](http://www.nematode.net/), relativo ao “Parasitic Nematode Project”. (referente a agosto de 2006)

	Estádios de desenvolvimento de <i>Meloidogyne</i> spp.						Todos
	Ovo	L2	L2/L3	L3/L4	Fêmea	Não especificado	
Total	35.153	24.150	788	1.946	10.849	134	73.020
Tubulina	36 (0,10)	21 (0,09)	4 (0,51)	4 (0,21)	12 (0,11)	—	77 (0,11)
Aspártico	5	20	—	—	1	—	26
Proteinase	(0,01)	(0,08)	—	—	(0,01)	—	(0,04)

Os números em parêntesis representam a percentagem de cada resultado de busca em relação ao total de ESTs.

Todas essas ESTs foram alinhadas pelo CLUSTAL_W a fim de definir grupos com seqüências idênticas ou contíguas, resultando em 10 grupos de ESTs (**Tabela 1.2**), correspondendo a diferentes genes de APs e/ou diferentes regiões não sobrepostas de um mesmo gene. Para cada grupo, foi gerada uma seqüência consenso usando ESTs

Quadro geral das ESTs de proteinases

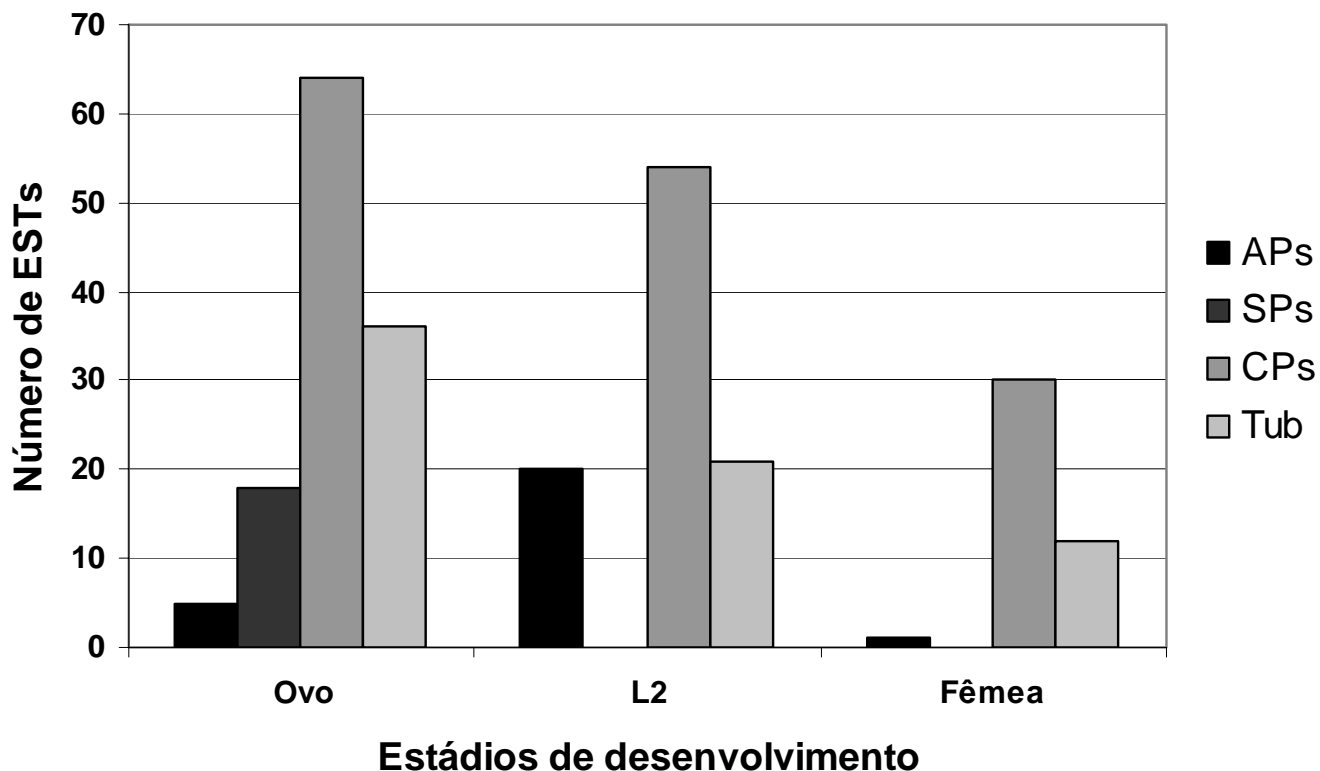


Figura 1.1 – Gráfico da distribuição de ESTs codificadoras de proteinases de NFG. A partir da busca em banco de dados públicos por palavras-chave, várias classes de proteinases foram identificadas em diferentes estádios de desenvolvimento. Para normalizar as buscas, também foi incluído nas análises as ESTs codificadoras de Alfa e Beta Tubulina. A frequência de APs é fortemente correlacionada a fase larval L2. SPs são encontradas apenas em ovos. CPs são as mais abundantes, presentes em todos estádios e proporcionais à Tubulina.

Tabela 1.2

Análise dos grupos de ESTs codificadoras de APs de NFG armazenadas no GenBank™.

Grupo de ESTs ^a	Espécie de Nematóide	Fase	Acesso no GenBank	Resultado do BLASTx ^b
A11 [ASP-1 or ASP-5]	<i>M. arenaria</i>	L2	CF357960	AAD09345
	<i>M. arenaria</i>	L2	CF357948	<i>Strongyloides</i>
	<i>M. arenaria</i>	L2	CF357852	<i>stercoralis</i>
	<i>M. arenaria</i>	L2	CF357235	(3e-05) 26%
	<i>M. arenaria</i>	L2	CF357186	
A12 [ASP-5, 1 or 6]	<i>M. arenaria</i>	L2	CF358275	AAD09345
	<i>M. arenaria</i>	L2	CF357624	<i>S. stercoralis</i>
	<i>M. arenaria</i>	L2	CF357084	(5e-09) 29%
A2 [ASP-1]	<i>M. hapla</i>	L2	CA997489	AAB65878
	<i>M. hapla</i>	L2	BU094921	<i>C. elegans</i>
	<i>M. hapla</i>	L2	BU094650	(4e-07) 29%
	<i>M. hapla</i>	L2	BQ836667	
B [ASP-4]	<i>M. javanica</i>	ovo	BE578940	Mi-asp1
	<i>M. arenaria</i>	ovo	BI746532	(1e-119) 97%
	<i>M. arenaria</i>	L2	CF358292	
	<i>M. incognita</i>	L2	AW829206	
	<i>M. incognita</i>	L2	AW870930	
	<i>M. incognita</i>	L2	AW871162	
	<i>M. incognita</i>	L2	AW783012	
C [ASP-3]	<i>M. paranaensis</i>	ovo	CK242497	AAX33731
	<i>M. paranaensis</i>	ovo	CK242452	<i>Blomia tropicalis</i> (2e-89) 76%
D [ASP-1]	<i>M. hapla</i>	L2	CN572742	CAA08899 <i>C. elegans</i> (4e-08) 30%
E [ASP-2]	<i>M. hapla</i>	L2	BU094593	BAA19607 <i>Cucurbita pepo</i> (3e-07) 28%
F [ASP-4]	<i>M. hapla</i>	fêmea	CN576295	Mi-asp1 (6e-24) 61%
G [ASP-4]	<i>M. hapla</i>	L2	BQ836960	Mi-asp1 (4e-11) 80%
H [ASP-3]	<i>M. chitwoodi</i>	ovo	CB931365	CAE65791 <i>C. briggsae</i> (3e-26) 56%

^aEntre colchetes, prováveis ortólogos em *C. elegans*, mais relacionados com o grupo de EST, nomeados A-H. ^bEntre parêntesis, o e-value, seguido do percentual de identidade peptídica.

contíguas, que foi submetida às comparações pelo BLASTx contra o banco de dados, GenBankTM, do NCBI, e foi relacionada as seis APs de *C. elegans*, previamente caracterizadas (Tcherepanova *et al.*, 2000). Considerando essa família gênica de AP em *C. elegans*, *asp-4* é mais relacionado a *asp-3*, que são catepsina D-tipo APs. Por outro lado, *asp-1*, *asp-2*, *asp-5* e *asp-6* são agrupadas como pepsinogênio-tipo APs. Essas duas divisões são fortemente correlacionadas com a localização cromossomal e a teoria de evolução gênica. Os genes *asp-3* e *asp-4* estão localizados no cromossomo X, enquanto *asp-1*, *asp-2*, *asp-5* e *asp-6* estão no V (Tcherepanova *et al.*, 2000). De fato, *asp-5* e *asp-6*, que codificam APs altamente similares, estão muito próximos no cromossomo V, com apenas 4 Kb entre eles (Geier *et al.*, 1999). O que se encaixa perfeitamente com o modelo de evolução de famílias gênicas é o fato de existirem três prováveis pseudogenes (porque nunca foram detectados em dbEST), codificantes de domínios completos ou parciais de APs, exatamente nessa pequena região entre *asp-5* e *asp-6*, e que existe um quarto pseudogene ao lado de *asp-5* (Geier *et al.*, 1999).

Os grupos A11 e A12 codificam proteínas diferentes, porém muito relacionadas, correspondendo a *asp-5*, *asp-6* ou *asp-1*. As quatro ESTs do grupo A2 codificam uma região N-terminal similar a ASP-1, e secundariamente a ambas ASP-5 e ASP-6. O grupo D corresponde à região C-terminal do ortólogo de ASP-1, sem a região de sobreposição com o grupo A2 devido a uma distância predita de 111 pb entre esses grupos. O grupo E, apesar de alta identidade com APs de plantas, provavelmente codifica um ortólogo de ASP-2.

O grupo C, formado de duas ESTs idênticas, se encaixa muito bem com APs de artrópodes, além de Mi-asp1 (e-value de $7e-55$ e identidade de 66%). Entretanto, nesse caso a sequência do grupo C é inquestionável e não codifica Mi-asp1, mas um homólogo muito relacionado com 80% de similaridade sobre um alinhamento com 155 aminoácidos de extensão. O grupo H com apenas uma EST tem como primeiro resultado de BLASTx um ortólogo de ASP-3 em *C. briggsae* e segundo com o próprio ASP-3 (e-value de $7e-25$ e identidade de 53%). Os grupos C e H se parecem com a região N-terminal de ASP-3, apesar da baixa identidade nucleotídica e peptídica. A primeira hipótese a considerar é que eles codificam diferentes APs proximamente relacionadas com ASP-3. Entretanto, a sequência do grupo H apresenta um viés para adenosina e timidina, além de arraste. Curiosamente, o grupo H é mais similar a ASP-3 e o grupo C a AP de artrópode. O grupo B corresponde a ASP-4 in *C. elegans* (e-value de $1e-64$ e identidade de 65%) e codifica o N-terminal de *Mi-asp1*. O grupo G com

apenas uma EST, que codifica o C-terminal de Mi-asp1, e, por isso, não se sobrepõe com o grupo B. Essa EST não é idêntica a Mi-asp1 provavelmente devido a erros de seqüenciamento, desde que todas diferenças estão em uma única e curta região. O grupo F parece ser relacionado com Mi-asp1, apesar de uma relativamente baixa identidade (e-value de 6e-24 e identidade de 61%). Sua única EST apresenta uma região que alinha bem com Mi-asp1 e uma outra região com viés de adenosinas e repetição de nucleotídeos, sinais característicos de problemas de seqüenciamento.

Dessa forma, parece que todos os seis possíveis ortólogos de APs de *C. elegans* estão presentes em dbEST de NFG. Os representantes de catepsina D-tipo ASP-3 e ASP-4 demonstram alguma correlação com a fase de ovo. Todos os três ortólogos de ASP-3 e os dois de ASP-4 foram encontrados em ovos. Larvas L2 e fêmeas também expressaram ortólogos de ASP-4 (incluindo *Mi-asp1*). Por outro lado, os representantes de pepsinogênio-tipo ASP-1, 2, 5 e 6 são encontrados apenas em larvas L2. Trabalhos de pesquisa adicionais são necessários para provar essas observações, que poderiam ser respondidas melhor usando PCR em tempo real, devido seu alto poder discriminatório e sua alta sensibilidade.

1.3.2. Análise *in silico* de ESTs codificadoras de SP de NFG *Meloidogyne* spp.

O enorme banco de dados de ESTs (dbEST) foi utilizado para expandir a caracterização de *Mi-ser1* e gerar uma visão mais geral do papel de SPs em NFG. Apesar de alguns poucos cDNAs de proteinase de NFG e NFC terem sido isolados e caracterizados, a análise de genômica funcional está atualmente em curso e um grande número de ESTs de nematóides está disponível nos bancos de dados. Para obter pistas sobre o padrão de expressão de proteinases de nematóides, foi realizada uma varredura no dbEST de ESTs codificadoras de SPs isoladas de NFG em diferentes fases do desenvolvimento. Como um controle das buscas, foram também analisadas ESTs codificadoras de actina (**Tabela 1.3**).

Considerando os NFG, o número de ESTs disponíveis de ovos e L2 é muito maior que de fêmeas adultas, que representa apenas 15% do total. Três ESTs codificadoras de SPs foram identificadas em bibliotecas de cDNAs de ovos de *M. incognita*, seis de *M. hapla*, quatro de *M. arenaria* e cinco de *M. chitwoodi*, somando um total de 18 ESTs. Considerando o número total de ESTs de ovos de NFG, o valor médio foi de uma EST codificadora de SP por 2.027 ESTs. Nenhuma EST de SP foi

encontrada em bibliotecas de larvas L2 ou de fêmeas adultas. Entretanto, apenas um baixo número de ESTs de fêmeas está disponível para análises e comparações.

Tabela 1.3
Número de ESTs de SP encontradas por ferramenta de busca do NCBI (referente a agosto de 2004).

	<i>M. incognita</i>			<i>M. hapla</i>			<i>M. arenaria</i>		<i>Meloidogyne spp.</i>		
	Ovo	L2	Fême.	Ovo	L2	Fême.	Ovo	L2	Ovo	L2	Fême.
Total	7.314	7.556	4.428	9.783	9.668	5.001	3.366	1.652	36.486	24.932	10.849
Actina	24 (0,328)	62 (0,821)	4 (0,090)	56 (0,572)	757 (7,830)	7 (0,140)	9 (0,267)	4 (0,242)	114 (0,340)	852 (3,417)	11 (0,101)
Serina proteinase	3 (0,041)	-	-	6 (0,061)	-	-	4 (0,119)	-	18 (0,049)	-	-

Números em parêntesis representam a percentagem de cada resultado de busca relativo ao total de ESTs.

A análise das 18 ESTs que codificam SPs de NFG revelou pelo menos nove seqüências diferentes e três grupos gênicos (**Figura 1.2**). O maior grupo continha onze ESTs, incluindo cinco de *M. chitwoodi*, e duas de cada espécie seguinte, *M. incognita*, *M. hapla* e *M. arenaria*. A identidade entre as seqüências variou de 58 a 91%, com uma média de 74,5%. Quando comparado com outras SPs, o melhor alinhamento tinha 41% de identidade sobre uma cobertura de 115 resíduos de aminoácidos com HGSP-III de *H. glycines*. Outro grupo foi representado por duas ESTs, uma de *M. hapla* e outras de *M. arenaria*, com 85,6% de identidade na sua seqüência de aminoácidos. O resultado do BLASTx das ESTs de *M. arenaria* revelou 38% de identidade sobre uma sobreposição de 91 aminoácidos com HGSP-I de *H. glycines*.

Uma EST de ovos de *M. arenaria* (rm47d11.y1) codifica uma SP quimotripsina-tipo que mostrou 99% de identidade (e-value de 6,6e-96) com *Mi-ser1* sobre uma sobreposição de 148 aminoácidos. Essa EST de 447 nt é idêntica a *Mi-ser1*, exceto por um único nucleotídeo que resulta em substituição de uma alanina por uma treonina. Outro gene representado por uma única EST de *M. incognita* mostrou 32% de identidade (sobre uma sobreposição de 134 aa) com uma tripsina de *Drosophila melanogaster*. As três ESTs remanescentes de *M. hapla* mostraram alta identidade com HGSP-III, numa pequena região ao redor do resíduo catalítico de serina, mas baixa identidade nas demais regiões, repletas de códons de terminação nas três fases de leituras. Por isso, provavelmente, essas ESTs apresentam artefatos, ou ainda, correspondem a pseudogenes transcritos.

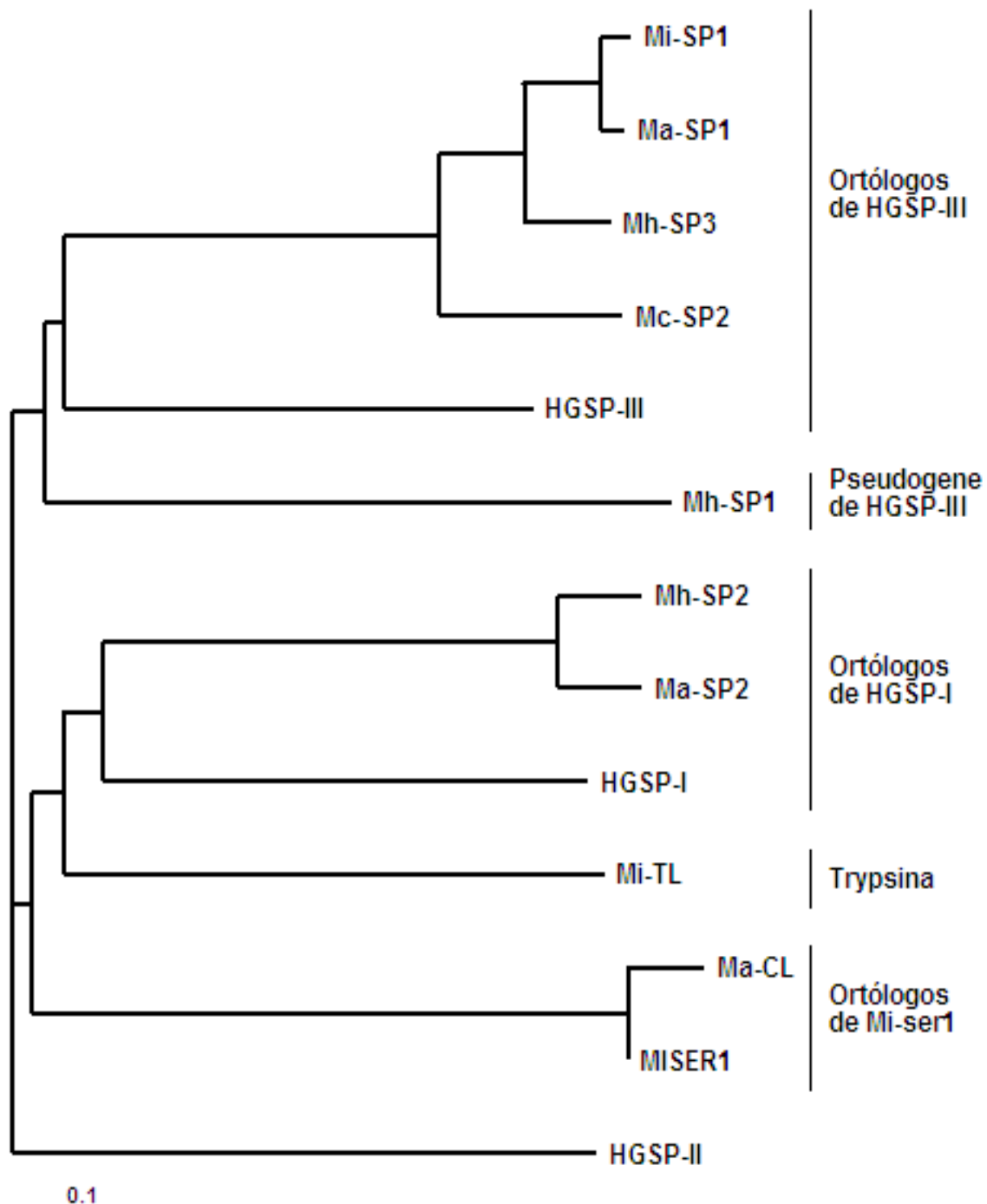


Figura 1.2 – Dendrograma das seqüências peptídicas preditas de ESTs codificadoras de SP, em NFG e NFC. O alinhamento múltiplo de seqüências foi feito pelo programa CLUSTAL_W e o dendrograma foi editado pelo programa TREEVIEW. A barra de escala representa 0,1 substituição de amino ácidos. Os cDNAs *hgsp-I* e *hgsp-III* de *Heterodera glycines* codificam uma SP tripsinas-tipo, enquanto *hgsp-II* codifica uma SP quimotripsina-tipo como *Mi-ser1*.

Em contraste com a alta identidade de seqüências peptídicas dentro dos grupos, a identidade entre diferentes grupos é baixa (média de identidade de 17%). A identidade entre ESTs de *M. incognita* Mi-SP1 e Mi-TL (**Figura 1.2**) foi de 16% e, quando comparado com *Mi-ser1*, mostrou uma média de identidade de apenas 10,5%.

1.3.3. Análise *in silico* de ESTs codificadoras de CP de NFG *Meloidogyne* spp.

A pró-região foi identificada por buscas em bancos de dados por seqüências homólogas e comparação com outros genes de CPs. O gene de CP de *M. incognita* é similar a HGCP-Iv, apresentando 65,5% de identidade peptídica. Dezesesseis ESTs codificadoras de CPs isoladas de *M. incognita* foram relacionadas a três genes diferentes (**Tabela 1.4**). O primeiro é representado por nove ESTs e tem uma média de identidade de 64% e sobreposição de 1.183 pb com *hgcp-Iv*, encontrados em L2 e fêmeas (**Tabela 1.5**). Os outros dois genes são menos similares a *hgcp-Iv*, e ainda não foram melhor investigados. A análise de seqüências revelou que as nove ESTs similares a *hgcp-Iv* correspondem a um cDNA consenso de 1.776 pb que codifica uma pró-região de 141 aa e uma CP madura de 221 aa. A identidade da pró-região e proteinase madura de HGCP-Iv com a enzima predita de *M. incognita* é de 55 e 76%, respectivamente. Distintas das demais CPs, essas duas seqüências apresentam uma extensão N-terminal de 38 aa com 29,3% de identidade.

Tabela 1.4
Número de ESTs de CP encontradas por busca no NCBI (em novembro de 2003).

	<i>Meloidogyne incognita</i>			<i>Heterodera glycines</i>				
	Ovo	L2	Fême.	Ovo	L2	L3	L4	Virgem
Total	7.314	6.768	2.892	3.636	4.322	3.340	4.940	3.873
Actina	20 (0,27)	5 (0,07)	4 (0,14)	402 (11,06)	2 (0,05)	10 (0,30)	16 (0,32)	8 (0,21)
Cisteíno proteinase	2 (0,03)	12 (0,18)	2 (0,07)	5 (0,14)	1 (0,02)	4 (0,12)	16 (0,32)	15 (0,49)

Números em parêntesis representam a percentagem de cada resultado de busca relativo ao total de ESTs.

Em geral, a identidade de HGCP-Iv madura e outras CPs é maior do que entre as pró-regiões de CPs (**Tabela 1.6**). Por exemplo, CPs maduras de humanos e HGCP-Iv apresentam 61% de identidade, enquanto suas pró-regiões têm apenas 21%. Esse valor é próximo aos entre HGCP-Iv e HGCP-II, uma catepsina-S de *H. glycines* (Urwin *et al.*,

1997a). A pró-região de HGCP-Iv apresenta uma identidade média de 40,4% com outras pró-regiões de nematóides, enquanto a similaridade com papaina e catepsina L humana é bem menor, com uma média de identidade de 20,7%.

Tabela 1.5
Número de ESTs de *Meloidogyne incognita* distribuídas por identidade com CPs de nematóides.
ESTs com alta identidade as CPs de nematóides

	<i>Heterodera glycines</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Onchocerca volvulus</i>
Ovo	-	-	2
Larva L2	7	5	-
Fêmea	2	-	-
Identidade	73%	47%	70%

Tabela 1.6
Comparação de CPs do banco de dados com HGCP-I (CAA70693).

	<i>Meloi.</i>	<i>Caeno.</i>	<i>Dictyo.</i>	<i>Haemon.</i>	<i>Acantho.</i>	<i>Homo</i>	<i>Carica</i>
		NP_507199	AAK77918	AAL14224	AAQ22984	NP_001903	P05994
Pró-Madura	68,2%	56,7%	58,2%	58,3%	34,4%	45,3%	34,7%
Pró	54,9%	33,1%	37,3%	36,2%	15,8%	20,7%	20,7%
Madura	76,9%	71,7%	71,7%	72,6%	46,4%	60,8%	43,4%

Percentuais de similaridade das seqüências peptídicas preditas, calculados pelo programa Pairwise.

1.3.4. Análise da expressão temporal de *Mi-asp1* por “northern blotting”.

Para caracterizar a expressão em nível transcricional de *Mi-asp1*, foi inicialmente realizado um northern blot a partir de RNA total isolados de ovos, larvas L2 e fêmeas (**Figura 1.3**). Sinais de hibridização muito fracos foram detectados nos três estádios de desenvolvimento, mesmo usando uma sonda radioativa altamente específica e um longo tempo de exposição. Entretanto, apesar dos sinais estarem na faixa de tamanho esperado para o mRNA de *Mi-asp1*, eles variaram ligeiramente de tamanho entre diferentes amostras. Considerando que APs compartilham alta identidade de seqüência, esse resultado provavelmente indica a hibridização da sonda de *Mi-asp1* em outros genes de APs. Alternativamente, mas menos provável, esse resultado indicaria um processamento alternativo do mRNA de *Mi-asp1* nas diferentes fases de desenvolvimento.

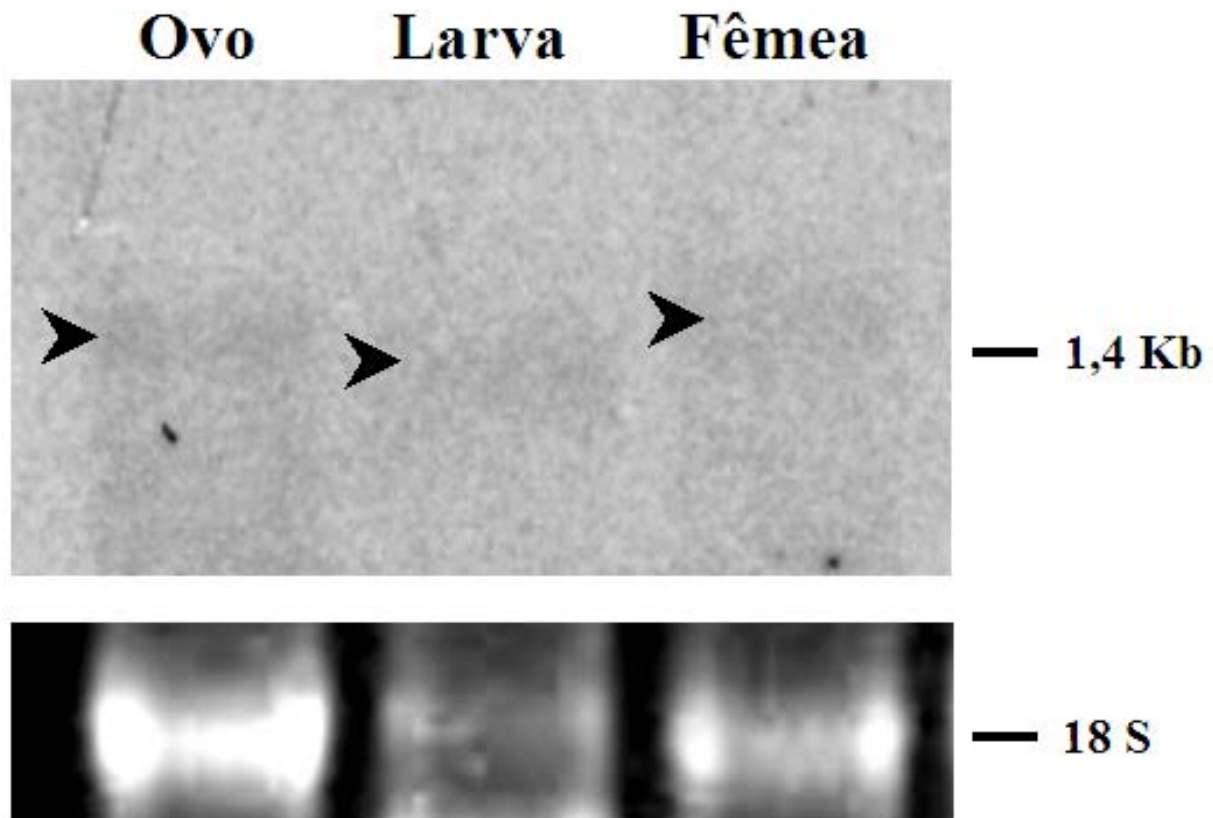


Figura 1.3 – Análise da expressão temporal de *Mi-asp1* por “northern blot”. Amostras de RNA total (22 µg) isolados de ovos, larvas L2 e fêmeas adultas de *Meloidogyne incognita* foram hibridizadas com sonda de *Mi-asp1* marcadas com α -[P³²P]dCTP. A quantidade de RNA aplicada por poço foi normalizada por rRNA 18S, corado com brometo de etídio. As setas mostram o centro das bandas de hibridização encontradas.

1.3.5. Análise da expressão temporal de *Mi-asp1* por RT-PCR semi-quantitativo.

Para inequivocamente analisar a expressão de *Mi-asp1*, foi adotada uma estratégia de RT-PCR semi-quantitativo, usando oligonucleotídeos específicos para esse gene. Foi detectada a transcrição de *Mi-asp1* em ovos, larvas L2 e fêmeas adultas por amplificação de RT-PCR (**Figura 1.4A**). Para normalizar a quantidade de cDNA, molde na PCR e oriundo de diferentes extrações de diferentes estádios de vida, foram utilizados oligonucleotídeos específicos para o gene β -actina, um gene “housekeeping” com sua expressão constitutiva. O gráfico na **Figura 1.4B** demonstra nos pontos finais de cada amplificação uma expressão de *Mi-asp1*, ou melhor, acúmulo de *Mi-asp1*, aproximadamente quatro vezes maior em ovos, comparado com larvas L2 e fêmeas. Os resultados obtidos estão de acordo com outros trabalhos que sugerem um papel para APs na embriogênese (Syntichaki e Tavernarakis, 2002; Jolodar *et al.*, 2004), assim como para CPs tipo catepsina L (Britton e Murray, 2002; Hashmi *et al.*, 2002; Guiliano *et al.*, 2004). Amplificações usando como molde gDNA e os mesmo pares de oligonucleotídeos nos experimentos de RT-PCR resultaram em fragmentos com maior massa molecular, devido à presença de eventuais íntrons, validando as amplificações com cDNA como molde por confirmar a ausência de possível gDNA contaminante nas amostras de cDNA.

1.3.6. Análise da expressão espacial e temporal de *Mi-asp1* por hibridização *in situ*.

O objetivo principal era descrever o padrão de expressão espacial e temporal de *Mi-asp1* para predizer sua função fisiológica em nematóides ou parasitária em plantas. Em três diferentes momentos, foram realizados ensaios de hibridização *in situ* de sonda de RNA antisense a *Mi-asp1* em amostras de *M. incognita* em diferentes etapas de vida. De maneira geral os resultados da hibridização *in situ* são ainda preliminares e a repetição desse ensaio está em andamento. Entretanto, alguns resultados de hibridização *in situ* corroboram sugestivamente com os resultados do RT-PCR semi-quantitativo.

Segundo a literatura (**Tabela 1.7**), a análise de RT-PCR (**Figura 1.4**) e a análise dos bancos de dados (**Tabela 1.2**), o cDNA *Mi-asp1* tem sua expressão relacionada com a fase de ovo. De fato, os ensaios de hibridização *in situ* parecem concordar com as demais previsões (**Figura 1.5**). Em várias lâminas esse padrão foi confirmado, sugerindo que a expressão em nível transcricional cresce conforme a embriogênese de *M. incognita*. Em ovos imaturos ou dormentes os sinais são de inexistentes a fracos. Já em ovos em franco desenvolvimento, onde se visualiza uma distribuição diferencial de

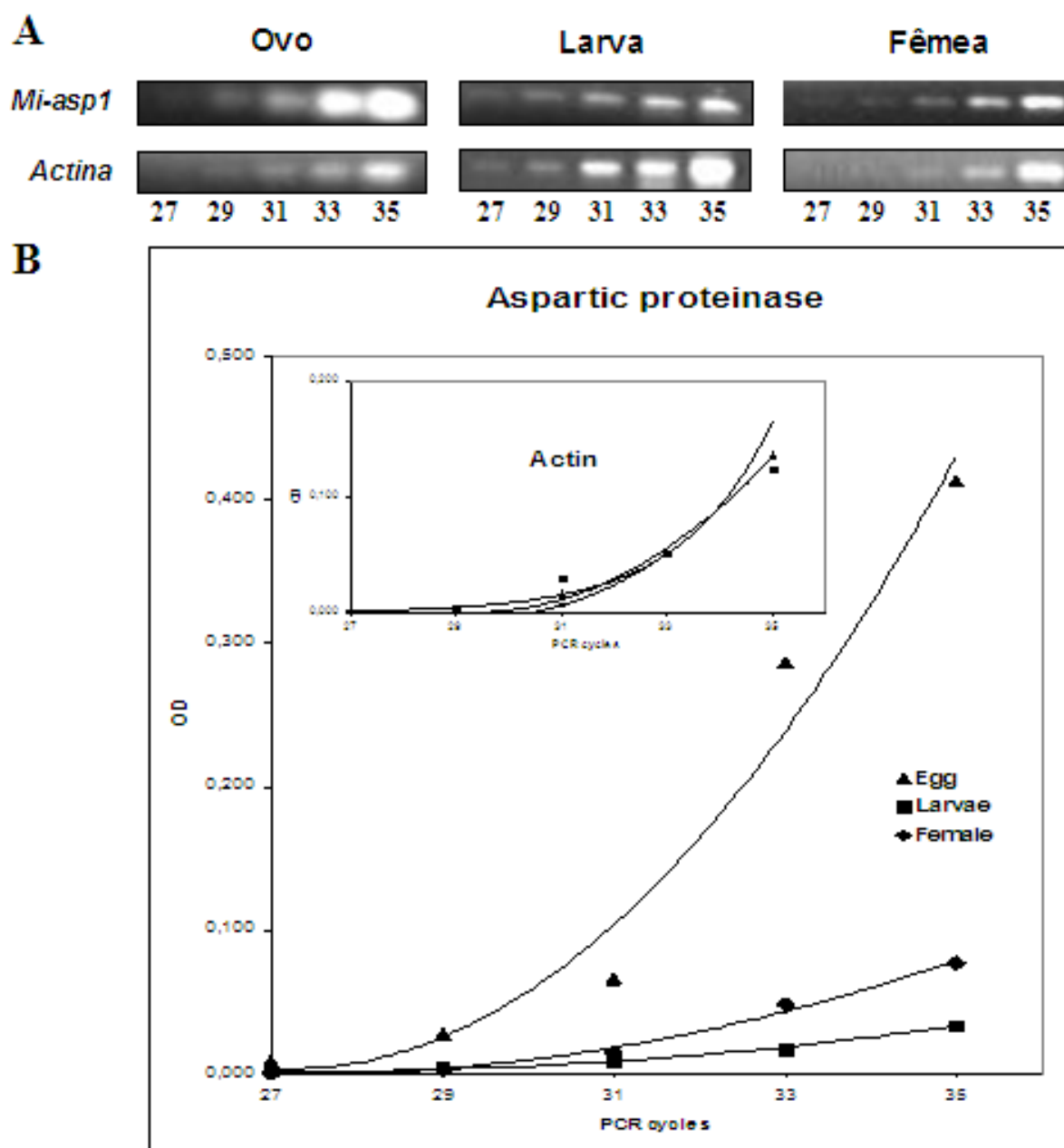


Figura 1.4 – Análise da expressão temporal de *Mi-asp1* por RT-PCR semi-quantitativo. (A) Produto de amplificação por PCR em diferentes números de ciclos (27, 29, 31, 33 e 35), separados por eletroforese em gel de agarose e corados com brometo de etídio. (B) Gráfico gerado com dados densitométricos tomados das imagens digitalizadas dos géis de agarose, considerando os 35º ciclos, corrigido entre géis com o sinal do marcador molecular e normalizado entre diferentes fases de vida com o sinal de β -actina.

células e espaços vazios, os sinais são visíveis e setorizados.

Nenhuma lâmina de larvas L2 apresentou marcação colorida, porém esse dado pode ser melhorado. A análise de expressão usando RT-PCR semi-quantitativo demonstrou que larvas L2 têm o menor sinal de *Mi-asp1*. Considerando que a sensibilidade da técnica de RT-PCR é maior que a de hibridização *in situ*, pode ser sugerido que o acúmulo de mRNA de *Mi-asp1* esteja no limiar da capacidade de detecção. Dessa forma, o protocolo deve ser otimizado para localização da expressão de *Mi-asp1*.

Considerando a fase adulta de fêmeas parasitas (**Figura 1.5D**), sinais com localização difusa foram identificados ao longo de seu corpo periforme. Mesmo assim, uma pequena região anterior da fêmea concentra uma marcação mais forte que o restante. O metacorpo (“metacarpus” em **Figura I.iii**) está claramente identificável proximal à região marcada fortemente, sugerindo que *Mi-asp1* seja principalmente expresso em glândulas excretórias/secretórias, com função predita de digestão extracorpórea ou manutenção do parasitismo. Algumas marcações mais suaves parecem sombrear uma estrutura filiforme que sugere então ser o intestino. Se correto, *Mi-asp1* é expresso em células intestinais e tem papel digestório. Entretanto, todas essas observações são preliminares e carecem de novas hibridizações e análises para qualquer afirmação mais acertada.

1.4. Discussão.

1.4.1. Organização das ESTs codificadoras de AP em NFG.

De acordo com a classificação de Merops ([http:// www.merops.sanger.ac.uk/](http://www.merops.sanger.ac.uk/)), APs de nematóides são agrupadas dentro de duas subfamílias pertencentes à família A1 das peptidases (família pepsina) do Clan AA (aspártico proteinases). Um grupo é nemepsin-3 (A01.053) onde foi encontrado apenas ASP-1 de *C. elegans*. Outro grupo é nemepsin-2 (A01.068), que é representado por ASP-4 e inclui várias APs de nematóides. Atualmente, na literatura, esse grupo é bem conhecido como catepsina D-tipo. Várias APs de nematóides estão agrupadas apenas como peptidases não anotadas (unassigned peptidases, A01.UPA), incluindo as ASP-2, 3, 5 e 6. Entretanto, algumas dessas APs apresentam uma característica comum unificadora, que é uma inserção de 30-35 aminoácidos rica em cisteínas. Assim, existe claramente um grupo bem caracterizado e nomeado como pepsinogênio-tipo (or nemepsin) que inclui ASP-2 de *C.*

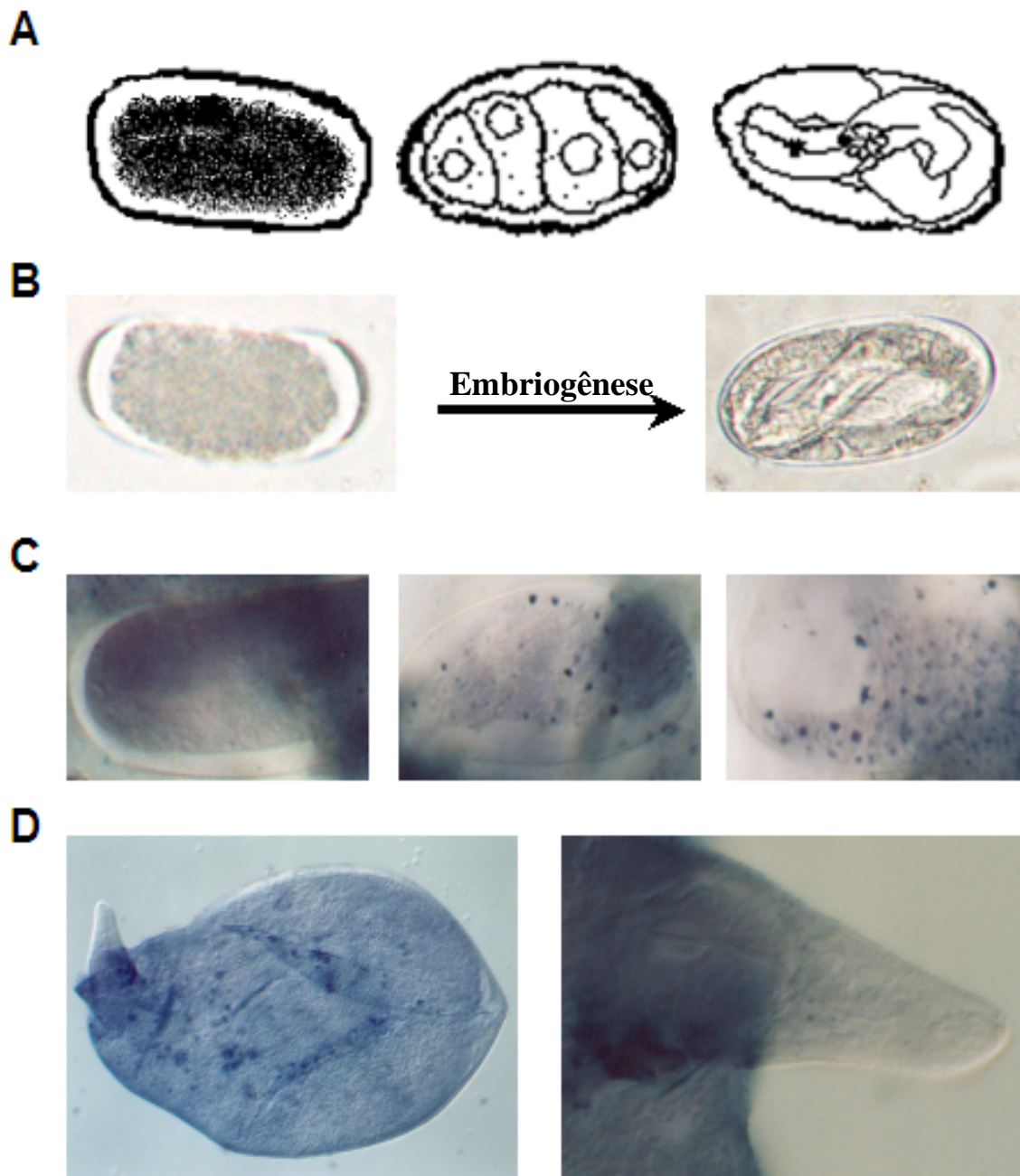


Figura 1.5 – Localização dos transcritos de *Mi-asp1* por hibridização *in situ*. (A) Representação esquemática de três fases embrionárias encapsuladas nos ovos: embrião de 1 célula, embrião de 4 células e larva L1. (B) Microscopia óptica sem marcação. (C) Resultados de hibridização *in situ* de *Mi-asp1* com sondas de RNA antisense em diferentes etapas embrionárias com intensidade e distribuição diferenciais. (D) Sinal de *Mi-asp1* observado em fêmeas adultas. Em detalhe, ampliado à esquerda, uma marcação próxima do metacarpo, podendo ser relacionada com glândulas excretórias/secretórias.

elegans (Geier *et al.*, 1999; Tcherepanova *et al.*, 2000), HcPEP-1 (Longbottom *et al.*, 1997) e HcPEP-2 (Smith *et al.*, 2003) de *Haemonchus contortus*, Na-APR-2 ou necepsin-I de *N. americanus* (Williamson *et al.*, 2003c).

Outras seqüências mostram alta identidade, mas sem a inserção rica em cisteínas, como ASP-5 e ASP-6 de *C. elegans*, BmAsp-1 e BmAsp-3 de *B. malayi*, Strongyloidespepsin de *Strongyloides stercoralis* (Gallego *et al.*, 1998). Catepsina D de vertebrados são endereçadas aos lisossomos pela via da manose-6-fosfato (Wittlin *et al.*, 1999). Um sítio de N-glicosilação extremamente conservado assegura que essas proteínas alcancem os lisossomos. Apesar das catepsina D-tipo de nematóides não possuírem esse sítio conservado e parecerem ser não-lisossomais (Jolodar e Miller, 1997; 1998), elas de fato são lisossomais (Jolodar *et al.*, 2004).

Todas seis APs parálogas de *C. elegans* foram correlacionadas a ortólogos em NFG. A análise dos bancos de dados de ESTs de NFG sugere que existe uma regulação temporal da expressão de APs. As diferentes fases de desenvolvimento foram comparadas, após a normalização com tubulina, considerando os estádios com maior representatividade (**Tabela 1.1**). Dessa forma, parece que a fase L2 infectiva acumula mais transcritos de APs, número próximo de tubulina, e esses mRNAs codificam principalmente APs do grupo de pepsinogênio tipo (**Tabela 1.2**).

Por outro lado, ovos e fêmeas adultas apresentam 10 vezes menos transcritos de APs (**Tabela 1.1**), que estão mais correlacionados com o grupo de catepsinas D tipo (**Tabela 1.2**). Então, esses resultados sugerem um papel principal de APs no estabelecimento do parasitismo, efetuado pela larva L2 de NFG.

1.4.2. Organização das ESTs codificadoras de SP em NFG.

Em plantas infectadas por nematóides, ocorre a ampliação da expressão de genes de defesa, como inibidores de tripsina, peroxidases, quitinases, lipoxigenases e extensinas no sítio de alimentação (Gheysen e Fenoll, 2002). Aumento da expressão de inibidores de tripsina foi observado em *L. esculentum* (Williamson e Hussey, 1996) e *A. thaliana* (Vercauteren *et al.*, 2001) infectadas com *M. incognita*, sugerindo um papel crítico para as SPs na interação planta-nematóide.

O *Mi-ser1* (AY714229), o primeiro cDNA codificador de SP clonado e caracterizado de NFG, foi usado nas buscas em bancos de ESTs, que revelaram a existência de genes de NFG codificadores de SPs agrupados em grupos. Existe uma identidade de seqüência baixa entre os grupos (parálogos), mas alta identidade dentro de

cada grupo (ortólogos). Comparando o banco de dados com as três SPs de *H. glycines*, todas ESTs ortólogas foram identificadas. A alta identidade entre os ortólogos de SPs em diferentes espécies de NFG sugere que inibidores contra uma SP específica poderão ser efetivos contra suas SPs ortólogas, num amplo espectro de espécies dentro do gênero.

A expressão de *Mi-ser1* é regulada por desenvolvimento e mostra-se maior em fêmeas do que em ovos e quase não detectável em L2 (Fragoso *et al.*, 2005). A análise *in silico* das ESTs codificadoras de SPs em NFG corrobora com os resultados de northern blot e RT-PCR ao mostrar acúmulo de transcritos de SP em ovos, mas não em L2. Uma comparação precisa com fêmeas adultas não foi possível porque o número de ESTs de fêmeas disponível no banco de dados ainda é muito baixo e portanto não é representativo.

Esse dado concorda com os trabalhos prévios que mostram altos níveis de expressão de proteinases nas fases de vida que se alimentam de plantas (Atkinson *et al.*, 2003). Nos NFG e NFC, as fêmeas adultas representam a fase parasitária que necessita digerir proteínas das plantas para obter aminoácidos livre e energia, enquanto as larvas L2 infectivas não se alimentam (Wyss *et al.*, 1992) e obtêm energia pelo consumo de suas próprias reservas lipídicas (Reversat, 1981). Este fato é sustentado pela análise de ESTs de larva L2, na qual genes envolvidos na via do glioxilato são detectados em grande número (Mccarter *et al.*, 2003). A expressão de SP em ovos é menos clara. É possível que o consumo de estoques protéicos seja necessário para o crescimento larval. Alternativamente, SPs têm um papel principal em vários processos do desenvolvimento que podem ser necessários para o crescimento larval, além de ecdises.

Os resultados descritos aqui indicam que SP correlacionam com o estágio de fêmeas adultas parasitas, sugerindo sua importância na digestão e, conseqüentemente, no crescimento e reprodução de NFC e NFG.

1.4.3. Organização das ESTs codificadoras de CP em NFG.

Similar a atividade inibitória sobre a enzima cognata, PROHGCP foi altamente eficaz na inibição de atividade proteolítica de CP de fêmeas adultas de *M. incognita* (Silva *et al.*, 2004). Apesar de não haver na época nenhum trabalho publicado de isolamento e caracterização de CP em *M. incognita*, foi possível analisar o fenômeno de inibição cruzada. Conseqüentemente, a busca por ESTs de *M. incognita* ortólogas nos bancos de dados foi realizada para justificar os dados do ensaio de inibição em maior

detalhe. Foram encontradas nove ESTs que correspondiam a um único gene com 65,5% de identidade no nível peptídico com HGCP-I. De fato, dentre todas as seqüências comparadas, a CP de *M. incognita* apresentou a maior identidade com HGCP-Iv. Dessa forma, a abundância relativa de ESTs codificando este gene sugere sua principal contribuição na atividade proteolítica de CP total encontrada em fêmeas de *M. incognita*. A alta identidade entre as seqüências de *H. glycines* e *M. incognita* e a predominância desta CP em *M. incognita* pode explicar os ensaios de inibição *in vitro*. Sabendo que PROHGCP foi altamente eficiente na inibição da atividade de CP em extratos brutos de fêmeas de *M. incognita*, acredita-se que essa pró-região virtualmente inibirá outras CPs ortólogas a HGCP-Iv em todas espécies de NFG e NFC.

1.4.4. Caracterização molecular de Mi-asp1.

Objetivando engenheirar resistência em plantas contra nematóides endoparasitas por introdução de transgenes anti-parasita, foi realizada uma prospecção por proteinases como potenciais alvos na patogênese e sobrevivência do nematóide. Nessa linha, foi clonado um cDNA codificador de aspártico proteinase (AP) do nematóide formador de galhas (NFG) *Meloidogyne incognita*, chamada de *Mi-asp1* (DQ360827). Várias estratégias de ruptura da interação planta-nematóide podem ser aplicadas, sendo que um transgene anti-parasita pode codificar proteínas bloqueadoras altamente específicas, como inibidor protéico de AP, pró-região da AP cognata, domínio de anticorpo ou dsRNA. De fato, os ortólogos de *Mi-asp1* (**Figura 1.6**) compartilham identidade de seqüência tão alta que é possível imaginar amplo espectro inibitório, onde plantas transgênicas poderiam ser resistentes a maioria das espécies dos gêneros *Meloidogyne*, *Heterodera* e *Globodera*.

Utilizando RT-PCR, 5'RACE e 3'RACE, o cDNA *Mi-asp1* foi isolado de larvas de segundo estágio L2 (Fragoso, 2003). O cDNA de *Mi-asp1* codifica um zimógeno com o clássico formato pré-pró-madura identificado. O grupo G (**Tabela 1.2**) de L2 de *M. hapla* forma uma seqüência contígua com *Mi-asp1* na extremidade 5', que codifica um peptídeo sinal de 19 resíduos de aminoácidos, com seu sítio de clivagem próximo do previsto para *Mi-asp1*. Assim, a pró-região e a proteinase madura de *Mi-asp1* estão completas, faltando apenas o peptídeo sinal. A amplificação de três consensos pelo RT-PCR de cDNA de L2, o padrão de hibridização com quatro bandas pelo Southern blot (**Anexo V.i**) e os tamanhos diferenciais das bandas de hibridização com RNA de ovo, larva L2 e fêmea (**Figura 1.3**), o agrupamento de ESTs codificadoras de AP de NFG

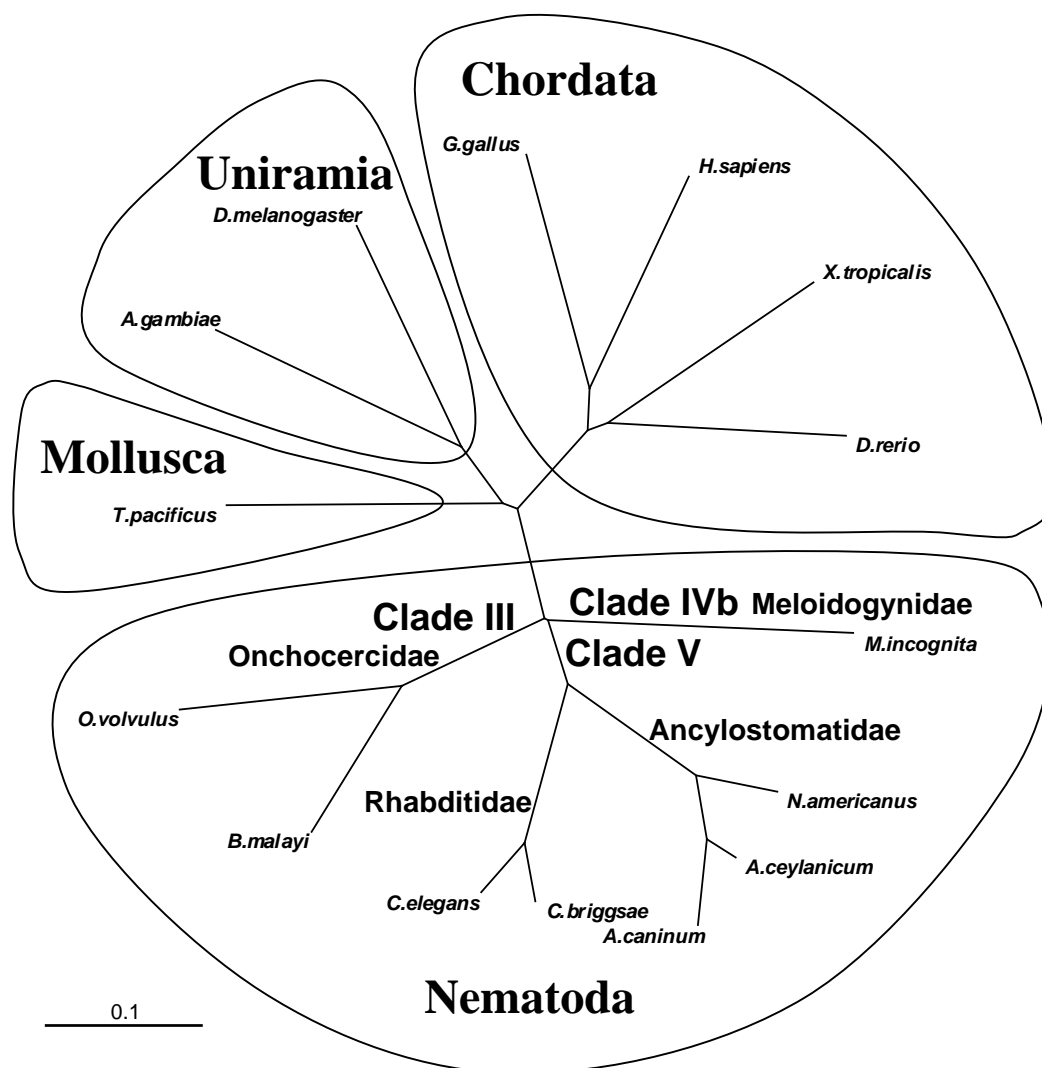


Figura 1.6 – Dendrograma radial dos ortólogos de catepsina D. Árvore gerada a partir do alinhamento múltiplo de seqüências peptídicas preditas de ortólogos de várias origens: *Meloidogyne incognita* (DQ360827), *Necator americanus* (CAC00543), *Ancylostoma ceylanicum* (AAO22152), *Ancylostoma caninum* (AAB06575), *Caenorhabditis briggsae* (CAE61399), *Caenorhabditis elegans* (NP_510191), *Brugia malayi* (BAC05689), *Onchocerca volvulus* (AAD00524), *Todarodes pacificus* (BAD15111), *Anopheles gambiae* (XP_307785), *Drosophila melanogaster* (NP_652013), *Gallus gallus* (NP_990508), *Homo sapiens* (AAP36305), *Xenopus tropicalis* (NP_988964) e *Danio rerio* (AAH42316). Os setores denotam divisões de filo. Alguns clados e famílias de nematóides estão especificados. Os programas usados foram CLUSTAL_W e TREEVIEW. A escala representa 0,1 substituição.

desenvolvimento (**Figura 1.4**). Resultados anteriores de “Southern blot” (Fragoso, 2003) mostraram diferentes intensidades de bandas de hibridização, sugerindo que *Mi-aspl1* é um gene cópia-única (banda escura), como seus ortólogos (Tcherepanova *et al.*, 2000; Jolodar *et al.*, 2004), e as bandas mais claras correspondem a seus parálogos.

Ambas, catepsina D-tipo e pepsinogênio-tipo, APs de nematóides parasitas de animais têm sido fortemente correlacionadas com a digestão de hemoglobina, pele e tecido do hospedeiro (**Tabela 1.7**). Comparações de pH ótimo e sítios de clivagem de ambas em *N. americanus* sugerem um processo ordenado, onde as catepsina D-tipo, Na-APR-1, inicia o processamento de hemoglobina seguida de pepsinogênio-tipo, Na-APR-2 (Williamson *et al.*, 2003b). Vários outros trabalhos provam a importância de APs na digestão de hemoglobina em *H. contortus* (Longbottom *et al.*, 1997). O trematode *Schistosoma mansoni* também tem um ortólogo de catepsina D-tipo envolvido na digestão de hemoglobina (Brindley *et al.*, 2001; Brinkworth *et al.*, 2001) em seu intestino (Morales *et al.*, 2004). O “hookworm” *N. americanus*, um parasita humano que pode de forma não eficiente interagir com cães, possui Na-APR1, que cliva hemoglobina humana duas a seis vezes mais que hemoglobina canina (Williamson *et al.*, 2002). Por outro lado, o “hookworm” *A. caninum*, um parasita de cães que pode sobreviver em humanos, possui Ac-APR-1 que cliva melhor hemoglobina canina do que humana. Ambos ortólogos de catepsina D-tipo são expressos em borda microvilar de intestinos isolados de nematóides adultos sugadores de sangue (Williamson *et al.*, 2003b). A digestão de hemoglobina para esses nematóides parasitas de animais é a maior força direcionadora de especificidade proteolítica por evolução adaptativa (Williamson *et al.*, 2002). A correlação hospedeiro-específico foi também observada em pepsinogênio-tipo, Na-APR-2, na digestão de hemoglobina e proteínas séricas de humanos e caninos (Williamson *et al.*, 2003a).

Os produtos de excreção-secreção de *N. americanus* adultos apresentaram atividade proteolítica de aspártico, cisteíno e serina proteinases sugerindo uma digestão extracorpórea de proteínas de tecidos conectivos (Brown *et al.*, 1995), provando posteriormente serem importantes para os parasitas durante a penetração na pele e migração nos tecidos dos hospedeiros (Brown *et al.*, 1999). O pH normal da pele de 5,5 é uma característica de seleção principalmente para AP que outras classes de proteinases (Brown *et al.*, 1999). As larvas de *N. americanus* são obrigadas a penetrar a pele dos hospedeiros. De fato, as secreções de larvas hidrolisam colágenos tipo I, III, IV, e V,

Tabela 1.7. Caracterização de AP₂ pertencentes a subfamília de cathepsina D-like (A01.068 ou nemepain-2, segundo MEROPS).

Espécie do Nematóide	Nome da Sequência	Número de Acesso	Identidade/ E-value	Localização		Estádio de Desenvolvimento e/ou Função	Referências
				Subcelular	Histológica		
<i>Caenorhabditis briggsae</i>	Hypothetical protein	CAE61399	64,073 % 1,2e-128	—	—	—	Não publicado
<i>Necator americanus</i>	Nc-APR-1 necpain II	CAC00543	65,144 % 3,4e-128	—	Intestino, anfídeos e glândulas excretória/secretória	L3 e adulto Digestão de hemoglobina e proteínas séricas e da pele	(Williamson <i>et al.</i> , 2002)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	asp-4 R12H7.2	NP_510191	64,524 % 8,9e-128	Citoplasma e lisossomo	Intestino, hipoderme, músculo e neurônios	Final em embriões e inicial em L1 Neurodegeneração	(Synichaki <i>et al.</i> , 2002)
<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	Ay-APR-1 AcyASP	AAO22152	63,593 % 9,6e-127	—	—	—	Não publicado
<i>Brugia malayi</i>	Bm4sp-2	BAC05689	62,061 % 6,6e-121	—	—	—	Não publicado
<i>Ancylostoma caninum</i>	Ac-APR-1 Acap1	AAB06575	59,859 % 4,9e-116	—	Intestino, anfídeos e glândulas excretória/secretória	L3 e adulto Digestão de hemoglobina e proteínas séricas e da pele	(Williamson <i>et al.</i> , 2002)
<i>Onchocerca volvulus</i>	Ov-APR	AAD00524	59,950 % 1,2e-110	Lisossomo	Intestino, hipoderme e órgãos reprodutivos	Oócitos maduros, mórulas jovens e adultos. Digestão, oogenese, embriogênese e degeneração	(Jolodar <i>et al.</i> , 2004)
<i>Heterodera glycines</i>	Hgg-33	AAL78216	71,282 % 3,4e-65	Lisossomo	Intestino	—	(Cao <i>et al.</i> , 2001)

Identicidades e E-values medidos por pareamento (pairwise comparisons) apenas das regiões com sobreposição a Mi-aspl.

fibronectina, laminina e elastina. A penetração larval foi significativamente inibida com pepstatina A (54,8%), confirmando a importância da atividade de AP durante o processo invasivo (Brown *et al.*, 1999). Anticorpos de camundongo para Na-APR-2 têm demonstrado interferir com a migração de larvas L3 e 50% não conseguiram penetrar em tecido excisado de hamster *in vitro*. Anticorpos contra as frações de HcPEP1 e 2 reduziram significativamente a contagem de ovos de *H. contortus* em 48% e o número de vermes em 36% (Smith *et al.*, 2003).

Algumas funções não parasitárias de AP têm sido correlacionadas com processos de desenvolvimento além da digestão luminal e lisossomal. Nematóides podem usar APs na eclosão pela hidrólise de proteínas da membrana do ovo, na ecdise e metamorfose (Masler *et al.*, 2001). Apesar da problemática na filogenia de nematóides (celomata versus ecdysozoa), alguns aparatos de ecdise são indubitavelmente muito similares entre nematóides e artrópodes. Em inseto, uma AP lisossomal, específica de tecidos em histólise, mostrou um padrão de expressão temporal e espacial respectivamente correlacionado com as fases de ecdise e com a histólise de corpos de gordura. Durante a metamorfose, ocorre o extravasamento de adipócitos na hemolinfa, seguido por morte celular programada mediada por lisossomo (Rabossi *et al.*, 2004).

Mecanismos proteolíticos têm também implicação no processo de envelhecimento, assim como de várias desordens neurodegenerativas (Samara e Tavernarakis, 2003). Sob circunstâncias normais, a catepsina D lisossomal ou luminal é responsável respectivamente pela digestão de proteínas dentro da célula ou intestino. Por outro lado, respondendo a insultos ativadores, a catepsina D invade o citoplasma da célula e desencadeia papéis principais e indispensáveis na morte celular por necrose, especialmente durante a neurodegeneração (Syntichaki e Tavernarakis, 2003). Várias desordens neurodegenerativas humanas são relacionadas as doenças de Alzheimer Huntington e Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, ataxia espinocerebelar, encefalopatia espongiiforme transmissível (Syntichaki e Tavernarakis, 2003), e também ocorre em epilepsia, derrame, hipoglicemia e trauma (Yamashima, 2000; Yamashima *et al.*, 2003). Dessa forma, a morte neuronal patológica pode ocorrer por apoptose ou necrose, ou ainda ambos (Artal-Sanz e Tavernarakis, 2005). Apesar de apoptose e necrose mostrarem enormes diferenças morfológicas (Majno e Joris, 1995), novas descobertas indicam que a necrose segue padrões específicos com vias comuns (Syntichaki e Tavernarakis, 2003). Desse modo, proteínas específicas são ativadas em ambas células apoptóticas e necróticas. Surpreendentemente, algumas vezes a mesma

célula pode sofrer ambas mortes celulares por apoptose ou necrose em resposta a diferentes estímulos. De fato, o destino celular pode ser decidido pela intensidade do insulto, num gradiente de resposta (Syntichaki e Tavernarakis, 2003).

Incrivelmente, a morte celular por necrose parece ser altamente conservada de nematóides a humanos, e os melhores modelos para entender essas doenças humanas têm sido *Drosophila melanogaster* e principalmente *C. elegans* (Driscoll e Gerstbrein, 2003). Considerando o último, a expressão de *asp-4* foi correlacionada a neurodegeneração em ensaios de RNAi (Tavernarakis *et al.*, 2001). Estudos detalhados provaram que ambos ASP-3 e ASP-4 são executores de células de neurônio respondendo a diversos estímulos que desencadeiam a morte celular por necrose. Num grau menor, ASP-1 também ajuda na necrose, mas já, por outro lado, ASP-2, ASP-5, ASP-6 não (Syntichaki *et al.*, 2002). Dependendo da simulação de insulto aplicada, a participação de ASP-4 foi a mesma de ASP-3 ou ligeiramente maior (Syntichaki *et al.*, 2002).

Seguindo a hipótese “calpaina-catepsina” de morte celular por necrose (Yamashima, 2004), primeiro, algum insulto dispara o aumento de cálcio no citoplasma, como a hipóxia (Aki *et al.*, 2001; Aki *et al.*, 2002), depleção de energia (Aki *et al.*, 2003). Segundo, a H⁺-ATPase vacuolar, uma bomba que acidifica lisossomos, promove uma acidificação intracelular (Syntichaki *et al.*, 2005). Terceiro, as calpains (cisteíno proteinases cálcio dependentes intracelulares) ativadas induzem a ruptura da membrana lisossomal, além de atacar proteínas do citoesqueleto, como spectrin e fodrin, e outros componentes estruturais. De fato, os lisossomos se fundem e distribuem ao redor do núcleo que, finalmente, condensa e migra para a periferia, enquanto os lisossomos se rompem (Artal-Sanz *et al.*, 2006). Quarto, a liberação de catepsina exterminadoras no citoplasma acidificado finalmente causa o colapso da célula. Adicionalmente, as catepsina B, H e L (cisteíno proteinases) lisossomais têm sido relacionadas a neurodegeneração tardia em isquemias cerebrais (Seyfried *et al.*, 2001).

Em *C. elegans*, calpain específicas TRA-3 e CLP-1, cada uma sozinha ou em associação, de alguma forma ativa(m) ASP-3 e ASP-4, que individualmente ou combinadas destrói(em) a célula por necrose (Artal-Sanz e Tavernarakis, 2005). Trabalhos prévios detectaram alta expressão de ASP-3 e ASP-4 em intestino de animais adultos e baixa em parede muscular, hipoderme, neurônios, útero e outras (Syntichaki *et al.*, 2002). Eles também detectaram a expressão em embriões de fases iniciais, que corrobora com nossos resultados de RT-PCR (**Figura 1.4**) e hibridização *in situ* (**Figura**

1.5). A morte celular programada de neurônios é necessária durante o desenvolvimento para aquisição de um acurado ligamento do sistema nervoso (Artal-Sanz e Tavernarakis, 2005; Lettre e Hengartner, 2006).

Adicionalmente, análises de imunocitoquímica em cérebro de ratos revelaram que altos níveis de catepsina D lisossomal foram detectados em tecidos embrionais. Por outro lado, em ratos idosos durante neurodegeneração, a catepsina D foi localizada no citoplasma. A catepsina D foi localizada principalmente nos lisossomos de neurônios cérebro-corticais jovens e nos citoplasmas desses neurônios velhos (Bi *et al.*, 2000). Camundongos com nocaute de catepsina D se desenvolvem normalmente durante as duas primeiras semanas, param de crescer na terceira semana e morrem num estado de anorexia por volta do 26º dia (Saftig *et al.*, 1995). Intrigantemente, a função lisossomal foi satisfatória, mas a homeostase tecidual não. Também intrigante é o fato da catepsina D atuar em mecanismos semelhantes em animais tão distantes evolutivamente como nematóides de mamíferos.

1.5. Conclusão.

Visto que existe grande número de ESTs de nematóides nos bancos de dados, mesmo uma mineração manual dessas seqüências pode ser usada criteriosamente para estudar com eficiência alguns genes específicos.

A caracterização do sistema proteolítico de *M. incognita*, combinada com o uso de inibidores proteolíticos, pode contribuir para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a nematóides parasitas, talvez pelo uso de estratégias anti-nutricionais, que controlem a expressão espacial e temporal de inibidores específicos contra as proteinases de *M. incognita*.

Nesse caminho, novos trabalhos foram direcionados para a expressão heteróloga de *Mi-aspl* e *Mi-ser1* para uso futuro da proteína recombinante objetivando a seleção de inibidores específicos, usando uma varredura de bibliotecas de bacteriófagos mutagenizados de inibidores de APs e SPs, pela estratégia de apresentação por fagos, “phage display”. Por outro lado, a expressão da pró-região em bactérias, para futuros testes *in vitro* e *in vivo* de seu potencial como inibidor altamente eficiente e específico, também está em pleno andamento.

Como descrito acima, APs estão envolvidas em vários outros processos celulares além de digestão luminal. Apesar de não ter sido obtida nenhuma evidência direta da

função de *Mi-asp1*, a alta identidade de sequência com outras APs de nematóides relacionadas com embriogênese sugerem que seu bloqueio pode resultar em controle de *M. incognita* por impossibilitar a formação do sistema nervoso durante a embriogênese ou a metamorfose durante a ecdise larval. Estudos subsequentes são ainda necessários para localizar a expressão subcelular e histologicamente de *Mi-asp1*, definir as proteínas da planta que são seu substrato e determinar seu papel no parasitismo de plantas.

1.6. Perspectivas.

Para uma caracterização bioquímica, os cDNAs *Mi-asp1* e *Mi-ser1* foram subclonados em vetores de expressão heteróloga em *Pichia pastoris*. Utilizou-se amplificação de PCR com oligonucleotídeos desenhados para flanquear regiões específicas e introduzir sítios de restrição desejados. Dessa forma, as construções de *Mi-asp1* e *Mi-ser1* pró-madura foram individualmente clonadas em pHIL-S1 e as construções apenas com a região madura foram clonadas em pPIC9. Os ensaios de expressão estão em franco andamento.

Já foi demonstrada a possibilidade de indução de resistência parcial a *H. glycines* e *G. pallida* por nocaute de CPs obtido com RNAi (Urwin *et al.*, 2002). Nesse contexto, foram planejados ensaios de RNAi para *Mi-asp1* e *Mi-ser1*, objetivando a validação desses como alvos de interesse e a determinação funcional.

A utilização da pró-região de CP como inibidor específico, elegantemente comprovada (Silva *et al.*, 2004), despertou grande interesse com relação as pró-regiões de *Mi-asp1* e *Mi-ser1*, que foram então subclonadas em vetor de expressão em *E. coli* e estão em fase inicial de teste. Além da possibilidade de testes enzimáticos *in vitro*, onde a pró-região poderá inibir extrato protéico bruto, ensaios *in vivo* serão realizados por “soaking”. Nessa estratégia, larvas L2, que normalmente não se alimentam, são tratadas com neurotransmissores que induzem a ingestão de moléculas em teste, no caso as pró-regiões das proteinases *Mi-asp1* e *Mi-ser1* produzidas em bactérias.

Adicionalmente, foi planejada uma construção truncada resultante da união em um único cistron das três pró-regiões de *Mi-asp1*, *Mi-ser1* e *hgcp-Iv*, isoladas no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga. Seis oligonucleotídeos foram desenhados para amplificação das três pró-regiões. Para permitir a fusão dos produtos de PCR, dois pares de oligos têm 18 nt de sobreposição, de forma que os produtos de PCR distintas, quanto misturados, sirvam para anelamento cruzado. Para evitar

possíveis falhas de dobramento na estrutura individual de cada pró-região, foram introduzidos seis codons de glicinas. Teoricamente esses resíduos de glicina, como espaçadores, podem assumir vários ângulos, não interferindo tanto no enovelamento de cada pró-região. De fato, os 18 nt inseridos para sobreposição são os seis codons de glicinas. Os oligonucleotídeos flanqueadores da proteína truncada (tripronema) inserem sítios de restrição para subclonagem em vetor de transformação de plantas pCAMBIA2300, assim como uma região de reconhecimento por recombinases para clonagem em vetor de expressão em bactéria pET-TOPO.

A pró-região e o RNAi serão testados no intuito de bloquear a função de *Mi-asp1*. A expressão espacial e temporal de *Mi-asp1* poderá ser detectada em nível protéico por “western blot” e por imunocitoquímica tão logo anticorpos específicos sejam produzidos a partir de *Mi-asp1* heteróloga produzida em *E. coli* (subclonado em vetor de expressão pQE30 e previamente expressado; Fragoso, 2003).

CAPÍTULO 2 – Genômica funcional de larvas L2 de *Meloidogyne incognita*.

2.1. Resumo do segundo capítulo.

O segundo capítulo apresenta a genômica funcional de larva 2 de *M. incognita* (biblioteca de ESTs), baseada na obtenção de grande número de seqüências de cDNAs, análise de seqüências (agrupamento e comparação com banco de dados) e ontologia gênica (classificação funcional dos genes), para determinação de prováveis genes de parasitismo como um primeiro passo no estudo molecular da interação planta-nematóide. O estudo de novos genes de parasitismo pode lançar luz no mecanismo de estabelecimento do parasitismo, favorecendo novas estratégias para romper com interação planta-nematóide por meio da transformação de plantas com fatores inibitórios de parasitismo. Da mesma forma, a determinação de genes letais, específicos de nematóides, representa uma etapa fundamental para a obtenção de plantas transgênicas inibidoras de funções vitais.

2.2. Metodologia.

2.2.1. Construção de biblioteca de ESTs de larvas L2 de *M. incognita*.

As larvas infectivas L2 congeladas foram trituradas em almofariz com nitrogênio líquido e pistilo. O tecido animal em pó foi transferido para tubo Falcon 15 mL com 4 mL de solução de Trizol[®] (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Na etapa final, o precipitado de RNA total foi ressuscitado em 100 µL de água RNase free. A quantidade de 550 µg de RNA total foi determinada em espectrofotômetro e a qualidade em gel de agarose desnaturante com formaldeído (**Figura 2.1A**). O RNA total foi então armazenado a – 80 °C.

Uma fração enriquecida de poli-A⁺, em detrimento de RNA ribossomal e transportador, foi obtida por purificação de 440 µg de RNA total (**Figura 2.1B**), usando uma resina associada a oligo-dT do kit Oligotex[®] (QIAGEN), conforme recomendações do fabricante. O mRNA (poli-A⁺) foi quantificado e resultou em 8,1 µg, ou seja, com a eficiência de 1,8% no processo de purificação, o que corresponde aos padrões esperados devido à quantidade de mRNA presente em células. Como pode ser observado, o RNA ribossomal apresentou-se íntegros, ou seja, sem sinais de degradação aparente (**Figura**

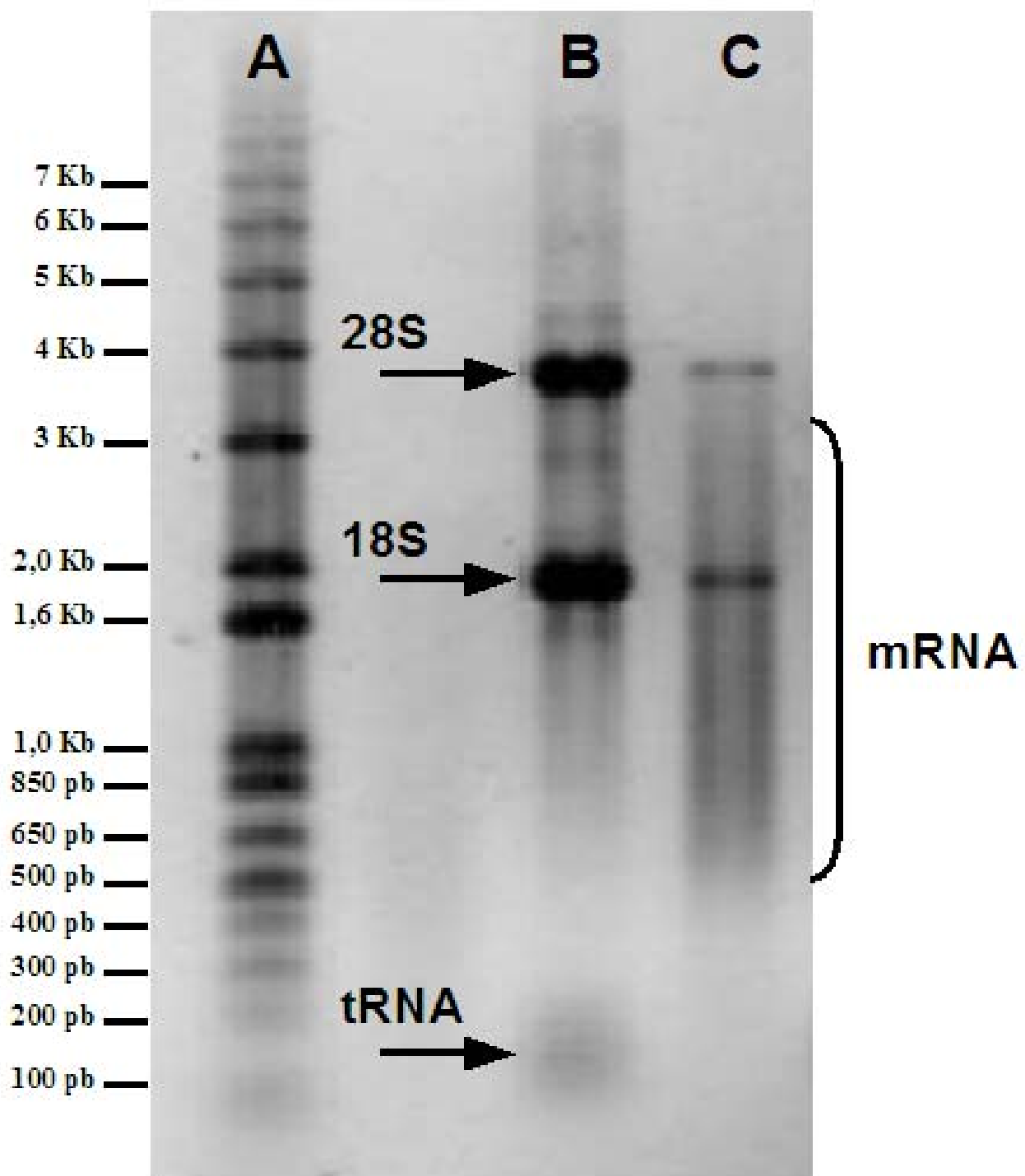


Figura 2.1 – Análise da qualidade das amostras de RNA de larvas L2. Eletroforese em gel desnaturante, agarose 1%, de 1,2 µg de cada amostra, corados com brometo de etídeo. (A) Marcador de massa molecular 1kb Plus, DNA ladder (Invitrogen). (B) O RNA total separado por eletroforese, em destaque por setas as frações de rRNA 28 S e 18 S e tRNA. (C) O mRNA (poli-A+), parcialmente purificado, apresenta uma grande redução de rRNA e de tRNA. Nota-se uma maior intensidade no rastro entre 500 pb e 3 kb, o que se correlaciona com os tamanhos predominantes dos diferentes genes expressos em larvas L2.

2.1), sugerindo que o mRNA (poli-A⁺) também esteja intacto. Então, foram utilizados 3,2 µg do RNA poli-A⁺ resultante para a construção da biblioteca de cDNAs usando o “kit Superscript Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning[®]” (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante. A síntese de cDNA a partir de mRNA foi feita pela transcriptase reversa do kit. O procedimento foi monitorado usando a incorporação de α-[³³P]dCTP, resultando em eficiência de 4%. Outra fração do cDNA foi aplicada em gel alcalino de agarose, que foi desidratado e exposto a um filme de raio-X por dois meses até a revelação do filme (**Figura 2.2**). Como pode ser visto no filme auto-radiográfico, o produto da síntese da primeira fita de cDNA apresenta rastros variando de aproximadamente 0,5 a 1,5 kb, o que está de acordo com o tamanho de mRNA esperado. Após a síntese das duas fitas de cDNA (**Figura 2.3A**), resultando em dsDNA, o adaptador *Sal I* foi adicionado numa reação de ligação (**Figura 2.3C**) e o cDNA foi digerido com *Not I* (**Figura 2.3D**). Os produtos foram fracionados em coluna de exclusão molecular Sephacril S-500 HR. As frações foram quantificadas por contagem em cintilador e 15 ng de cDNA da fração de maior massa molecular foram utilizados no sistema de ligação, durante 48 h a 4 °C, com o vetor pSPORT-1 (**Figura 2.4**), fornecido pelo próprio kit (**Figura 2.3E**). Os cDNAs clonados no vetor plasmidial pSPORT-1 foram introduzidos em células competentes de *Escherichia coli* XL1-Blue (10⁹ UFC/µg DNA) por eletroporação (**Figura 2.3F**). As colônias obtidas foram submetidas à extração de DNA plasmidial em placa para seqüenciamento automático. Colônias individualizadas foram inoculadas em 30 placas de 96 poços com 1 mL de meio LB (com 100 mg/mL de ampicilina) para a preparação de DNA plasmidial. Cada amostra foi submetida à reação de seqüenciamento, realizadas pela Plataforma de Seqüenciamento (Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia). As seqüências geradas foram então analisadas quanto à qualidade, tamanho de insertos e redundância da biblioteca. Posteriormente, foi realizada a análise das seqüências para se determinar as possíveis funções associadas a cada EST.

2.2.2. Agrupamento de ESTs e análise computacional de seqüências.

A partir do dado bruto do seqüenciamento, ou seja os eletroferogramas de cada “read”, foi utilizado o programa PHRED (Ewing *et al.*, 1998), que associa a cada base uma pontuação em relação à confiabilidade daquela informação resultante da qualidade da reação de seqüenciamento, da separação dos fragmentos nos capilares e da leitura de

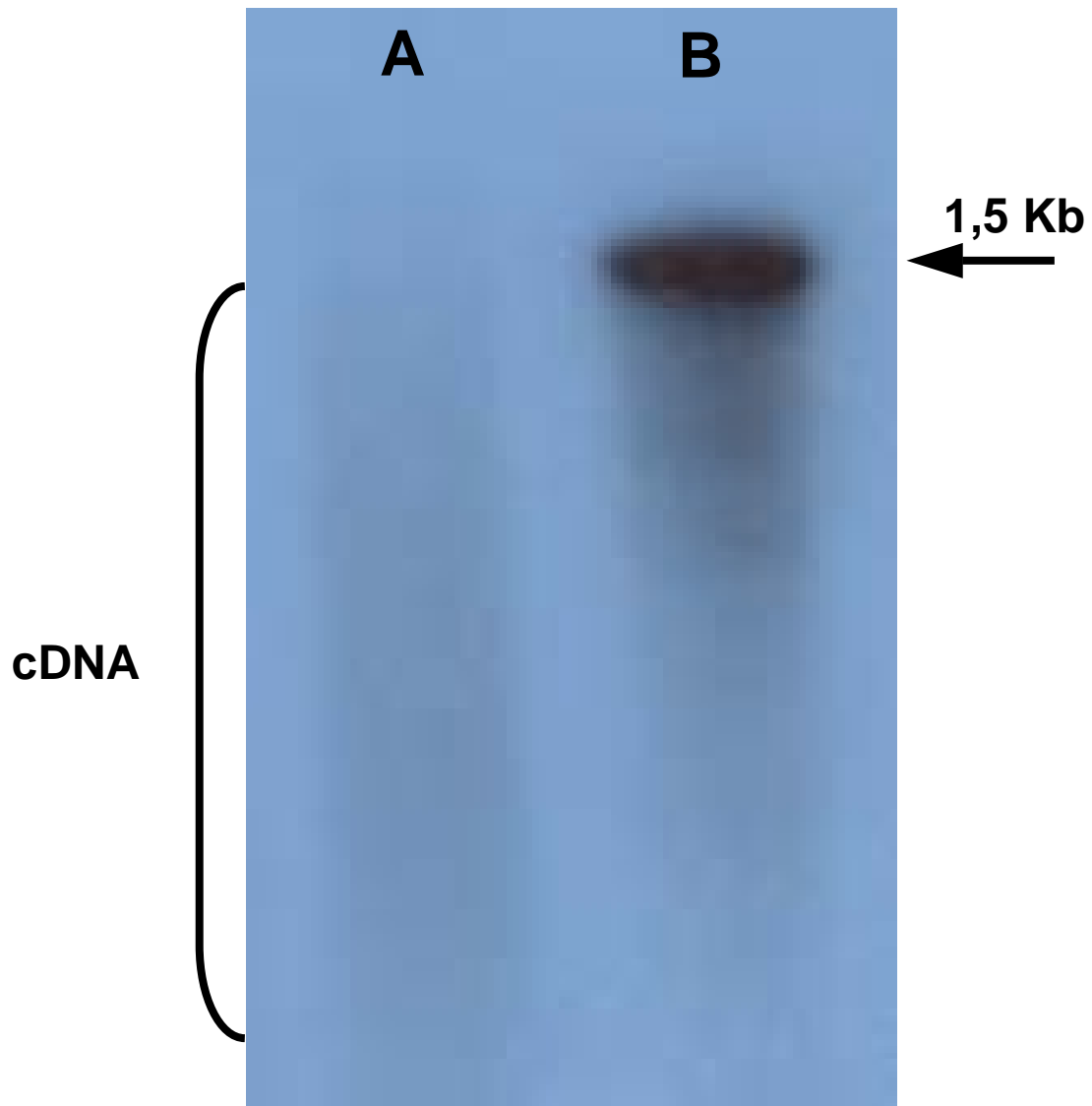


Figura 2.2 – Auto-radiografia de gel alcalino. Para acompanhar as etapas de síntese da segunda fita de cDNA foi utilizada a marcação com α -[P³³P]dCTP. **(A)** Produto da síntese da primeira fita de cDNA de L2, visto como um rastro suave no filme. **(B)** mRNA controle, fornecido no kit, com 1,5 kb de massa molecular.

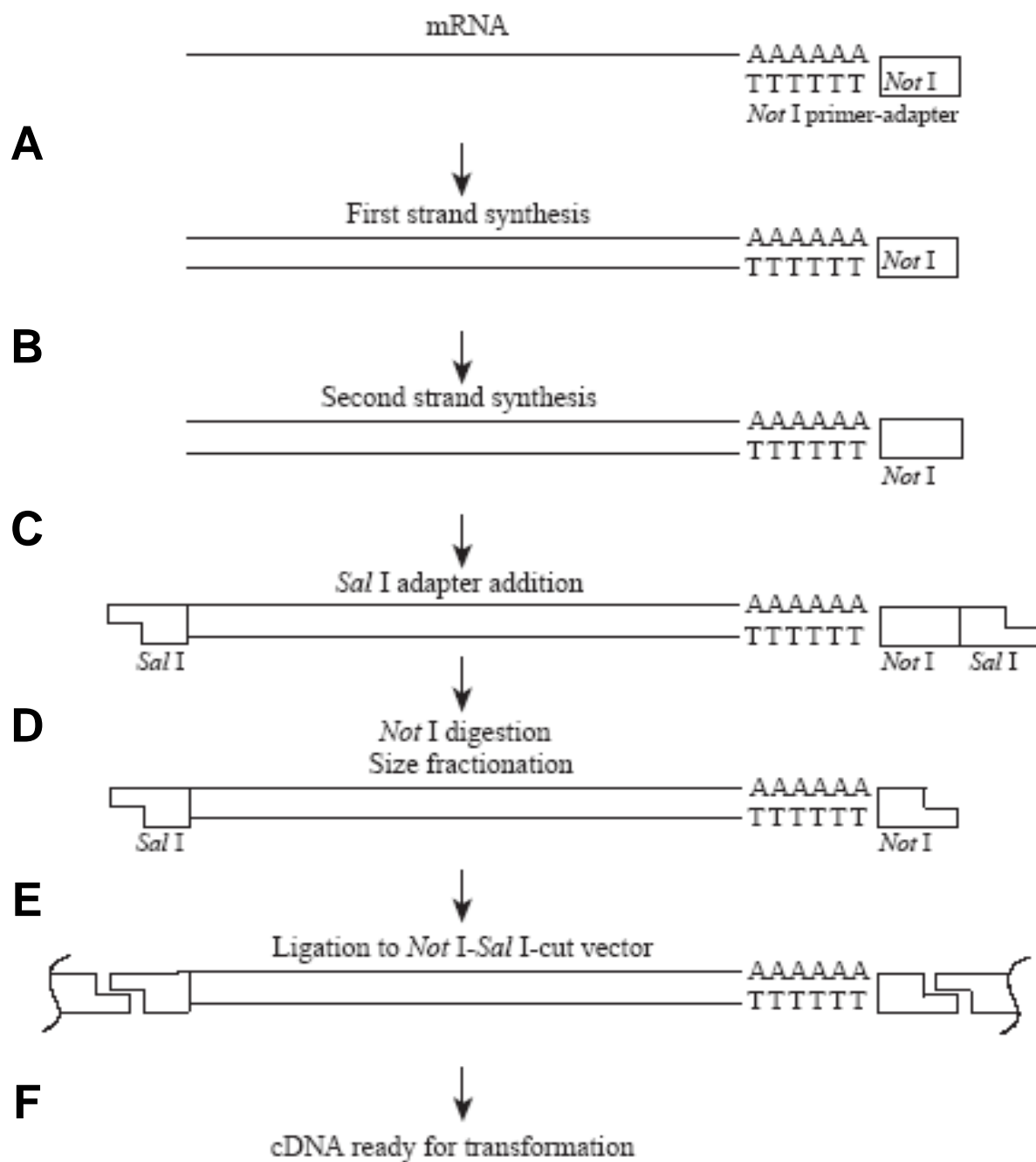
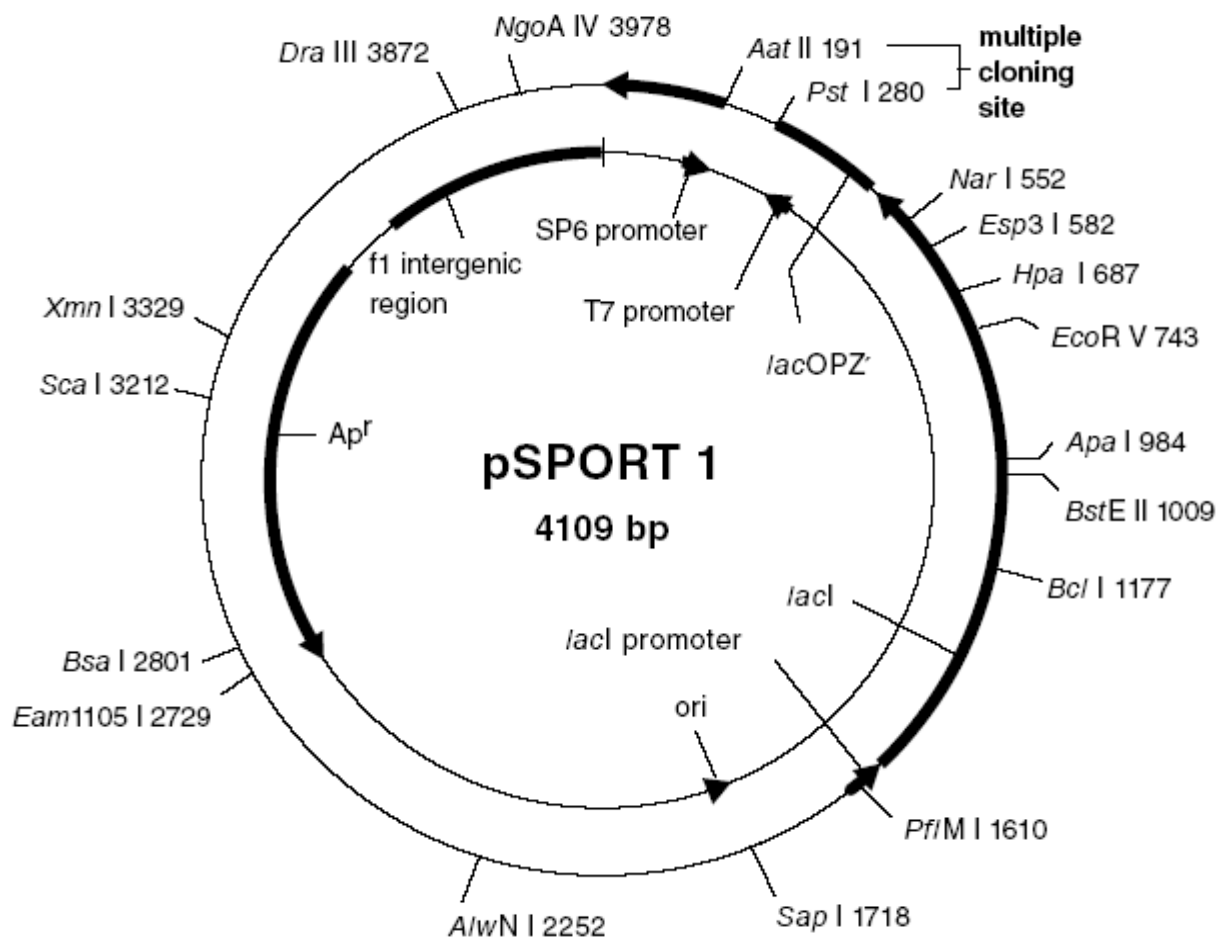
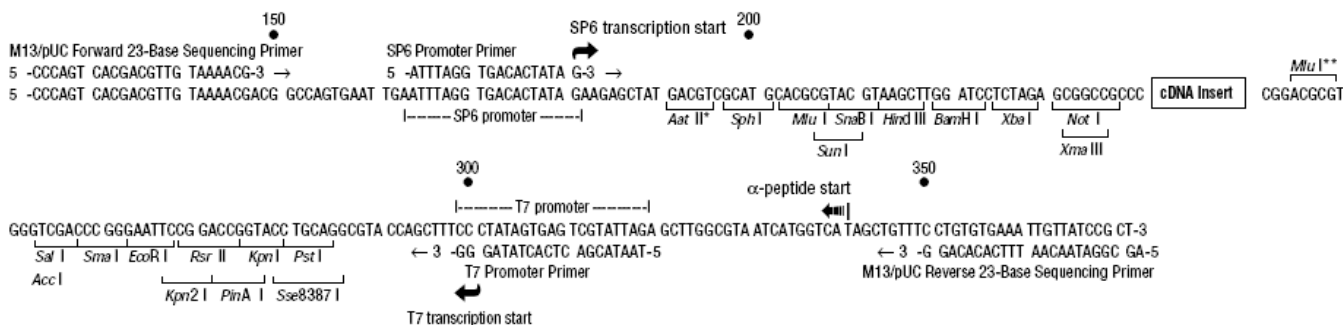


Figura 2.3 – Etapas de construção de uma biblioteca de cDNA. (A) Síntese de cDNA realizada por uma transcriptase reversa, iniciada no oligonucleotídeo dT que anela na cauda poliA do mRNA. (B) Síntese da segunda fita do cDNA. (C) Adição do adaptador *Sal*I em ambas extremidades. (D) Digestão da extremidade 3' com *Not*I e separação dos fragmentos por tamanho. (E) Ligação do cDNA no vetor plasmidial pSPORT-1. (F) Transformação de bactérias competentes por eletroporação.

A**B**

pSPORT 1 multiple cloning site and primer binding regions: 125-372



*Requires increased enzyme:DNA for complete digestion.

* The *Mlu* I restriction site is contained within the *Sa*I adapter introduced into the vector upon ligation of the cDNA insert.

Figura 2.4 – Representação do vetor plasmidial pSPORT-1. (A) Mapa circular do vetor plasmidial detalhando suas características básicas. (B) Detalhamento do sítio múltiplo de clonagem, flanqueado por sítios para pareamento de oligonucleotídeos para a reação de seqüenciamento, SP6 na extremidade 3' do cDNA e T7 na extremidade 5' do cDNA.

fluorescência. As ESTs foram filtradas para a remoção de seqüências do vetor plasmidial (pSPORT-1), de genes bacterianos e seqüências de RNA ribossomal e transportador usando o Cross Match (Green, 1996). O padrão arbitrário de qualidade adotado para a aprovação das ESTs foi de seqüências com pelo menos 100 nucleotídeos apresentando pontuação PHRED maior que 20, sendo então descartadas de outras análises as demais. As ESTs resultantes do controle de qualidade e do filtro foram armazenadas em no banco de dados da biblioteca de ESTs de larvas L2 de *M. incognita*. As seqüências foram então alinhadas para determinação de eventuais sobreposições de seqüências entre ESTs com o programa CAP3 (Huang e Madan, 1999) para formação de grupos. No caso, as seqüências contíguas formam determinado grupo denominado contig, que deve corresponder a um único transcrito. Já aquelas ESTs que não alinharam entre si, permanecendo sozinhas, são denominadas de singulares ou singlets.

Os contigs e singlets foram pré-annotados usando um “pipeline” que inclui o processamento automático para processamento do BLASTx (Altschul *et al.*, 1997). A análise do BLASTx foi realizada usando parâmetros “default” para comparação de seqüências com três bancos de dados: GenBank nr (non-redundant GenBank CDS; www.ncbi.nlm.nih.gov), KOG (Tatusov *et al.*, 2003) e swiss-prot release 44 (us.expasy.org/sprot/).

Uma análise adicional foi realizada comparando as ESTs de *M. incognita* com as seqüências nucleotídicas pertencentes aos gêneros Heterodera (NCBI TaxID 34509) e Globodera (NCBI TaxID 31242), assim como de *Caenorhabditis elegans* CDS. Todas seqüências foram recuperadas do NCBI Tax browser (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/). O programa tBLASTx foi utilizado para comparar cada seqüência de *M. incognita* com as seqüências dos nematóides acima mencionados. Todas análises computacionais foram realizadas em computadores com processadores Intel (P4 e Xeon) usando o sistema operacional Fedora Linux. Os “scripts” e programas foram desenvolvidos em linguagem PERL e a página da internet em Javascript e html. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Bioinformática (Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia), em colaboração com os pesquisadores Dr. Felipe Santos e Dra. Natália F. Martins e no Laboratório de Biologia Molecular (UnB), em colaboração com o professor Dr. Marcelo M. Brígido.

2.3. Resultados e Discussão.

2.3.1. Agrupamento de ESTs da biblioteca de cDNA de larvas L2.

A partir da construção e seqüenciamento da biblioteca de cDNAs, foram obtidas 2.880 seqüências de ESTs totais, que é o dado bruto para análise computacional. Inicialmente, as seqüências foram filtradas eletronicamente para eliminação de seqüências do pSPORT-1 (vetor plasmidial sem inserto), de rRNA (remanescente da purificação do mRNA), arraste de nucleotídeos (problema na separação dos fragmentos nos capilares) e baixa qualidade de seqüenciamento (valor de PHRED inferior a 20).

As seqüências remanescentes, de melhor qualidade e livres de vetor ou rRNA, foram submetidas a agrupamento (clusterização) para que seqüências contíguas fossem aglutinadas em seqüências consenso ou contig. Das seqüências incluídas nas análises, 1506 ESTs não sobrepuseram entre si, ou seja, são seqüências singulares ou singlets (**Figura 2.5**), e as demais agruparam formando contigs (**Figura 2.6**). Assim, o agrupamento uniu, por sobreposição, 631 ESTs em 197 contigs (**Figura 2.7**). Um número pequeno de contigs apresentou maior freqüência de ESTs, provavelmente sendo os genes superexpressos em larva L2. Grande parte dos contigs (138) foi formada com apenas duas ESTs, não se correlacionado fortemente com alta expressão. Por outro lado, outros contigs com 11-45 ESTs já sugerem alta taxa de expressão na fase infectiva, com maior representatividade. Hibridizações em lâminas (“DNA chip”) nos ensaios de Microarranjo (“microarray”) estão em andamento para determinação do padrão de expressão das ESTs dessa biblioteca juntamente com ESTs disponíveis no dbEST. Os resultados mais relevantes serão validados por RT-PCR quantitativo em tempo real.

2.3.2. Anotação gênica e classificação funcional dos grupos de ESTs.

Os 1.703 grupos de ESTs (singlets mais contigs) foram comparadas com o banco de dados pelo BLASTx para a anotação gênica. A anotação gênica foi feita por comparação das seis seqüências peptídicas previstas, geradas de cada grupo de ESTs, com as seqüências peptídicas do banco de dados não-reduntante (nr). As ESTs foram separadas em grupos filogenéticos conforme os melhores alinhamentos do BLASTx (**Figura 2.8**): “NFG” (gênero *Meloidogyne*) com 1%; “NFC” (gêneros *Heterodera* e *Globodera*) com 2%; “Outros Nematóides” (a maioria de *C. elegans*) com 50%; “Exceto Nematóides” (qualquer espécie exceto nematóides) com 32%; e “Desconhecido” (proteínas pioneiras) com 14%. Essas proporções são muito próximas

Tamanho dos Singlets

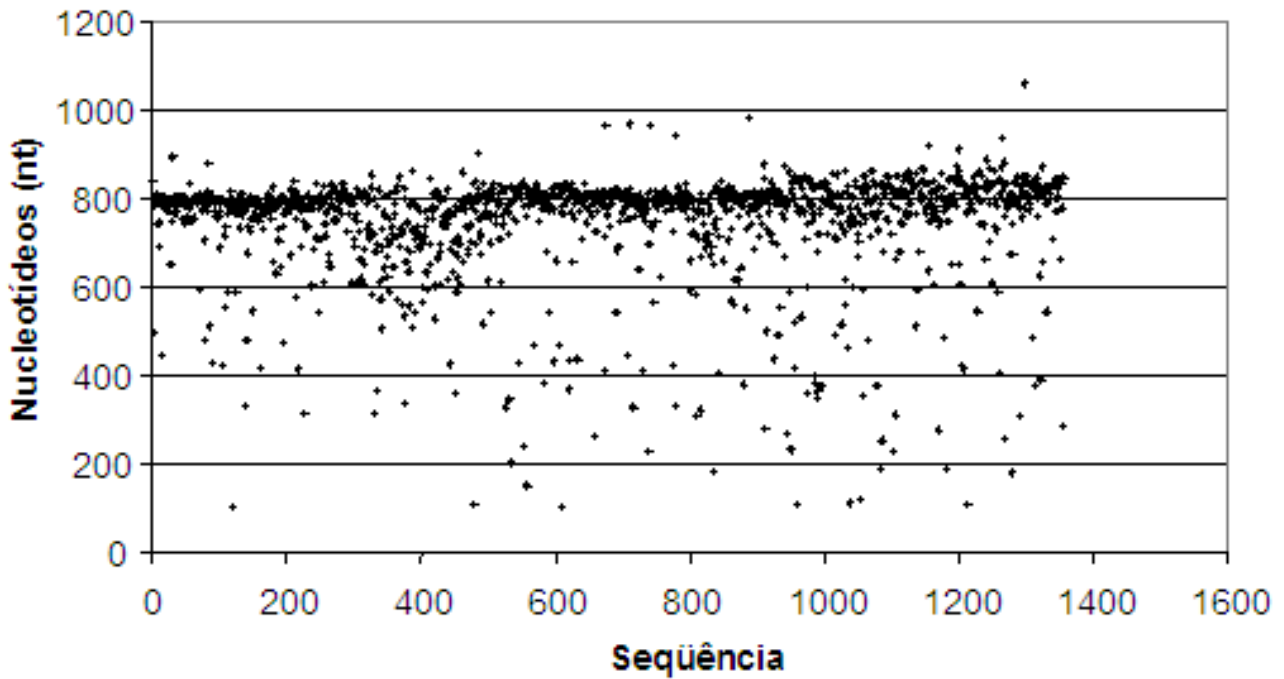


Figura 2.5 – Gráfico dos tamanhos das ESTs singlets. Cada ponto representa o tamanho em nucleotídeos seqüenciados e livres de vetor pSPORT-1 das EST únicas ou solteiras. Dessa forma, o tamanho médio de 800 nucleotídeos indica alta qualidade de confecção da biblioteca de cDNAs, assim como de seqüenciamento dessas ESTs.

Tamanho dos Contigs

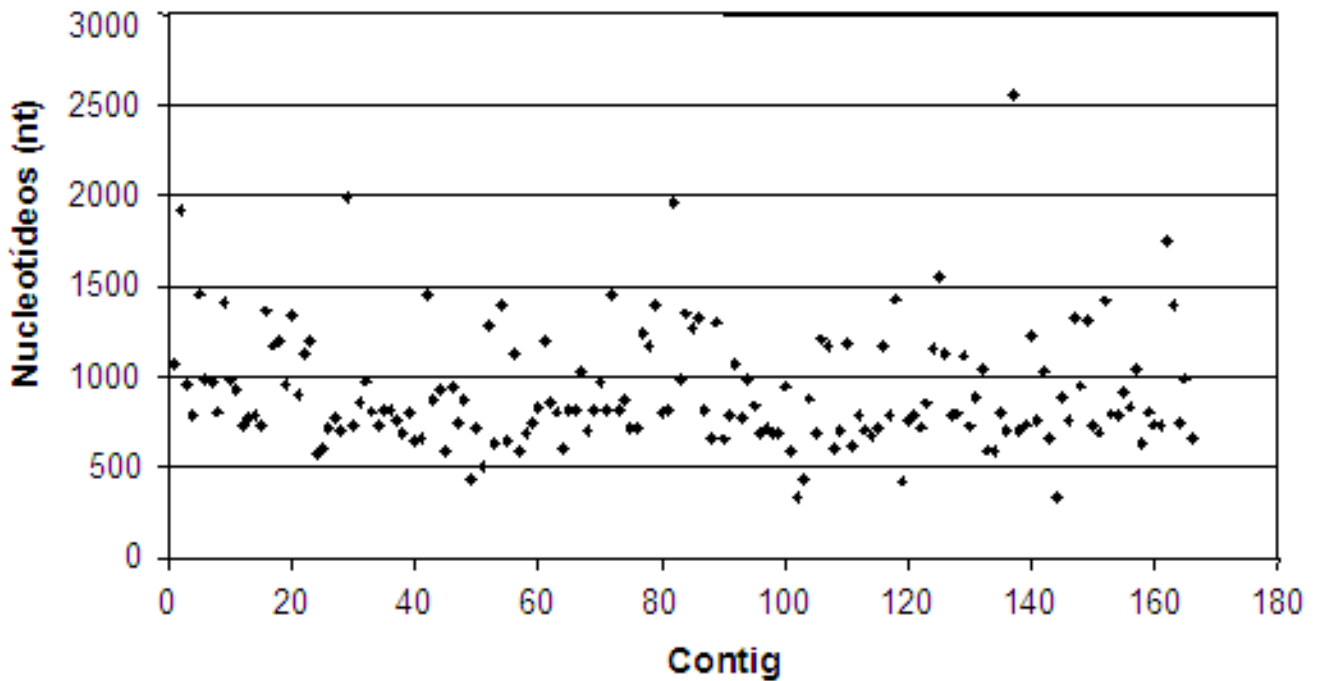


Figura 2.6 – Distribuição dos contigs por tamanho de seqüência. Os contigs formados por sobreposição de ESTs contíguas (agrupamento), correspondente a cDNAs individuais, eliminando a redundância de análise, sugerindo os níveis de expressão e aumentando a qualidade da comparação com o banco de dados, por usar uma seqüência consenso maior e portanto mais informativa.

Distribuição das ESTs em Contigs

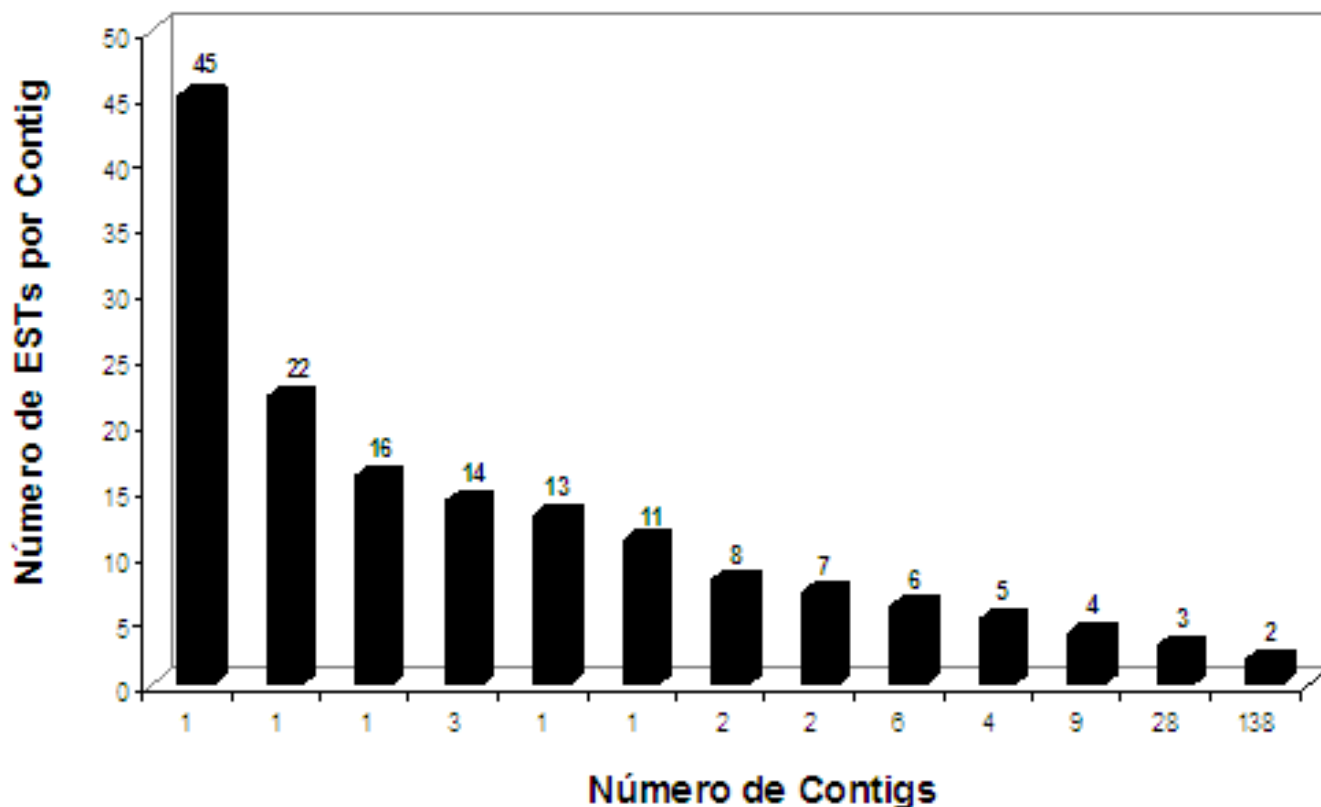


Figura 2.7 – Gráfico em barras representativo do agrupamento. Do total de 2.137 ESTs aceitas pelo padrão de qualidade e eliminação de vetor e rRNA, 631 ESTs se sobrepuseram com outras seqüências da biblioteca formando seqüências contíguas ou contig. Dessa forma, essas ESTs foram reduzidas a 197 contigs. O somatório do eixo das abscissas é 197, que é o número de contigs formados. Já o somatório do produto entre o eixo das ordenadas vezes o número de contigs é 631, que é o número de ESTs formadoras de contigs (**Tabela 2.3**).

Comparação das ESTs com o banco de dados

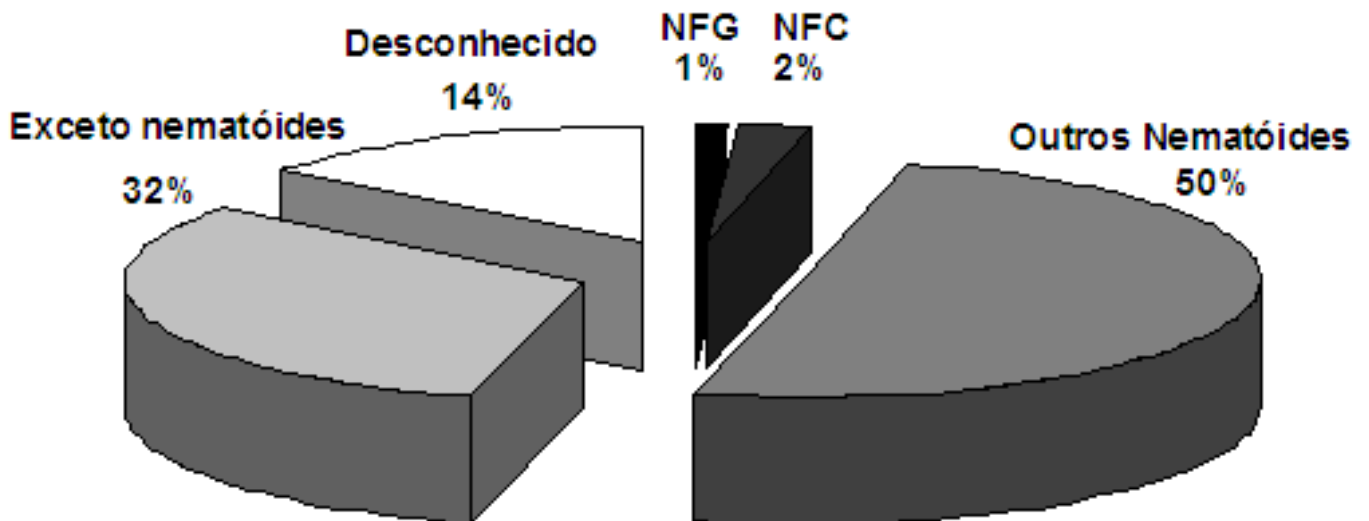


Figura 2.8 – Gráfico de setores do resultado do BLASTx. Distribuição das 1.703 ESTs anotadas conforme melhores resultados de alinhamento com o GenBank usando o programa BLASTx. Do total 1% alinha com seqüências apenas de nematóides do mesmo gênero, *Meloidogyne* (NFG), 2% alinham com seqüências de nematóides formadores de cisto, *Globodera* e *Heterodera* (esses juntos estão representados na **Tabela 2.1**), 50% alinham com seqüências do filo Nematoda exceto da ordem Tylenchida, 32% alinham com outros organismos (deste grupo, as que alinham com bactéria estão destacadas na **Tabela 2.2**) e 14% não alinham com seqüências peptídicas conhecidas.

das encontradas em uma biblioteca de L2 de *M. incognita* previamente publicada (Mccarter *et al.*, 2003), mostrando que a frequência de grupos novos ainda justifica a construção de novas bibliotecas de ESTs.

Os grupos “NFG” e “NFC” (**Tabela 2.1**), de três gêneros que compartilham estratégias de parasitismo e que são relativamente relacionados filogeneticamente (ordem Tylenchida), contêm uma fração rica em genes de parasitismo previamente caracterizados (Parkinson *et al.*, 2004b; Wylie *et al.*, 2004). Como normalmente muitos genes de parasitismo codificam proteínas completamente desconhecidas (Vanholme *et al.*, 2004), imagina-se que alguns genes de parasitismo ainda não caracterizados estejam no grupo “Desconhecido”.

Para identificar os genes que provavelmente foram adquiridos por transferência horizontal gênica, as ESTs do grupo “Exceto Nematóides” foram novamente separadas em subgrupos: “Bactéria” (31 ESTs); “Protozoa” (16 ESTs); “Fungi” (6 ESTs); e “Plantae” (13 ESTs). Foram priorizadas as ESTs com alta identidade às proteínas de bactérias (**Tabela 2.2**), onde o evento de THG é mais estudado (Bird *et al.*, 2003). A origem helmíntica de cada gene pode ser sugerida, mas sua validação será realizada por hibridização *in situ*, detecção de íntrons (PCR ou biblioteca de gDNA) e/ou poliA.

As análises de códons preferenciais (viés de códon, ou “codon usage”), percentual GC e/ou presença de SL infelizmente não são bons indicadores (Scholl *et al.*, 2003). Algumas ESTs são semelhantes as proteínas de plantas (grupo “Plantae”), mas, provavelmente, sem relação com THG. Se essas ESTs realmente forem do nematóide, mas não um contaminante de tomateiros, podem apresentar semelhanças com proteínas vegetais por convergência evolutiva, principalmente para fatores de transcrição, enzimas da via de hormônios, proteassomas, proteínas de estresse, constituintes de vias de transdução de sinais e hormônios peptídicos.

Do grupo “Outros Nematóides” com metade das ESTs, um subgrupo (385 ESTs) que apresenta alta identidade com proteínas de *C. elegans* (e-value de 0 a $1e-5$) foi separado para análise mais detalhadas. Além do genoma completo, inúmeros trabalhos de genética reversa por transformação de nematóide ou por RNAi têm sido realizados para a determinação de fenótipo. Devido à relativa simplicidade do silenciamento gênico em *C. elegans*, a técnica de RNAi é atualmente aplicada em escala genômica. Dessa forma, inúmeros fenótipos letais foram associados a genes específicos, representando uma coleção de excelentes alvos para o controle de nematóides (Schwarz *et al.*, 2006).

Tabela 2.1.

Grupos de ESTs similares à proteínas de NFG e NFC (Tylenchida).

EST	pb	Ident.	E-value	Resultado do BLASTx
3	1171	87%	0	gb AAO49799.1 arginine kinase [Heterodera glycines]
14	1193	84%	e-171	gb AAD45868.1 beta-1,4-endoglucanase [Meloidogyne incognita]
2	971	86%	e-137	gb AAC79129.1 glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase [Globodera rostochiensis]
1	780	91%	e-132	gb AAF37276.1 xylanase [Meloidogyne incognita]
3	807	99%	e-130	emb CAC28353.1 putative calponin [Meloidogyne incognita]
5	816	99%	e-129	emb CAC28353.1 putative calponin [Meloidogyne incognita]
1	778	92%	e-124	gb AAG47837.2 actin 1 [Heterodera glycines]
3	1419	60%	e-123	gb AAD45868.1 beta-1,4-endoglucanase [Meloidogyne incognita]
3	1122	82%	e-121	gb AAN78300.1 heat shock protein 70 A [Heterodera glycines]
1	781	90%	e-118	gb AAL40719.1 14-3-3 product [Meloidogyne incognita]
1	748	88%	e-118	gb AAC79129.1 glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase [Globodera rostochiensis]
8	797	84%	e-117	gb AAO49799.1 arginine kinase [Heterodera glycines]
1	812	87%	e-115	gb AAC79129.1 glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase [Globodera rostochiensis]
2	706	84%	e-109	gb AAO14563.2 Hsp90 [Heterodera glycines]
3	857	93%	e-109	gb AAO14563.2 Hsp90 [Heterodera glycines]
1	766	76%	e-108	gb AAC72366.2 guanylyl cyclase [Heterodera glycines]
1	813	76%	e-108	emb CAD38523.1 secreted glutathione peroxidase [Globodera rostochiensis]
2	835	84%	e-104	gb AAO49799.1 arginine kinase [Heterodera glycines]
1	668	93%	e-104	gb AAN78300.1 heat shock protein 70 A [Heterodera glycines]
1	753	77%	e-103	gb AAD45868.1 beta-1,4-endoglucanase [Meloidogyne incognita]
5	683	99%	e-102	gb AAC47533.1 calponin homolog MjCAP-1 [Meloidogyne javanica]
2	699	84%	e-101	gb AAG47838.2 aldolase [Heterodera glycines]
1	745	74%	5,00E-89	emb CAD38523.1 secreted glutathione peroxidase [Globodera rostochiensis]
2	739	78%	1,00E-87	emb CAB48391.1 peroxiredoxin [Globodera rostochiensis]
2	1391	93%	7,00E-86	gb AAL40718.1 myosin regulatory light chain [Meloidogyne incognita]
1	703	98%	2,00E-81	gb AAC47533.1 calponin homolog MjCAP-1 [Meloidogyne javanica]
1	738	54%	4,00E-75	gb AAO92288.2 peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase [Heterodera glycines]
1	815	63%	4,00E-75	gb AAG21336.2 hypothetical esophageal gland cell secretory protein 6 [Heterodera glycines]
1	746	62%	1,00E-70	gb AAK94486.1 putative glutathione reductase [Heterodera glycines]
1	815	55%	5,00E-68	gb AAO92288.2 peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase [Heterodera glycines]
4	734	71%	5,00E-65	emb CAA70693.1 cathepsin L-like cysteine proteinase [Heterodera glycines]
1	720	57%	3,00E-64	gb AAQ10016.1 putative esophageal gland cell secretory protein 2 [Meloidogyne incognita]
1	863	54%	2,00E-62	gb AAQ10018.1 putative esophageal gland cell secretory protein 4 [Meloidogyne incognita]
3	733	52%	1,00E-61	gb AAQ09004.1 pectate lyase [Meloidogyne incognita]
1	830	51%	1,00E-61	gb AAC72366.2 guanylyl cyclase [Heterodera glycines]
2	686	68%	8,00E-58	emb CAA70477.2 SEC-2 protein [Globodera pallida]
1	561	91%	3,00E-57	gb AAO49799.1 arginine kinase [Heterodera glycines]
1	804	50%	6,00E-55	gb AAQ12016.1 tropomyosin [Heterodera glycines]
1	662	68%	4,00E-54	gb AAF76926.1 hypothetical esophageal gland cell secretory protein 12 [Heterodera glycines]
1	727	68%	3,00E-53	emb CAA70693.1 cathepsin L-like cysteine proteinase [Heterodera glycines]
1	690	84%	9,00E-52	gb AAK21882.1 beta-1,4-endoglucanase [Meloidogyne incognita]
1	782	77%	3,00E-46	gb AAC47533.1 calponin homolog MjCAP-1 [Meloidogyne javanica]
1	736	48%	3,00E-41	gb AAK60209.1 vap-1 [Heterodera glycines]
1	802	66%	5,00E-41	gb AAM93256.1 heat shock protein 70-C [Heterodera glycines]
1	744	42%	4,00E-34	gb AAK21961.1 secreted venom allergen-like protein vap2 [Heterodera glycines]

Tabela 2.1. Continuação.

EST	pb	Ident.	E-value	Resultado do BLASTx
2	728	33%	2,00E-29	gb AAK60209.1 vap-1 [Heterodera glycines]
2	710	33%	3,00E-29	gb AAK60209.1 vap-1 [Heterodera glycines]
1	501	74%	4,00E-25	emb CAC33830.1 FMRFamide-related peptide [Globodera pallida]
1	796	52%	4,00E-24	emb CAC83611.1 EXPB1 protein [Globodera rostochiensis]
3	712	78%	3,00E-22	emb CAC36150.1 FMRFamide-related peptide precursor [Globodera pallida]
2	758	33%	3,00E-17	gb AAK08974.1 pectinase precursor [Heterodera glycines]
1	792	46%	2,00E-09	gb AAK21961.1 secreted venom allergen-like protein vap2 [Heterodera glycines]
1	790	53%	2,00E-09	gb AAK21883.2 beta-1,4-endoglucanase [Meloidogyne incognita]
1	816	36%	1,00E-04	gb AAD01511.1 secreted protein MSP-1 [Meloidogyne incognita]

Tabela 2.2.**Grupos de ESTs que demonstram alta identidade com proteínas bacterianas.**

EST	pb	Ident.	E-value	Resultado do BLASTx
1	833	70%	e-102	ref ZP_00084958.1 Serine phosphatase RsbU, regulator of sigma subunit [Pseudomonas fluorescens]
1	763	88%	4,00E-97	ref NP_880934.1 putative ABC transport ATP-binding subunit [Bordetella pertussisTohama]
1	838	90%	3,00E-93	ref ZP_00084952.1 Flagellar biosynthesis secretory pathway lipoprotein [Pseudomonas fluorescens]
1	832	74%	2,00E-91	ref NP_886229.1 hypothetical protein BPP4091 [Bordetella parapertussis]
1	753	77%	5,00E-85	gb AAQ14856.1 RpoD [Pseudomonas fluorescens]
1	792	64%	4,00E-82	ref NP_742779.1 branched-chain amino acid ABC transporter, permease protein [Pseudomonas putida]
1	829	65%	5,00E-79	ref ZP_00092360.1 7,8-dihydro-6-hydroxymethylpterin-pyrophosphokinase [Azotobacter vinelandii]
1	813	84%	6,00E-71	ref ZP_00053938.1 Methylmalonyl-CoA mutase (cobalamin-binding) [Magnetospirillum magnetotacticum]
1	783	65%	2,00E-65	ref ZP_00092801.1 COG0477: Permeases of the major facilitator superfamily [Azotobacter vinelandii]
1	713	91%	5,00E-58	ref NP_542832.1 putative transcriptional regulator protein [Pseudomonas putida]
1	783	86%	9,00E-57	ref NP_789972.1 ATP-dependent DNA helicase Rep [Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000]
1	799	56%	3,00E-55	ref NP_745088.1 sensor histidine kinase [Pseudomonas putida KT2440]
1	836	91%	1,00E-53	ref ZP_00087454.1 AraC-type DNA-binding domain-containing proteins [Pseudomonas fluorescens]
1	788	56%	5,00E-50	ref NP_436657.1 hypothetical sugar transferase protein [Sinorhizobium meliloti]
2	811	45%	9,00E-47	ref NP_102448.1 probable sugar transferase [Mesorhizobium loti]
1	822	52%	3,00E-44	ref NP_599433.1 permease of the major facilitator superfamily [Corynebacterium glutamicum]
1	681	77%	5,00E-37	ref ZP_00087861.1 Phosphoglycerol transferase and related proteins [Pseudomonas fluorescens]
1	308	68%	3,00E-35	ref ZP_00140007.1 Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport [Pseudomonas aeruginosa]
1	269	66%	4,00E-30	ref NP_746256.1 outer membrane siderophore receptor, putative [Pseudomonas putidaKT2440]
1	768	37%	2,00E-24	ref NP_296314.1 oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase [Deinococcus radiodurans]
1	775	38%	1,00E-19	ref NP_250765.1 hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa PA01]
1	809	52%	6,00E-18	ref NP_640674.1 transcriptional regulator merR family [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306]
1	823	46%	5,00E-16	gb AAF74348.1 putative sugar permease [Lactobacillus casei]
1	805	37%	4,00E-15	ref NP_747144.1 conserved hypothetical protein [Pseudomonas putida KT2440]
1	796	63%	1,00E-14	ref NP_661733.1 glycosyl transferase, group 1 family protein [Chlorobium tepidum]
1	784	34%	9,00E-14	ref NP_834485.1 hydrolase (HAD superfamily) [Bacillus cereus ATCC 14579]
1	314	80%	7,00E-11	ref NP_743288.1 carboxylesterase [Pseudomonas putida KT2440]
1	682	26%	3,00E-09	ref NP_622646.1 conserved hypothetical protein [Thermoanaerobacter tengcongensis]
1	687	32%	1,00E-06	ref NP_212747.1 ATP-dependent protease LA (lon-2) [Borrelia burgdorferi]
1	721	30%	5,00E-05	ref NP_639024.1 D-amino acid oxidase [Xanthomonas campestris pv. campestris str ATCC 33913]

Tabela 2.3.
Grupos de ESTs com maior abundância na larva L2 infectiva.

EST	pb	Ident.	E-value	Resultado do BLASTx
53	1986		>1	no hits
22	1962	36%	0.84	gb AAG12187.2 cytochrome c oxidase subunit 1 [Schistosoma mekongi]
15	2553	23%	1,00E-07	ref NP_494817.2 prion-like Q/N-rich domain protein (57.2 kD) [Caenorhabditis elegans]
14	1390	99%	0	ref NP_508841.1 actin (41.8 kD) (act-4) [Caenorhabditis elegans]
14	1193	84%	e-171	gb AAD45868.1 beta-1,4-endoglucanase [Meloidogyne incognita]
14	1149			no hits
12	1034			no hits
10	1916	63%	e-162	gb AAH03283.1 Poly(A) binding protein, cytoplasmic 4, isoform 1 [Mus musculus]
10	1429	51%	6,00E-93	ref NP_491475.2 NHL repeat (38.6 kD) (1F479) [Caenorhabditis elegans]
9	977	82%	e-113	ref NP_499782.1 ADP/ATP translocase of mitochondrial (33.0 kD) [Caenorhabditis elegans]
8	797	84%	e-117	gb AAO49799.1 arginine kinase [Heterodera glycines]
6	1458	89%	0	ref NP_498520.1 translation Elongation FacTor (50.7 kD) (eft-3) [Caenorhabditis elegans]
6	1129	28%	6,00E-13	emb CAA76563.1 preprocathepsin D [Dictyostelium discoideum]

Os grupos de ESTs mais abundantes (**Tabela 2.3**) sugerem papel importante nas interações parasitárias, como componentes de vias de transdução, reguladores de tradução, enzimas digestivas. Curiosamente os e-values variam de zero a maior que um. Os 14% (**Figura 2.8**) que não alinham com proteínas do banco de dados (no hits) podem codificar proteínas pioneiras, ou adicionalmente, não traduzir proteínas, sendo funcionais como microRNA, modulando a expressão de genes do hospedeiro.

Todos grupos também foram organizados funcionalmente, a partir da determinação das classes de ontologia gênica (“Gene Ontology”, GO). Partindo do total de 1703 grupos de ESTs (contigs e singlets), as ESTs com os melhores alinhamentos no BLASTx (“cut off” e-value < 10⁻¹⁰) foram selecionadas (944 ESTs) e classificadas em categorias funcionais KOG (Tatusov *et al.*, 2003), para predição de função das proteínas (**Figura 2.9**). A partir dessa análise é possível traçar um perfil metabólico prévio para posterior análise individual de genes envolvidos com processo vitais ou com o parasitismo.

2.4. Conclusão.

Considerando que o entendimento da complexa interação molecular planta-patógeno seja fundamental para o desenvolvimento de estratégias de intervenção do parasitismo, uma biblioteca de ESTs foi construída e analisada. Outras análises são necessárias para definir completamente os alvos ideais para etapa de validação.

Classificação KOG das ESTs

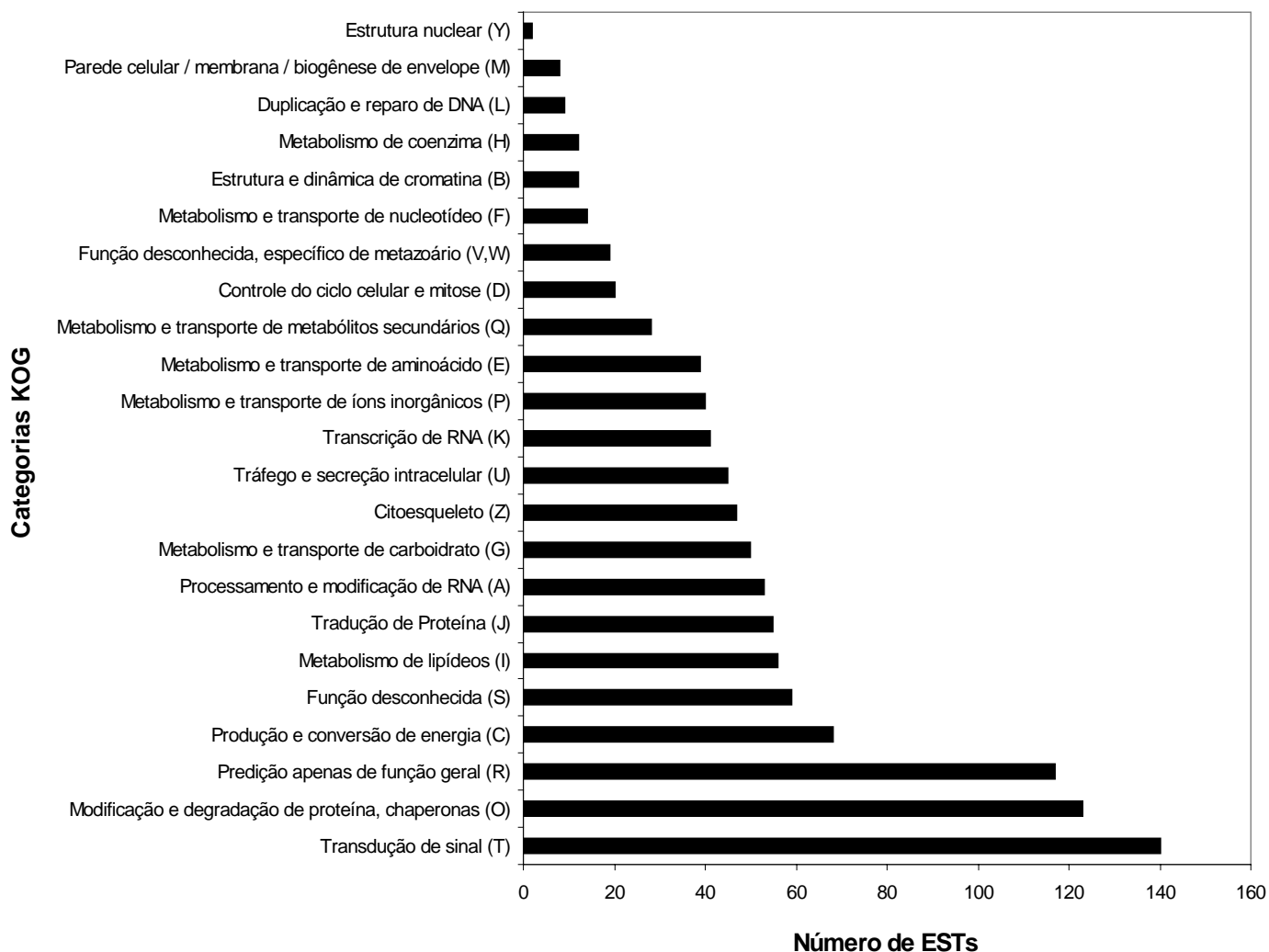


Figura 2.9 – Gráfico em barras das categorias KOG. Após seleção de qualidade, 944 grupos de ESTs foram classificadas conforme os grupos de ortologia. As barras denotam números absolutos de grupos de ESTs dentro de cada categoria KOG. As três categorias mais abundantes encontradas foram: Transdução de sinal; Modificação e/ou degradação de proteínas; e Função predita. Outras categorias merecem destaque por associação a genes de parasitismo como: Transcrição de RNA e Controle do ciclo celular. Até certo ponto esperado, a categoria Metabolismo de lipídeos apresentou muitos integrantes, já que larva L2 não se alimenta e seu estoque energético é de gotas de lipídeo na cauda.

Como muitos genes de parasitismo foram provavelmente adquiridos por THG, parte das análises foram direcionadas para a listagem de genes putativos de THG. Sugere-se que esses genes de THG sejam alvos preferenciais devido à sua importância predita no parasitismo e maior biossegurança, por ser direcionado a genes mais próximos dos bacterianos. Será realizada uma análise de mutações sinônimas e não sinônimas para indicação de provável origem. Hibridização *in situ* em larga escala definitivamente comprovará os eventos de THG preditos. Vários alvos interessantes podem ser selecionados, mas trabalhos de validação são fundamentais.

Outra abordagem em andamento visa a classificação de fenótipos letais, previamente detectados por RNAi em *C. elegans*, com o objetivo de controlar fitonematóides. Algumas demonstrações recentes de RNAi *in planta* geram enormes expectativas em relação à solução ou amenização do problema de fitonematóides na agricultura mundial. Da mesma forma, é uma questão prioritária de saúde humana e animal controlar nematóides parasitas de animais. Métodos de produção e purificação de dsRNA em larga escala, talvez em plantas transgênicas, podem representar uma nova era de fármacos baseados em RNAi.

2.5. Perspectivas.

Numa próxima etapa, membranas para microarranjo serão preparadas para hibridização com sondas de RNA de diferentes fases de desenvolvimento. Alternativamente, lâminas de DNA com cDNA dessa biblioteca e de outras públicas poderão ser utilizadas para microarranjo em escala maior de análise. Esses dados permitirão a determinação da expressão diferencial dos produtos gênicos para correlação com estabelecimento e/ou manutenção do parasitismo. O estudo individual de proteínas pioneiras será realizado por transformação de plantas modelo para avaliação do fenótipo induzido *in planta*. Os testes já se iniciaram com proteínas pioneiras previamente identificadas (Huang *et al.*, 2003), pelo aluno de doutorado Djair Souza, em colaboração. Após a determinação de alvos potenciais, bioensaios *in vivo* e *in planta* baseados em RNAi serão realizados para avaliar a função dos genes e o uso potencial no melhoramento de plantas de interesse agrônomico (ensaio em fase de implantação e teste no LIMPP).

IV – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, P., FAVERY, B., ROSSO, M. N. e CASTAGNONE-SERENO, P. **Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction.** *Molecular Plant Pathology*, v.4, n.4, JUL, p.217-224. 2003.
- ABOOBAKER, A. A. e BLAXTER, M. L. **Use of RNA interference to investigate gene function in the human filarial nematode parasite *Brugia malayi*.** *Mol Biochem Parasitol*, v.129, n.1, Jun, p.41-51. 2003.
- AKI, T., MIZUKAMI, Y., OKA, Y., YAMAGUCHI, K., UEMURA, K., FUJIMIYA, T. e YOSHIDA, K. **Phosphoinositide 3-kinase accelerates necrotic cell death during hypoxia.** *Biochem J*, v.358, n.Pt 2, Sep 1, p.481-7. 2001.
- AKI, T., YAMAGUCHI, K., FUJIMIYA, T. e MIZUKAMI, Y. **Phosphoinositide 3-kinase accelerates autophagic cell death during glucose deprivation in the rat cardiomyocyte-derived cell line H9c2.** *Oncogene*, v.22, n.52, Nov 20, p.8529-35. 2003.
- AKI, T., YOSHIDA, K. e FUJIMIYA, T. **Phosphoinositide 3-kinase accelerates calpain-dependent proteolysis of fodrin during hypoxic cell death.** *J Biochem (Tokyo)*, v.132, n.6, Dec, p.921-6. 2002.
- ALDER, M. N., DAMES, S., GAUDET, J. e MANGO, S. E. **Gene silencing in *Caenorhabditis elegans* by transitive RNA interference.** *Rna*, v.9, n.1, Jan, p.25-32. 2003.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. e LIPMAN, D. J. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res*, v.25, n.17, Sep 1, p.3389-402. 1997.
- ARTAL-SANZ, M., SAMARA, C., SYNTICHAKI, P. e TAVERNARAKIS, N. **Lysosomal biogenesis and function is critical for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*.** *J Cell Biol*, v.173, n.2, Apr 24, p.231-9. 2006.
- ARTAL-SANZ, M. e TAVERNARAKIS, N. **Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration.** *FEBS Lett*, v.579, n.15, Jun 13, p.3287-96. 2005.
- ASOJO, O. A., GOUD, G., DHAR, K., LOUKAS, A., ZHAN, B., DEUMIC, V., LIU, S., BORGSTAHL, G. E. e HOTEZ, P. J. **X-ray structure of Na-ASP-2, a pathogenesis-related-1 protein from the nematode parasite, *Necator americanus*, and a vaccine antigen for human hookworm infection.** *J Mol Biol*, v.346, n.3, Feb 25, p.801-14. 2005a.
- ASOJO, O. A., LOUKAS, A., INAN, M., BARENT, R., HUANG, J., PLANTZ, B., SWANSON, A., GOUTHRO, M., MEAGHER, M. M. e HOTEZ, P. J. **Crystallization and preliminary X-ray analysis of Na-ASP-1, a multi-domain pathogenesis-related-1 protein from the human hookworm parasite *Necator***

americanus. Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun, v.61, n.Pt 4, Apr 1, p.391-4. 2005b.

- ATKINSON, H. J., GREEN, J., COWGILL, S. e LEVESLEY, A. **The case for genetically modified crops with a poverty focus**. Trends Biotechnol, v.19, n.3, Mar, p.91-6. 2001.
- ATKINSON, H. J., URWIN, P. E. e MCPHERSON, M. J. **Engineering plants for nematode resistance**. Annu Rev Phytopathol, v.41, p.615-39. 2003.
- BAKHETIA, M., CHARLTON, W., ATKINSON, H. J. e MCPHERSON, M. J. **RNA interference of dual oxidase in the plant nematode *Meloidogyne incognita***. Mol Plant Microbe Interact, v.18, n.10, Oct, p.1099-106. 2005a.
- BAKHETIA, M., CHARLTON, W. L., URWIN, P. E., MCPHERSON, M. J. e ATKINSON, H. J. **RNA interference and plant parasitic nematodes**. Trends Plant Sci, v.10, n.8, Aug, p.362-7. 2005b.
- BALDWIN, J. G., NADLER, S. A. e ADAMS, B. J. **Evolution of plant parasitism among nematodes**. Annu Rev Phytopathol, v.42, p.83-105. 2004.
- BARGMANN, C. I. **High-throughput reverse genetics: RNAi screens in *Caenorhabditis elegans***. Genome Biol, v.2, n.2, p.REVIEWS1005. 2001.
- BARSTEAD, R. **Genome-wide RNAi**. Curr Opin Chem Biol, v.5, n.1, Feb, p.63-6. 2001.
- BEEK VAN DER, J. G. e KARSSSEN, G. **Interspecific hybridization of meiotic parthenogenetic *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax***. Phytopathology, v.87, p.1061-6. 1997.
- BEHM, C. A., BENDIG, M. M., MCCARTER, J. P. e SLUDER, A. E. **RNAi-based discovery and validation of new drug targets in filarial nematodes**. Trends Parasitol, v.21, n.3, Mar, p.97-100. 2005.
- BEYNON, R. J. e BOND, J. S. **Proteolytic enzymes: a practical approach**: IRL Press, Oxford University PressMolecular. 1994
- BI, X., YONG, A. P., ZHOU, J., GALL, C. M. e LYNCH, G. **Regionally selective changes in brain lysosomes occur in the transition from young adulthood to middle age in rats**. Neuroscience, v.97, n.2, p.395-404. 2000.
- BIRD, D. M. e KALOSHIAN, I. **Are roots special? Nematodes have their say**. Physiological and Molecular Plant Pathology, v.62, n.2, FEB, p.115-123. 2003.
- BIRD, D. M., OPPERMAN, C. H. e DAVIES, K. G. **Interactions between bacteria and plant-parasitic nematodes: now and then**. Int J Parasitol, v.33, n.11, Sep 30, p.1269-76. 2003.

- BLAIR, J. E. e HEDGES, S. B. **Molecular clocks do not support the Cambrian explosion.** Mol Biol Evol, v.22, p.387-90. 2005.
- BOSHER, J. M., DUFOURCQ, P., SOOKHAREEA, S. e LABOUESSE, M. **RNA interference can target pre-mRNA: consequences for gene expression in a *Caenorhabditis elegans* operon.** Genetics, v.153, n.3, Nov, p.1245-56. 1999.
- BOSHER, J. M. e LABOUESSE, M. **RNA interference: genetic wand and genetic watchdog.** Nat Cell Biol, v.2, n.2, Feb, p.E31-6. 2000.
- BRINDLEY, P. J., KALINNA, B. H., WONG, J. Y., BOGITSH, B. J., KING, L. T., SMYTH, D. J., VERITY, C. K., ABBENANTE, G., BRINKWORTH, R. I., FAIRLIE, D. P., SMYTHE, M. L., MILBURN, P. J., BIELEFELDT-OHMANN, H., ZHENG, Y. e MCMANUS, D. P. **Proteolysis of human hemoglobin by schistosome cathepsin D.** Mol Biochem Parasitol, v.112, n.1, Jan 15, p.103-12. 2001.
- BRINKWORTH, R. I., PROCIV, P., LOUKAS, A. e BRINDLEY, P. J. **Hemoglobin-degrading, aspartic proteases of blood-feeding parasites: substrate specificity revealed by homology models.** J Biol Chem, v.276, n.42, Oct 19, p.38844-51. 2001.
- BRITTON, C. e MURRAY, L. **A cathepsin L protease essential for *Caenorhabditis elegans* embryogenesis is functionally conserved in parasitic nematodes.** Mol Biochem Parasitol, v.122, n.1, Jun, p.21-33. 2002.
- BROWN, A., BURLEIGH, J. M., BILLETT, E. E. e PRITCHARD, D. I. **An initial characterization of the proteolytic enzymes secreted by the adult stage of the human hookworm *Necator americanus*.** Parasitology, v.110 (Pt 5), Jun, p.555-63. 1995.
- BROWN, A., GIROD, N., BILLETT, E. E. e PRITCHARD, D. I. ***Necator americanus* (human hookworm) aspartyl proteinases and digestion of skin macromolecules during skin penetration.** Am J Trop Med Hyg, v.60, n.5, May, p.840-7. 1999.
- CARGINALE, V., TRINCHELLA, F., CAPASSO, C., SCUDIERO, R., RIGGIO, M. e PARISI, E. **Adaptive evolution and functional divergence of pepsin gene family.** Gene, v.333, May 26, p.81-90. 2004.
- CARLINI, C. R. e GROSSI-DE-SA, M. F. **Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides.** Toxicon, v.40, n.11, Nov, p.1515-39. 2002.
- CASTAGNONE-SERENO, P., PIOTTE, C., UIJTHOF, J., ABAD, P. e WAJNBERG, E. **Phylogenetic relationships between amphimictic and parthenogenetic nematodes of the genus *Meloidogyne* as inferred from repetitive DNA analysis.** Heredity, v.70, p.195-204. 1993.

- CHAPPELL, C. L. e DRESDEN, M. H. ***Schistosoma mansoni*: proteinase activity of "hemoglobinase" from the digestive tract of adult worms.** Exp Parasitol, v.61, n.2, Apr, p.160-7. 1986.
- CHEN, Q., REHMAN, S., SMANT, G. e JONES, J. T. **Functional analysis of pathogenicity proteins of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* using RNAi.** Mol Plant Microbe Interact, v.18, n.7, Jul, p.621-5. 2005.
- COEGLAN, A. e WOLFE, K. H. **Origins of recently gained introns in *Caenorhabditis*.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, p.11363-7. 2004.
- COOMBS, G. H., GOLDBERG, D. E., KLEMBA, M., BERRY, C., KAY, J. e MOTTRAM, J. C. **Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets.** Trends Parasitol, v.17, n.11, Nov, p.532-7. 2001.
- COOMBS, G. H. e MOTTRAM, J. C. **Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation.** Parasitology, v.114 Suppl, p.S61-80. 1997.
- DALMASSO, A. e BERGÉ, J. B. **Enzyme polymorphism and the concept of parthenogenetic species, exemplified by *Meloidogyne*.** In: A. R. P. Stone, M. M. And Khalil, L. F. (Ed.). **Concepts in Nematode Systematics.** London: London Academic, 1983. Enzyme polymorphism and the concept of parthenogenetic species, exemplified by *Meloidogyne*., p.198-206
- DAVIS, E. L., HUSSEY, R. S. e BAUM, T. J. **Getting to the roots of parasitism by nematodes.** Trends Parasitol, v.20, n.3, Mar, p.134-41. 2004.
- DAVIS, E. L., HUSSEY, R. S., BAUM, T. J., BAKKER, J., SCHOTS, A., ROSSO, M. N. e ABAD, P. **Nematode Parasitism Genes.** Annu Rev Phytopathol, v.38, p.365-396. 2000.
- DE BOER, J. M., MCDERMOTT, J. P., DAVIS, E., HUSSEY, R., POPEIJUS, H., SMANT, G. e BAUM, T. **Cloning of a putative pectate lyase gene expressed in the subventral esophageal glands of *Heterodera glycines*.** J. Nematol., v.34, p.9-11. 2002.
- DE LEY, P. e BLAXTER, M. **Systematic position and phylogeny.** In: D. Lee (Ed.). **The Biology of Nematodes.** London: Taylor & Francis, 2002. Systematic position and phylogeny., p.1-30
- DE MEUTTER, J., TYTGAT, T., VAN DER SCHUEREN, E., SMANT, G., SCHOTS, A., COOMANS, A., VAN MONTAGU, M. e GHEYSEN, G. **Cloning of two endoglucanase genes from *Heterodera schachtii*.** Med Fac Land-bouww Univ Gent, v.63, n.3, p.619-23. 1998.
- DOMINGOS, A., CARDOSO, P. C., XUE, Z. T., CLEMENTE, A., BRODELIUS, P. E. e PAIS, M. S. **Purification, cloning and autoproteolytic processing of an**

- aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*.** European Journal of Biochemistry, v.267, n.23, Dec, p.6824-31. 2000.
- DORRIS, M., DE LEY, P. e BLAXTER, M. **Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism.** Parasitology Today, v.15, n.5, p.188-93. 1999.
- DOYLE, E. A. e LAMBERT, K. N. **Cloning and characterization of an esophageal-gland-specific pectate lyase from the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*.** Mol Plant Microbe Interact, v.15, n.6, Jun, p.549-56. 2002.
- DRISCOLL, M. e GERSTBREIN, B. **Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration.** Nat Rev Genet, v.4, n.3, Mar, p.181-94. 2003.
- EHWAETI, M. E., FARGETTE, M., PHILLIPS, M. S. e TRUDGILL, D. L. **Host status differences and their relevance to damage by *Meloidogyne incognita*.** Nematology, v.1, p.421-32. 1999.
- EISENBECK, J. D. e TRIANTAPHYLLOU, A. C. **Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races.** In: W. R. Nickle (Ed.). **Manual of Agricultural Nematology.** New York: Marcel Dekker, 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races, p.191-274
- EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M. C. e GREEN, P. **Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment.** Genome Res, v.8, n.3, Mar, p.175-85. 1998.
- EYCKEN, W. V. D., DE ALMEIDA ENGLER, J., INZE, D., VAN MONTAGU, M. e GHEYSEN, G. **A molecular study of root-knot nematode-induced feeding sites.** Plant J, v.9, n.1, Jan, p.45-54. 1996.
- FANELLI, E., DI VITO, M., JONES, J. T. e DE GIORGI, C. **Analysis of chitin synthase function in a plant parasitic nematode, *Meloidogyne artiellia*, using RNAi.** Gene, v.349, Apr 11, p.87-95. 2005.
- FRAGOSO, R. R. **Isolamento e caracterização de cDNAs codificadores de proteínas serina e aspártica de nematóide formador de galhas *Meloidogyne incognita*.** Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular - Instituto de Ciências Biológicas; Departamento de Biologia Celular; Universidade de Brasília, 13 de fevereiro, p.89. 2003.
- FRAGOSO, R. R., BATISTA, J. A., NETO, O. B. e GROSSI DE SA, M. F. **Isolation and characterization of a cDNA encoding a serine proteinase from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*.** Exp Parasitol, v.110, n.2, Jun, p.123-33. 2005.
- GALLEGO, S. G., SLADE, R. W. e BRINDLEY, P. J. **A cDNA encoding a pepsinogen-like, aspartic protease from the human roundworm parasite *Strongyloides stercoralis*.** Acta Trop, v.71, n.1, Aug 15, p.17-26. 1998.

- GAO, B., ALLEN, R., MAIER, T., DAVIS, E. L., BAUM, T. J. e HUSSEY, R. S. **Identification of a new beta-1,4-endoglucanase gene expressed in the esophageal subventral gland cells of *Heterodera glycines***. Journal of Nematology, v.34, n.1, MAR, p.12-15. 2002.
- GAO, B. L., ALLEN, R., MAIER, T., DAVIS, E. L., BAUM, T. J. e HUSSEY, R. S. **Identification of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines***. Molecular Plant-Microbe Interactions, v.14, n.10, OCT, p.1247-1254. 2001.
- GEIER, G., BANAJ, H. J., HEID, H., BINI, L., PALLINI, V. e ZWILLING, R. **Aspartyl proteases in *Caenorhabditis elegans* - Isolation, identification and characterization by a combined use of affinity chromatography, two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and databank analysis**. European Journal of Biochemistry, v.264, n.3, SEP, p.872-879. 1999.
- GHEYSEN, G. e FENOLL, C. **Gene expression in nematode feeding sites**. Annu Rev Phytopathol, v.40, p.191-219. 2002.
- GOELLNER, M., SMANT, G., DE BOER, J. M., BAUM, T. J. e DAVIS, E. L. **Isolation of beta-1,4-endoglucanase genes from *Globodera tabacum* and their expression during parasitism**. Journal of Nematology, v.32, n.2, p.154-165. 2000.
- GOUD, G. N., BOTTAZZI, M. E., ZHAN, B., MENDEZ, S., DEUMIC, V., PLIESKATT, J., LIU, S., WANG, Y., BUENO, L., FUJIWARA, R., SAMUEL, A., AHN, S. Y., SOLANKI, M., ASOJO, O. A., WANG, J., BETHONY, J. M., LOUKAS, A., ROY, M. e HOTEZ, P. J. **Expression of the *Necator americanus* hookworm larval antigen Na-ASP-2 in *Pichia pastoris* and purification of the recombinant protein for use in human clinical trials**. Vaccine, v.23, n.39, Sep 15, p.4754-64. 2005.
- GREEN, P. **PHRAP documentation**. <http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>:T University of Washington, Seattle, USA 1996.
- GUILIANO, D. B., HONG, X., MCKERROW, J. H., BLAXTER, M. L., OKSOV, Y., LIU, J., GHEDIN, E. e LUSTIGMAN, S. **A gene family of cathepsin L-like proteases of filarial nematodes are associated with larval molting and cuticle and eggshell remodeling**. Mol Biochem Parasitol, v.136, n.2, Aug, p.227-42. 2004.
- HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., RODRIGUEZ-KÁBANA, R. e KLOEPPER, W. **Interaction between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber**. Soil Biol. Biochem., v.30, n.7, p.925-37. 1998.
- HARROP, S. A., PROCIV, P. e BRINDLEY, P. J. **Acasp, a gene encoding a cathepsin D-like aspartic protease from the hookworm *Ancylostoma caninum***. Biochem Biophys Res Commun, v.227, n.1, Oct 3, p.294-302. 1996.

- HASHMI, S., BRITTON, C., LIU, J., GIULIANO, D. B., OKSOV, Y. e LUSTIGMAN, S. **Cathepsin L is essential for embryogenesis and development of *Caenorhabditis elegans*.** J Biol Chem, v.277, n.5, Feb 1, p.3477-86. 2002.
- HUANG, G., ALLEN, R., DAVIS, E. L., BAUM, T. J. e HUSSEY, R. S. **Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene.** Proc Natl Acad Sci U S A, Sep 19. 2006.
- HUANG, G., DONG, R., ALLEN, R., DAVIS, E. L., BAUM, T. J. e HUSSEY, R. S. **Developmental expression and molecular analysis of two *Meloidogyne incognita* pectate lyase genes.** Int J Parasitol, v.35, n.6, May, p.685-92. 2005.
- HUANG, G. Z., GAO, B. L., MAIER, T., ALLEN, R., DAVIS, E. L., BAUM, T. J. e HUSSEY, R. S. **A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*.** Molecular Plant-Microbe Interactions, v.16, n.5, MAY, p.376-381. 2003.
- HUANG, X. e MADAN, A. **CAP3: A DNA sequence assembly program.** Genome Res, v.9, n.9, Sep, p.868-77. 1999.
- HUGALL, A., STANTON, J. e MORITZ, C. **Reticulate evolution and the origins of ribosomal internal transcribed spacer diversity in apomictic *Meloidogyne*.** Mol Biol Evol, v.16, n.2, Feb, p.157-64. 1999.
- HUNTER, C. P. **Genetics: a touch of elegance with RNAi.** Curr Biol, v.9, n.12, Jun 17, p.R440-2. 1999.
- HUNTER, C. P. **Gene silencing: shrinking the black box of RNAi.** Curr Biol, v.10, n.4, Feb 24, p.R137-40. 2000.
- HUSSEY, R., DAVIS, E. e BAUM, T. **Secrets in secretions: genes that control nematode parasitism of plants.** Braz. J. Plant Physiol., v.14, n.3, p.183-194. 2002.
- JASMER, D. P., GOVERSE, A. e SMANT, G. **Parasitic nematode interactions with mammals and plants.** Annu Rev Phytopathol, v.41, p.245-70. 2003.
- JAUBERT, S., LAFFAIRE, J. B., ABAD, P. e ROSSO, M. N. **A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*.** FEBS Lett, v.522, n.1-3, Jul 3, p.109-12. 2002a.
- JAUBERT, S., LEDGER, T. N., LAFFAIRE, J. B., PIOTTE, C., ABAD, P. e ROSSO, M. N. **Direct identification of stylet secreted proteins from root-knot nematodes by a proteomic approach.** Mol Biochem Parasitol, v.121, n.2, May, p.205-11. 2002b.
- JEAN, L., PERY, P., DUNN, P., BUMSTEAD, J., BILLINGTON, K., RYAN, R. e TOMLEY, F. **Genomic organisation and developmentally regulated**

expression of an apicomplexan aspartyl proteinase. *Gene*, v.262, n.1-2, Jan 10, p.129-36. 2001.

JEPSON, B. S. **Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species).** Wallingford, UK: CAB Int. 1987. 265 p.

JEYARATNAM, J. **Acute pesticide poisoning: a major global health problem.** *World Health Stat Q*, v.43, n.3, p.139-44. 1990.

JOLODAR, A., FISCHER, P., BUTTNER, D. W., MILLER, D. J., SCHMETZ, C. e BRATTIG, N. W. ***Onchocerca volvulus*: expression and immunolocalization of a nematode cathepsin D-like lysosomal aspartic protease.** *Exp Parasitol*, v.107, n.3-4, Jul-Aug, p.145-56. 2004.

JOLODAR, A. e MILLER, D. J. **Preliminary characterisation of an *Onchocerca volvulus* aspartic protease.** *Int J Parasitol*, v.27, n.9, Sep, p.1087-90. 1997.

JOLODAR, A. e MILLER, D. J. **Identification of a novel family of non-lysosomal aspartic proteases in nematodes.** *Biochim Biophys Acta*, v.1382, n.1, Jan 15, p.13-6. 1998.

KALKANCI, A., BOZDAYI, G., BIRI, A. e KUSTIMUR, S. **Distribution of secreted aspartyl proteinases using a polymerase chain reaction assay with SAP specific primers in *Candida albicans* isolates.** *Folia Microbiol (Praha)*, v.50, n.5, p.409-13. 2005.

KIKUCHI, T., JONES, J., AIKAWA, T., KOSAKA, H. e OGURA, N. **A family of glycosyl hydrolase family 45 cellulases from the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*.** *FEBS Lett*, v.572, p.201-5. 2004.

KIKUCHI, T., SHIBUYA, H., AIKAWA, T. e JONES, J. **Cloning and characterization of pectate lyases expressed in the esophageal gland of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.19, n.3, p.280-7. 2006.

KIKUCHI, T., SHIBUYA, H. e JONES, J. T. **Molecular and biochemical characterization of an endo-beta-1,3-glucanase from the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* acquired by horizontal gene transfer from bacteria.** *Biochem J*, v.389, n.Pt 1, Jul 1, p.117-25. 2005.

KOLTAI, H., DHANDAYDHAM, M., OPPERMAN, C., THOMAS, J. e BIRD, D. **Overlapping plant signal transduction pathways induced by a parasitic nematode and a rhizobial endosymbiont.** *Mol Plant Microbe Interact*, v.14, n.10, Oct, p.1168-77. 2001.

KORITSAS, V. M. e ATKINSON, H. J. **Proteinases of females of the phytoparasite *Globodera pallida* (potato cyst nematode).** *Parasitology*, v.109, p.357-65. 1994.

KUWABARA, P. E. e COULSON, A. **RNAi--prospects for a general technique for determining gene function.** *Parasitol Today*, v.16, n.8, Aug, p.347-9. 2000.

- LAMBERT, K. N., ALLEN, K. D. e SUSSEX, I. M. **Cloning and characterization of an esophageal-gland-specific chorismate mutase from the phytoparasitic nematode *Meloidogyne javanica***. *Mol Plant Microbe Interact*, v.12, n.4, Apr, p.328-36. 1999.
- LETTRE, G. e HENGARTNER, M. O. **Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario**. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.7, n.2, Feb, p.97-108. 2006.
- LILLEY, C. J., DEVLIN, P., URWIN, P. E. e ATKINSON, H. J. **Parasitic nematodes, proteinases and transgenic plants**. *Parasitol Today*, v.15, n.10, Oct, p.414-7. 1999a.
- LILLEY, C. J., URWIN, P. E. e ATKINSON, H. J. **Characterization of plant nematode genes: identifying targets for a transgenic defence**. *Parasitology*, v.118 Suppl, p.S63-72. 1999b.
- LILLEY, C. J., URWIN, P. E., ATKINSON, H. J. e MCPHERSON, M. J. **Characterization of cDNAs encoding serine proteinases from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines***. *Mol Biochem Parasitol*, v.89, n.2, Nov, p.195-207. 1997.
- LILLEY, C. J., URWIN, P. E., MCPHERSON, M. J. e ATKINSON, H. J. **Characterization of intestinally active proteinases of cyst-nematodes**. *Parasitology*, v.113 (Pt 4), Oct, p.415-24. 1996.
- LONGBOTTOM, D., REDMOND, D. L., RUSSELL, M., LIDDELL, S., SMITH, W. D. e KNOX, D. P. **Molecular cloning and characterisation of a putative aspartate proteinase associated with a gut membrane protein complex from adult *Haemonchus contortus***. *Mol Biochem Parasitol*, v.88, n.1-2, Sep, p.63-72. 1997.
- LUSTIGMAN, S., ZHANG, J., LIU, J., OKSOV, Y. e HASHMI, S. **RNA interference targeting cathepsin L and Z-like cysteine proteases of *Onchocerca volvulus* confirmed their essential function during L3 molting**. *Mol Biochem Parasitol*, v.138, n.2, Dec, p.165-70. 2004.
- MAJNO, G. e JORIS, I. **Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death**. *Am J Pathol*, v.146, n.1, Jan, p.3-15. 1995.
- MASLER, E. P., KOVALEVA, E. S. e SARDANELLI, S. **Aminopeptidase-like activities in *Caenorhabditis elegans* and the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines***. *J Helminthol*, v.75, n.3, Sep, p.267-72. 2001.
- MCCARTER, J. P., MITREVA, M. D., MARTIN, J., DANTE, M., WYLIE, T., RAO, U., PAPE, D., BOWERS, Y., THEISING, B., MURPHY, C. V., KLOEK, A. P., CHIAPELLI, B. J., CLIFTON, S. W., BIRD, D. M. e WATERSTON, R. H. **Analysis and functional classification of transcripts from the nematode *Meloidogyne incognita***. *Genome Biol*, v.4, n.4, p.R26. 2003.

- MICHAUD, D., CANTIN, L., BONADE-BOTTINO, M., JOUANIN, L. e VRAIN, T. **C. Identification of stable plant cystatin/nematode proteinase complexes using mildly denaturing gelatin/polyacrylamide gel electrophoresis.** Electrophoresis, v.17, n.8, Aug, p.1373-9. 1996.
- MITREVA, M., MCCARTER, J. P., MARTIN, J., DANTE, M., WYLIE, T., CHIAPPELLI, B., PAPE, D., CLIFTON, S. W., NUTMAN, T. B. e WATERSTON, R. H. **Comparative genomics of gene expression in the parasitic and free-living nematodes *Strongyloides stercoralis* and *Caenorhabditis elegans*.** Genome Res, v.14, n.2, Feb, p.209-20. 2004.
- MORALES, M. E., KALINNA, B. H., HEYERS, O., MANN, V. H., SCHULMEISTER, A., COPELAND, C. S., LOUKAS, A. e BRINDLEY, P. J. **Genomic organization of the *Schistosoma mansoni* aspartic protease gene, a platyhelminth orthologue of mammalian lysosomal cathepsin D.** Gene, v.338, n.1, Aug 18, p.99-109. 2004.
- NEVEU, C., ABAD, P. e CASTAGNONE-SERENO, P. **Molecular cloning and characterization of an intestinal cathepsin L protease from the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*.** Physiol. Mol. Plant Pathol., v.63, n.3, p.159-165. 2003.
- NILSEN, T. W. **Evolutionary origin of SL-addition trans-splicing: still an enigma.** Trends Genet, v.17, n.12, Dec, p.678-80. 2001.
- NOUR, S. M., LAWRENCE, J. R., ZHU, H., SWERHONE, G. D., WELSH, M., WELACKY, T. W. e TOPP, E. **Bacteria associated with cysts of the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*).** Appl Environ Microbiol, v.69, n.1, Jan, p.607-15. 2003.
- PARKINSON, J., MITREVA, M., HALL, N., BLAXTER, M. e MCCARTER, J. P. **400,000 nematode ESTs on the Net.** Trends Parasitol, v.19, n.7, Jul, p.283-6. 2003.
- PARKINSON, J., MITREVA, M., WHITTON, C., THOMSON, M., DAUB, J., MARTIN, J., SCHMID, R., HALL, N., BARRELL, B., WATERSTON, R. H., MCCARTER, J. P. e BLAXTER, M. L. **A transcriptomic analysis of the phylum Nematoda.** Nat Genet, v.36, n.12, Dec, p.1259-67. 2004a.
- PARKINSON, J., WHITTON, C., GUILIANO, D., DAUB, J. e BLAXTER, M. **200,000 nematode expressed sequence tags on the Net.** Trends Parasitol, v.17, n.8, Aug 1, p.394-396. 2001.
- PARKINSON, J., WHITTON, C., SCHMID, R., THOMSON, M. e BLAXTER, M. **NEMBASE: a resource for parasitic nematode ESTs.** Nucleic Acids Res, v.32, n.Database issue, Jan 1, p.D427-30. 2004b.
- PETERSON, K. J., LYONS, J. B., NOWAK, K. S., TAKACS, C. M., WARGO, M. J. e MCPEEK, M. A. **Estimating metazoan divergence times with a molecular clock.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, p.6536-41. 2004.

- PLATT, H. M. **The phylogenetic systematics of free-living nematodes.** In: S. Lorenzen (Ed.). **Foreward.** London: The Ray Society, 1999. The phylogenetic systematics of free-living nematodes.
- POPEIJUS, H., OVERMARS, H., JONES, J., BLOK, V., GOVERSE, A., HELDER, J., SCHOTS, A., BAKKER, J. e SMANT, G. **Degradation of plant cell walls by a nematode.** Nature, v.405, p.36-7. 2000.
- PRANAV KUMAR, S. K. e KULKARNI, V. M. **Insights into the selective inhibition of *Candida albicans* secreted aspartyl protease: a docking analysis study.** Bioorg Med Chem, v.10, n.4, Apr, p.1153-70. 2002.
- QIN, L., KUDLA, U., ROZE, E., GOVERSE, A., POPEIJUS, H., NIEUWLAND, J., OVERMARS, H., JONES, J., SCHOTS, A., SMANT, G., BAKKER, J. e HELDER, J. **Plant degradation: a nematode expansin acting on plants.** Nature, v.427, p.30. 2004.
- RABOSSI, A., STOKA, V., PUIZDAR, V., TURK, V. e QUESADA-ALLUE, L. A. **Novel aspartyl proteinase associated to fat body histolysis during *Ceratitidis capitata* early metamorphosis.** Arch Insect Biochem Physiol, v.57, n.2, Oct, p.51-67. 2004.
- REDMOND, D. L., KNOX, D. P., NEWLANDS, G. e SMITH, W. D. **Molecular cloning and characterisation of a developmentally regulated putative metallopeptidase present in a host protective extract of *Haemonchus contortus*.** Mol Biochem Parasitol, v.85, n.1, Mar, p.77-87. 1997.
- REVERSAT, G. **Consumption of food reserves by starved second-stage juveniles of *Meloidogyne javanica* under conditions including osmobiosis.** Nematologica, v.27, p.207-214. 1981.
- RITZ, K. e TRUDGILL, D. L. **Utility of nematode community analysis as an integrated measure of the functional state of soils: perspectives and challenges.** Plant Soil, v.212, p.1-11. 1999.
- ROBERTS, P. A. **Current status of the availability, development, and use of host plant resistance to nematodes.** Journal of Nematology, v.24, p.213-27. 1992.
- ROSSO, M. N., FAVERY, B., PIOTTE, C., ARTHAUD, L., DE BOER, J. M., HUSSEY, R. S., BAKKER, J., BAUM, T. J. e ABAD, P. **Isolation of a cDNA encoding a beta-1,4-endoglucanase in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and expression analysis during plant parasitism.** Mol Plant Microbe Interact, v.12, n.7, Jul, p.585-91. 1999.
- RUVKUN, G. B. **The tiny RNA world.** Harvey Lect, v.99, p.1-21. 2003.
- SAFTIG, P., HETMAN, M., SCHMAHL, W., WEBER, K., HEINE, L., MOSSMANN, H., KOSTER, A., HESS, B., EVERS, M., VON FIGURA, K. e ET AL. **Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy**

- of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells.** *Embo J*, v.14, n.15, Aug 1, p.3599-608. 1995.
- SAKANARI, J. A. **Anisakis - from the platter to the microfuge.** *Parasitol Today*, v.6, n.10, Oct, p.323-7. 1990.
- SAMARA, C. e TAVERNARAKIS, N. **Calcium-dependent and aspartyl proteases in neurodegeneration and ageing in *C. elegans*.** *Ageing Res Rev*, v.2, n.4, Oct, p.451-71. 2003.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. e MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989
- SASSER, J. N. **Root-knot nematodes: a global menace to crop production.** *Plant Disease*, v.64, p.36-41. 1980.
- SASSER, J. N., EISENBACK, J. D. e CARTER, C. C. **The international Meloidogyne project - its goals and achievements.** *Annual Review of Phytopathology*, v.21, p.271-88. 1983.
- SASSER, J. N. e FRECKMAN, D. W. **A world perspective on nematology:the role of the society.** In: J. A. D. Veech, D.W. (Ed.). **Vistas on Nematology.** Maryland.: Society of Nematologists., 1987. A world perspective on nematology:the role of the society., p.7-14
- SCHOLL, E. H. e BIRD, D. M. **Resolving tylenchid evolutionary relationships through multiple gene analysis derived from EST data.** *Mol Phylogenet Evol*, May 2. 2005.
- SCHOLL, E. H., THORNE, J. L., MCCARTER, J. P. e BIRD, D. M. **Horizontally transferred genes in plant-parasitic nematodes: a high-throughput genomic approach.** *Genome Biol*, v.4, n.6, p.R39. 2003.
- SCHWARZ, E. M., ANTOSHECHKIN, I., BASTIANI, C., BIERI, T., BLASIAR, D., CANARAN, P., CHAN, J., CHEN, N., CHEN, W. J., DAVIS, P., FIEDLER, T. J., GIRARD, L., HARRIS, T. W., KENNY, E. E., KISHORE, R., LAWSON, D., LEE, R., MULLER, H. M., NAKAMURA, C., OZERSKY, P., PETCHERSKI, A., ROGERS, A., SPOONER, W., TULI, M. A., VAN AUKEN, K., WANG, D., DURBIN, R., SPIETH, J., STEIN, L. D. e STERNBERG, P. W. **WormBase: better software, richer content.** *Nucleic Acids Res*, v.34, n.Database issue, Jan 1, p.D475-8. 2006.
- SEMBLAT, J. P., BONGIOVANNI, M., WAJNBERG, E., DALMASSO, A., ABAD, P. e CASTAGNONE-SERENO, P. **Virulence and molecular diversity of parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp.** *Heredity*, v.84, p.81-9. 2000.
- SEYFRIED, D. M., VEYNA, R., HAN, Y., LI, K., TANG, N., BETTS, R. L., WEINSHEIMER, S., CHOPP, M. e ANAGLI, J. **A selective cysteine protease inhibitor is non-toxic and cerebroprotective in rats undergoing transient**

- middle cerebral artery ischemia.** Brain Res, v.901, n.1-2, May 18, p.94-101. 2001.
- SHARP, P. A. **RNAi and double-strand RNA.** Genes Dev, v.13, n.2, Jan 15, p.139-41. 1999.
- SHOMAKER, C. H. e BEEN, T. H. **A model for infestation foci of potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*.** Phytopathology, v.89, p.583-90. 1999.
- SILVA, F. B., BATISTA, J. A., MARRA, B. M., FRAGOSO, R. R., MONTEIRO, A. C., FIGUEIRA, E. L. e GROSSI-DE-SA, M. F. **Pro domain peptide of HGCP-Iv cysteine proteinase inhibits nematode cysteine proteinases.** Genet Mol Res, v.3, n.3, Sep 30, p.342-55. 2004.
- SMANT, G., STOKKERMANS, J. P., YAN, Y., DE BOER, J. M., BAUM, T. J., WANG, X., HUSSEY, R. S., GOMMERS, F. J., HENRISSAT, B., DAVIS, E. L., HELDER, J., SCHOTS, A. e BAKKER, J. **Endogenous cellulases in animals: isolation of beta-1, 4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.95, n.9, Apr 28, p.4906-11. 1998.
- SMITH, W. D., SKUCE, P. J., NEWLANDS, G. F., SMITH, S. K. e PETTIT, D. **Aspartyl proteases from the intestinal brush border of *Haemonchus contortus* as protective antigens for sheep.** Parasite Immunol, v.25, n.11-12, Nov-Dec, p.521-30. 2003.
- SYNTICHAKI, P., SAMARA, C. e TAVERNARAKIS, N. **The vacuolar H⁺ -ATPase mediates intracellular acidification required for neurodegeneration in *C. elegans*.** Curr Biol, v.15, n.13, Jul 12, p.1249-54. 2005.
- SYNTICHAKI, P. e TAVERNARAKIS, N. **Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos?** EMBO Rep, v.3, n.7, Jul, p.604-9. 2002.
- SYNTICHAKI, P. e TAVERNARAKIS, N. **The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology?** Nat Rev Neurosci, v.4, n.8, Aug, p.672-84. 2003.
- SYNTICHAKI, P., XU, K., DRISCOLL, M. e TAVERNARAKIS, N. **Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*.** Nature, v.419, n.6910, Oct 31, p.939-44. 2002.
- TABARA, H., GRISHOK, A. e MELLO, C. C. **RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence.** Science, v.282, n.5388, Oct 16, p.430-1. 1998.
- TATUSOV, R. L., FEDOROVA, N. D., JACKSON, J. D., JACOBS, A. R., KIRYUTIN, B., KOONIN, E. V., KRYLOV, D. M., MAZUMDER, R., MEKHEDOV, S. L., NIKOLSKAYA, A. N., RAO, B. S., SMIRNOV, S., SVERDLOV, A. V., VASUDEVAN, S., WOLF, Y. I., YIN, J. J. e NATALE, D. A. **The COG database: an updated version includes eukaryotes.** BMC Bioinformatics, v.4, Sep 11, p.41. 2003.

- TAVERNARAKIS, N., XU, K. e DRISCOLL, M. **Execution of necrotic-like cell death in *Caenorhabditis elegans* requires cathepsin D activity.** Nature Biotechnology, v.1, n.S3, p.139SR. 2001.
- TCHEREPANOVA, I., BHATTACHARYYA, L., RUBIN, C. S. e FREEDMAN, J. H. **Aspartic proteases from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Structural organization and developmental and cell-specific expression of asp-1.** J Biol Chem, v.275, n.34, Aug 25, p.26359-69. 2000.
- TRIANANTAPHYLLOU, A. C. **Cytogenetics of root-knot nematodes.** In: F. A. T. Lambert, C.E. (Ed.). **Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* species): Systematics, Biology and Control.** London: London Academic, 1979. Cytogenetics of root-knot nematodes., p.85-114
- TRIANANTAPHYLLOU, A. C. **Oogenesis and the chromosomes of the parthenogenetic root-knot nematode *Meloidogyne incognita*.** Journal of Nematology, v.13, p.95-104. 1981.
- TRIANANTAPHYLLOU, A. C. **Polyploidy in meiotic parthenogenetic populations of *Meloidogyne hapla* and a mechanism for conversion to diploidy.** Review of Nematology, v.7, p.65-72. 1984.
- TRIANANTAPHYLLOU, A. C. **Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes.** In: J. N. A. C. Sasser, C.C. (Ed.). **An Advanced Treatise on Meloidogyne.** Raleigh: North Carolina State University Graphics, v.1, 1985. Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes., p.113-26
- TRIANANTAPHYLLOU, A. C. **Further studies on the role of polyploidy in the evolution of *Meloidogyne*.** Journal of Nematology, v.23, p.249-53. 1991.
- TRIANANTAPHYLLOU, A. C. **Hermaphroditism in *Meloidogyne hapla*.** Journal of Nematology, v.25, p.15-26. 1993.
- TRIANANTAPHYLLOU, A. C. e HIRSCHMANN, H. **Evidence of direct polyploidization in the mitotic parthenogenetic *Meloidogyne microcephala* through doubling of its somatic chromosome number.** Fundamental Applied Nematology, v.20, p.385-91. 1997.
- TRUDGILL, D. L. **Origins of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp. Nematoda) in relation to their cultural control.** Phytoparasitica, v.23, p.191-4. 1995.
- TRUDGILL, D. L. e BLOK, V. C. **Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens.** Annu Rev Phytopathol, v.39, p.53-77. 2001.
- UEHARA, T., KUSHIDA, A. e MOMOTA, Y. **PCR-based cloning of two beta-1,4-endoglucanases from the root-lesion nematode *Pratylenchus penetrans*.** Nematology, v.3, n.4, p.335-41. 2001.

- URWIN, P. E., LILLEY, C. J. e ATKINSON, H. J. **Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference.** Mol Plant Microbe Interact, v.15, n.8, Aug, p.747-52. 2002.
- URWIN, P. E., LILLEY, C. J., MCPHERSON, M. J. e ATKINSON, H. J. **Characterization of two cDNAs encoding cysteine proteinases from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*.** Parasitology, v.114 (Pt 6), Jun, p.605-13. 1997a.
- URWIN, P. E., LILLEY, C. J., MCPHERSON, M. J. e ATKINSON, H. J. **Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin.** Plant J, v.12, n.2, Aug, p.455-61. 1997b.
- URWIN, P. E., MCPHERSON, M. J. e ATKINSON, H. J. **Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs.** Planta, v.204, n.4, Apr, p.472-9. 1998.
- VAN DER EYCKEN, W., DE ALMEIDA ENGLER, J., INZE, D., VAN MONTAGU, M. e GHEYSEN, G. **A molecular study of root-knot nematode-induced feeding sites.** Plant J, v.9, n.1, Jan, p.45-54. 1996.
- VANHOLME, B., DE MEUTTER, J., TYTGAT, T., GHEYSEN, G. D. e VANHOUTTE, I. **An improved method for whole-mount in situ hybridization of *Heterodera schachtii* juveniles.** Parasitol Res, v.88, n.8, Aug, p.731-3. 2002.
- VANHOLME, B., DE MEUTTER, J., TYTGAT, T., VAN MONTAGU, M., COOMANS, A. e GHEYSEN, G. **Secretions of plant-parasitic nematodes: a molecular update.** Gene, v.332, May 12, p.13-27. 2004.
- VERCAUTEREN, I., VAN DER SCHUEREN, E., VAN MONTAGU, M. e GHEYSEN, G. ***Arabidopsis thaliana* genes expressed in the early compatible interaction with root-knot nematodes.** Mol Plant Microbe Interact, v.14, n.3, Mar, p.288-99. 2001.
- VERONICO, P., JONES, J., DI VITO, M. e DE GIORGI, C. **Horizontal transfer of a bacterial gene involved in polyglutamate biosynthesis to the plant-parasitic nematode *Meloidogyne artiellia*.** FEBS Lett, v.508, n.3, Nov 23, p.470-4. 2001.
- WANG, X. H., ALLEN, R., DING, X. F., GOELLNER, M., MAIER, T., DE BOER, J. M., BAUM, T. J., HUSSEY, R. S. e DAVIS, E. L. **Signal peptide-selection of cDNA cloned directly from the esophageal gland cells of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*.** Molecular Plant-Microbe Interactions, v.14, n.4, APR, p.536-544. 2001.
- WEERASINGHE, R. R., BIRD, D. M. e ALLEN, N. S. **Root-knot nematodes and bacterial Nod factors elicit common signal transduction events in *Lotus japonicus*.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.8, Feb 22, p.3147-52. 2005.
- WILLIAMSON, A. L., BRINDLEY, P. J., ABBENANTE, G., DATU, B. J., PROCIV, P., BERRY, C., GIRDWOOD, K., PRITCHARD, D. I., FAIRLIE, D. P., HOTEZ,

- P. J., ZHAN, B. e LOUKAS, A. **Hookworm aspartic protease, Na-APR-2, cleaves human hemoglobin and serum proteins in a host-specific fashion.** J Infect Dis, v.187, n.3, Feb 1, p.484-94. 2003a.
- WILLIAMSON, A. L., BRINDLEY, P. J., ABBENANTE, G., PROCIV, P., BERRY, C., GIRDWOOD, K., PRITCHARD, D. I., FAIRLIE, D. P., HOTEZ, P. J., DALTON, J. P. e LOUKAS, A. **Cleavage of hemoglobin by hookworm cathepsin D aspartic proteases and its potential contribution to host specificity.** Faseb J, v.16, n.11, Sep, p.1458-60. 2002.
- WILLIAMSON, A. L., BRINDLEY, P. J., KNOX, D. P., HOTEZ, P. J. e LOUKAS, A. **Digestive proteases of blood-feeding nematodes.** Trends Parasitol, v.19, n.9, Sep, p.417-23. 2003b.
- WILLIAMSON, A. L., BRINDLEY, P. J. e LOUKAS, A. **Hookworm cathepsin D aspartic proteases: contributing roles in the host-specific degradation of serum proteins and skin macromolecules.** Parasitology, v.126, n.Pt 2, Feb, p.179-85. 2003c.
- WILLIAMSON, A. L., LECCHI, P., TURK, B. E., CHOE, Y., HOTEZ, P. J., MCKERROW, J. H., CANTLEY, L. C., SAJID, M., CRAIK, C. S. e LOUKAS, A. **A multi-enzyme cascade of hemoglobin proteolysis in the intestine of blood-feeding hookworms.** J Biol Chem, v.279, n.34, Aug 20, p.35950-7. 2004.
- WILLIAMSON, V. M. e GLEASON, C. A. **Plant-nematode interactions.** Current Opinion in Plant Biology, v.6, n.4, AUG, p.327-333. 2003.
- WILLIAMSON, V. M. e HUSSEY, R. S. **Nematode pathogenesis and resistance in plants.** Plant Cell, v.8, n.10, Oct, p.1735-45. 1996.
- WITTLIN, S., ROSEL, J., HOFMANN, F. e STOVER, D. R. **Mechanisms and kinetics of procathepsin D activation.** European Journal of Biochemistry, v.265, n.1, Oct 1, p.384-93. 1999.
- WYLIE, T., MARTIN, J. C., DANTE, M., MITREVA, M. D., CLIFTON, S. W., CHINWALLA, A., WATERSTON, R. H., WILSON, R. K. e MCCARTER, J. P. **Nematode.net: a tool for navigating sequences from parasitic and free-living nematodes.** Nucleic Acids Res, v.32, n.Database issue, Jan 1, p.D423-6. 2004.
- WYSS, U., GRUNDLER, F. M. W. e MUNCH, A. **The parasitic behaviour of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*.** Nematologica, v.38, p.98-111. 1992.
- YAMASHIMA, T. **Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates.** Prog Neurobiol, v.62, n.3, Oct, p.273-95. 2000.
- YAMASHIMA, T. **Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates.** Cell Calcium, v.36, n.3-4, Sep-Oct, p.285-93. 2004.

YAMASHIMA, T., TONCHEV, A. B., TSUKADA, T., SAIDO, T. C., IMAJOH-OHMI, S., MOMOI, T. e KOMINAMI, E. **Sustained calpain activation associated with lysosomal rupture executes necrosis of the postischemic CA1 neurons in primates.** *Hippocampus*, v.13, n.7, p.791-800. 2003.

YAN, Y., SMANT, G. e DAVIS, E. **Functional screening yields a new beta-1,4-endoglucanase gene from *Heterodera glycines* that may be the product of recent gene duplication.** *Mol Plant Microbe Interact*, v.14, n.1, Jan, p.63-71. 2001.

V – ANEXOS

V.i. Artigo em fase de submissão (1º autor).

Molecular cloning and developmental expression of a cDNA encoding a cathepsin D-like aspartic proteinase from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*.

Rodrigo da Rocha Fragoso, João Aguiar Nogueira Batista, Osmundo Brilhante Oliveira Neto & Maria Fátima Grossi de Sá.

V.ii. Artigo publicado (1º autor).

Isolation and characterization of cDNA encoding serine proteinase from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Rodrigo R. Fragoso**, João Aguiar Nogueira Batista, Osmundo Brilhante Oliveira Neto & M. Fátima Grossi-de-Sá. *Experimental Parasitology*, v. 110, n. 2, p. 123-133 (2005).

V.iii. Lista de artigos publicados (co-autor).

V.iv. Lista de artigos em fase de submissão (co-autor).

ANEXO V.i.

**Molecular cloning and developmental expression of a
cDNA encoding a cathepsin D-like aspartic proteinase
from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*.**

Fragoso, R.R.; Batista, J.A.N.; Oliveira-Neto, O.B. & Grossi de Sá, M.F.

Rodrigo da Rocha Fragoso^{1,2}, João Aguiar Nogueira Batista³, Osmundo Brilhante Oliveira
Neto¹ & Maria Fátima Grossi de Sá¹.

1- Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia – Brasília – DF – Brazil

2- Universidade de Brasília – Depto. Biologia Celular – Brasília – DF – Brazil

3- Universidade Federal de Minas Gerais – Depto. Botânica – Belo Horizonte – MG – Brazil.

Address correspondence to:

Maria Fátima Grossi de Sá

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Recursos Genéticos e Biotecnologia

PqEB Final Av. W/5 Norte

CEP 70.770-900

Brasília, DF, Brazil

E-mail: fatimasa@cenargen.embrapa.br

SUMMARY

Here we describe the cloning and characterization of a cDNA encoding an aspartic proteinase from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Adopting PCR techniques, a 1,471-bp fragment encoding cathepsin D-like (*Mi-asp1*) was isolated from second-stage larvae mRNA. Its predicted amino acid sequence shows the pro-region of 71 amino acids and mature protease of 378 amino acids with a predicted molecular mass of 41.502 kDa. Protein sequence comparisons of *Mi-asp1* with GenBank showed identity of 60-66% with cathepsin D-like aspartic proteinases, a nematode-specific group, in contrast with pepsinogen-like, another nematode-specific group. Southern and northern blot analysis, RT-PCR amplification and ESTs comparisons suggested the existence of a gene family encoding aspartic proteinase, which expressions are probably developmentally controlled. Orthologues of *Mi-asp1* are strongly correlated to skin penetration, tissue migration, immune complement evasion and hemoglobin digestion in animal-parasitic nematodes. On the other hand, the orthologue ASP-4 from the free-living *Caenorhabditis elegans* is well described as the major executioner of necrotic cell death in neurodegenerative process. Probably, *Mi-asp1* has more roles than cellular and luminal digestion, but also nervous system formation during embryogenesis or metamorphosis during larval ecdysis.

Key words: cDNA cloning, *Meloidogyne*, nematode, aspartyl protease, cathepsin D, neurodegeneration.

Abbreviations: root-knot nematode, RKN; second-stage larva or juvenile, L2; aspartic proteinase, AP; rapid amplification of cDNA ends, RACE; expressed sequence tag, EST; reverse transcription and polymerase chain reaction, RT-PCR; open read frame, ORF.

1. INTRODUCTION

The endoparasitic sedentary nematodes of genera *Heterodera*, *Globodera* (known as cyst nematodes) and *Meloidogyne* (the root-knot nematodes, RKN) are together major crop phytopathogens, causing estimated losses of US \$ 100 billion annually [1]. The southern root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, is probably the most damaging plant pathogen of world's agriculture [2] mainly because its wide host range, worldwide distribution, apomitic reproduction and high reproductive rate.

These sedentary plant-parasitic nematodes share some pathogenic mechanisms, which ensure host-tissue invasion and host-defense evasion [3]. Parasitism establishment and maintenance are based upon several secreted molecules that access plant cellular programs, transforming them in enlarged, multinucleate, and metabolically active feeding cells, named syncytium in cyst nematodes or giant cells in RKN [4]. Curiously, animal-parasitic nematodes also induce cell modification through differential gene expression patterns also mediated by secreted molecules [5]. Secretions of cyst nematodes have been shown to co-stimulate the proliferation of both tobacco leaf protoplast and human peripheral blood mononuclear cells suggesting the activation of a general signal transduction mechanism by the secreted factors [6]. These feeding cells in plant host have strikingly similar phenotypes to host cell modifications induced by some animal-parasitic nematodes [3]. In fact, several phylogenetically non-related nematodes evolved parasitic relationships with plants, invertebrates and vertebrates, suggesting a kind of predisposition to parasitism evolution [7].

Nematicides, crop rotation, bio-control agents and/or host resistance are not successfully deployed against nematodes, except in some restrict cases [8]. In respect to plant-parasitic nematode control, the technology of plant transformation with genes encoding anti-feeding factors has been shown the most promising ones [1, 9, 10]. Some reports described

proteinase activities in crude extracts [11, 12] or proteinase gene cloning [13-16]. Other reports have confirmed nematode proteinases inhibition *in planta*, *in vivo* or *in vitro*, respectively, when plants were transformed with proteinase inhibitor genes [9, 17, 18], proteinase gene expression was inhibited by RNAi [19] and proteinase activity was inhibited by a cognate pro-region [20]. In all cases, the focused targets were serine or cysteine proteinases because previous works have characterized the major intestinal proteinase activity of these two classes [11]. Although, animal-parasitic nematodes have shown intestinal proteinase activity of cysteine, aspartic and metallo proteases [21, 22]. There is a minor interest on aspartic proteinases of plant-parasitic nematodes, when compared to the enormous interest on those of animal-parasitic nematodes.

Aspartic (or aspartyl) proteinases (AP) are hydrolytic enzymes that catalyzed peptide bonds cleavage by acid-base mechanisms [23], particularly between hydrophobic amino-acid residues [24], and demonstrate several functions involving protein degradation at low pH [25]. Ubiquitously, they constitute a widely distributed protein superfamily [26], which share a high identity percentage in amino acid sequence [27], specially, when compared to other proteinases classes.

Animal-parasitic nematodes, trematodes, apicomplexans, fungus, and arachnids possess APs with major roles in the interaction between them and the animals host, normally associated to digestion of host skin, tissue and hemoglobin [28-31]. Aiming plant nematode resistance by transforming the plant with anti-parasitic factors and considering the major importance of APs in animal parasitism, we initiated a molecular approach to discover AP function in plant-parasitic nematode. Here we report the first cloning and developmental characterization of an aspartic proteinase cDNA from nematode of Clade IVb. Named *Mi-asp1*, this cDNA sequence, obtained from the southern root-knot nematode *Meloidogyne incognita*, was submitted to GenBankTM databases under the accession number **DQ360827**.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Growth and collection of *M. incognita*

Since *M. incognita* is an obligatory endoparasitic plant-nematode, it could only be produced by infecting tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. Nematodes were harvested at three different life stages (eggs, second-stage larvae L2 and adult females) by standard protocols [32]. Briefly, the tomato roots were washed and triturated to separate nematode eggs in a 400-mesh sieve. This fraction was cleaned by centrifugation in 50%(w/v) sucrose when eggs were collected from the supernatant on a 500-mesh sieve. Pre-parasitic second-stage larvae (L2) were obtained from eggs hatched *in vitro*. Adult parasitic females were obtained from tomato roots incubated overnight in 40%(v/v) pectinase to plant-tissue digestion. Females were also cleaned through centrifugation in 40%(w/v) sucrose to retain them in supernatant for collection in a 100-mesh sieve.

2.2. Proteolytic assays

The crude protein extract of whole *M. incognita* females was prepared to evaluate the aspartic proteinase activities throughout a fluorimetric assay with an aspartic proteinase specific substrate and inhibitor, respectively, the N-succinyl-Arg-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Try-MCA and the Pepstatin A. About 250 mg of females were triturated in 250 µl of acidic buffer (0.1 M sodium acetate and 0.5%v/v Triton-100; pH of 4.8) at 4 °C, centrifuged at 14,000g for 15 minutes and the supernatant used as the crude protein extract. The proteolytic reaction was carried out at 37 °C for 30 minutes in a final volume of 100 µl of acidic buffer with 10 µl of crude protein extract, 10 µM substrate, 5% DMSO, 2.5 mM DTT and, only in

inhibited samples, 10 μ M inhibitor, pre-incubated with the protein extract at 37 °C for 30 min. Substrate hydrolysis, with or without inhibitor, was monitored by accessing fluorescent signals.

2.3. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplifications

Total RNA from *M. incognita* L2 was extracted using the RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription of total RNA (2 μ g), was performed with an oligo d(T)-anchor primer and AMV-RT (Boehringer Mannheim), according to the manufacturer's instructions. PCR amplifications were carried out using the degenerated primers ASP1 (sense, 5'GGTTCWTCYAATCTBTGG3') and ASP2rev (antisense, 5'CCMAGRATHCCRTCAA3'), based on conserved motifs flanking the catalytic aspartic residues of AP. The PCR system (final volume, 25 μ l) contained 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 2.0 mM MgCl₂, 200 μ M of dNTPs and 400 nM of each primer. The PCR program consisted of an initial denaturation at 94 °C for 1.5 min, 30 cycles of amplification at 94 °C for 30 s, 45 °C for 45 s and 72 °C for 1.5 min, followed by a final elongation step at 72 °C for 5 min. An aliquot of the PCR product was then used for a second round of amplification using the same conditions.

2.4. 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends

The 5' end of the cDNA fragment derived from the RT-PCR was amplified by 5' RACE using a 5'/3' RACE kit (Boehringer Mannheim) according to the manufacturer's instructions. The antisense primer Mi-asp4a (5'GTTAGTCCTGGCTCGCTG3') was used for reverse transcription and the antisense primers Mi-asp4b (5'ACTCTTGCCAGCCACAC3') and Mi-asp4c (5'GTGATGGAGTAGGCATGC3') were used for the first and second round of a nested-PCR, respectively. The first-round PCR conditions comprised a denaturation step

at 94 °C for 1.5 min, 30 cycles of 94 °C for 45 s, 42 °C for 45 s, and 72 °C for 1.5 min, and a final elongation step at 72 °C for 5 min. The same conditions were used in the second PCR round, except that the annealing temperature was 52 °C. Contiguous sequences downstream of the 5' RACE product were amplified by 3'RACE through two rounds of a nested-PCR with specific sense primers designed on 5'RACE-obtained sequence, named as Miasp4d (5'CATCACCATGTCGATCG3') and Miasp4e (5'CCGAATGGATAACAATGCG3'). First-round conditions were: denaturation step at 94 °C for 1.5 min, 30 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 1.5 min and final elongation at 72 °C for 5 min. Second-round had the same conditions, excepted the cycle-number of 35.

2.5. DNA sequencing and sequence analysis

The amplified cDNA fragments were cloned into pGEM-T Easy (Promega) and sequenced in both strands using an automated ABI DNA sequencer. Sequence comparisons with GenBankTM database were done using the BLASTx software [33] from the NCBI site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The CDD-Search software from the NCBI site was used to conserved domains determination [34]. Signal peptide and cleavage-site identification was done using the SignalP software [35] of the Center for Biological Sequence Analysis (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Multiple sequence alignments were done using the CLUSTAL_W software [36] and edited with the BOXSHADE software (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). The dendrograms were edited with the TREEVIEW software [37] available in internet sites (<http://www.unb.br/ib/cel/download/>). Both molecular mass and isoelectric point were determined throughout deduced protein sequence analysis by the Compute pI/MW tool software available at the Expasy site (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html).

2.6. Southern blotting analysis

Five aliquots (8 µg each) of genomic DNA from *M. incognita* eggs were digested (with *Eco* RI, *Hind* III, *Xba* I, *Pst* I or *Nsi* I), electrophoresed on a 0.8% agarose gel and transferred to a Hybond N⁺ nylon membrane (Amersham Pharmacia Biotech, UK) using standard procedures [38]. The *Mi-asp1* cDNA was labeled with α -[³²P]dCTP to a high specific activity using the Megaprimer DNA-labeling kit (Amersham Pharmacia Biotech) and used to probe the blot. The membrane was washed to a stringency of 0.1X SSC with 0.2% SDS at 65 °C.

2.7. Analysis of expression by northern blotting and semi-quantitative RT-PCR

Total RNA from *M. incognita* eggs, larvae and females were purified using the RNeasy RNA extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. For northern blotting analysis, total RNA from each developmental stage (22 µg per line) were separated by denaturing-gel electrophoresis [39]. Hybridization was carried out as described for Southern blotting analysis. For semi-quantitative RT-PCR approach, reverse transcription was done for each life stage as described above, using 2 µg of total RNA. The RT-PCR amplifications were done with an 1:20 dilution of synthesized cDNA, as a template, and internal primers specific for *β-actin* or *Mi-asp1*. A control reaction was done using genomic DNA as template. The PCR conditions consisted of a denaturation step at 92 °C for 2 min, cycles of 92 °C for 45 s, 45 °C for 45 s and 72 °C for 1.5 min. We evaluated five amplification points, corresponding to odd cycles from 27 to 35. The signal intensities were compared using optical densities determined by Zero-Dscan software (Scanalytics) from digital images obtained in an Eagle Eye II transilluminator (Stratagene).

2.8. Database searching and sequence retrieval for nematode aspartic proteinases

The nucleotide sequence of *Mi-asp1* was used as a query in BLAST searches of the *Caenorhabditis elegans* genome at WormBase (<http://www.wormbase.org>) and of the plant-parasite nematode dbEST at the Nematode Center (<http://www.nematode.net>). A GenBank™ search at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) was also done using as a query a combination of words that specifies developmental stage and gene annotation, after the Taxonomy ID of RKN (189290).

3. RESULTS

3.1. Proteolytic characterization of M. incognita females

To analyze the AP activity of *M. incognita* females we used a fluorescent substrate specific for this class of proteinases. Three different biological repetition assays in acidic buffer (pH 4.8) showed a high AP activity (Fig. 1). The specificity of the reaction was further confirmed using Pepstatin A, an inhibitor specific for APs, which decreased about 70% of the detected proteolytic activity.

3.2. Cloning and characterization of a cDNA encoding an aspartic proteinase

Amplification of aspartic proteinase cDNAs from *M. incognita* larvae was performed by RT-PCR using degenerated primers based on conserved motifs [40]. This amplification showed a 300-bp fragment that, after sequencing, revealed six different cDNAs encoding APs. Multiple sequence alignment of these six cDNAs grouped them in three consensus sequences. Two consensus sequences had high identity between themselves and with AP sequences from *Ancylostoma caninum* (76%) and *Onchocerca volvulus* (72%) found in the GenBank™ databases. A third consensus sequence showed 60 and 56% identity with the first

and second consensus sequences, respectively. Antisense primers were designed to all three consensus for 5' RACE, but only the second one was amplified. After 5' RACE, a 400-bp fragment was isolated and sequenced, revealing an open reading frame (ORF) contiguous with the previous RT-PCR cDNA, however lacking the start codon in frame with the coding sequence (Fig. 2). Through 3' RACE, using primers based on the sequence of 5' RACE product, a 1,471-bp fragment, corresponding to the previous cDNAs from the 5'RACE and RT-PCR, was isolated and named *Mi-asp1*.

Southern blotting was done to determine the gene copy number of *Mi-asp1* (Fig. 3). Samples were digested with *Eco* RI, *Hind* III, *Xba* I and *Pst* I, which do not cleave the cDNA, and *Nsi* I, which cleaves the cDNA twice at positions 144 and 968. Hybridization with the *Eco* RI, *Hind* III and *Xba* I digestions revealed one major signal and two to three minor ones. Considering that none of these enzymes cleaves the *Mi-asp1* cDNA it is reasonable to assume that the major hybridization signal corresponds to *Mi-asp1* and the minor ones to other AP genes. This interpretation is in accordance with the amplification of three different AP cDNAs in the RT-PCR. Together these results indicate the existence of a gene family of AP in *M. incognita*. Accordingly, Tcherepanova and colleges (2000) have identified six APs in *Caenorhabditis elegans*, named *asp-1* to *asp-6*.

3.3. Characterization of the deduced amino acid sequence of *Mi-asp1*

The *Mi-asp1* encodes a pro-region of 71 amino acid residues and a mature proteinase of 378 aminoacid residues (Fig. 2), with a predicted molecular mass of 41.502 kDa and theoretical pI of 5.27. Domain analysis of *Mi-asp1* by the CDD-Search (Conserved Domain Database) showed e-value of 7e-105 with conserved domain of eukaryotic aspartyl proteinase (pfam00026.12). An analysis using the CDART (Conserved Domain Architecture Retrieval Tool) indicated that *Mi-asp1* possesses a single AP domain structure. The BLASTp analysis

of Mi-asp1 showed high sequence identity with seven proteins (Table 1) grouped in the subfamily of nematode cathepsin D-like aspartic proteinases [41], and these sequences were aligned with Mi-asp1 for further comparisons and function prediction (Fig. 4). These nematode APs also share putative sites of disulfide bridges and N-glycosylation site positioned as found in vertebrate non-lysosomal cathepsin E (Fig. 4). On the other hand, some paralogues nematodes AP (pepsinogen-like) appeared far from this group of cathepsin D APs.

Since the amplified sequence is incomplete at the N-terminal, the analysis with the SignalP software, which identifies putative signal peptide through sequence similarity with signal peptides of eukaryotes, were not enough to reveal any pre-region for Mi-asp1. However, after submitting to SignalP the best forty matches with Mi-asp1 from BLASTp result and then aligning them all without the signal peptides (data not shown), we could predicted the putative cleavage site at residues 5–6 (VSS–IR) of the amplified sequence. The putative zymogen activation site that divides pro-region of mature proteinase was predicted through sequence comparisons with several nematode APs (Fig. 4). Mi-asp1 shares several features with the recently defined group of nematode cathepsin D-like AP (Fig. 4), as one N-glycosylation site, four disulfide bridges and conserved motifs around the two catalytic aspartic residues.

Using representative species from the best BLASTp results, an unrooted dendrogram was made to shade light on the evolution of cathepsin D orthologues (Fig. 5). The dendrogram correlates similarity sequence of cathepsin D-like APs with usual nematode classification and clade grouping (Fig. 5). Since all considered sequences are orthologues, the dendrogram clusters are correlated with evolutionary relationships (Fig. 5). Despite of similar morphology, Nematoda is an ancient, diversified phylum. Considering skin-penetrating and blood-feeding parasites, there are strong evidences of substrate-specificity adaptation of APs to host-protein digestion [29]. Thus, *Ancylostoma ceylanicum*, *A. caninum* and *Necator americanus*, closely

related nematodes (Fig. 5), successfully parasite the intestines of hamster, dog and human, respectively. Occasionally, they can parasite other than the preferential host [41]. However, when they invade a different, erroneous host, the impaired interaction results in parasitism blockage [42]. On the other hand, *Brugia malayi* and *O. volvulus*, phylogenetically related human parasites, demonstrate higher sequence divergence than could be expected. This could be understood as a result of differences in parasitism strategies, such as parasite localization, preferential nourishment, insect vectors, etc.

3.4. Expression of *Mi-asp1* mRNA in the developmental stages of *M. incognita*

To characterize the temporal expression of *Mi-asp1* we performed a northern blot with total-RNA samples of eggs, larvae and females (Fig. 6). Very weak hybridization signals were detected in all three developmental stages, even using a probe labeled to high specific activity and with long exposure times. Additionally, although the hybridization signals were in the expected range size for the *Mi-asp1* mRNA they slightly differed among different samples. Since AP share high sequence identity, this result most probably indicates the hybridization of the labeled *Mi-asp1* probe with other AP genes. Alternatively, but less likely, this result could indicate an alternative processing of the *Mi-asp1* mRNA in the different developmental stages.

To unequivocally analyze the expression of *Mi-asp1*, an RT-PCR approach was adopted using specific primers for this gene. We detected *Mi-asp1* transcription in eggs, larvae and females through semi-quantitative RT-PCR analysis (Fig. 7A). To normalize the cDNA amount from the different life stages we used *β -actin*, a housekeeping gene with a constitutive expression. The graph in Figure 7B demonstrates at the end-point an expression of *Mi-asp1* mRNA approximately 4-fold higher in eggs, compared to larvae and females. Our results are in accordance to other previous reports (Table 1) that suggest a role for APs in

embryogenesis stages [43, 44]. Amplifications with genomic DNA templates and using the same set of primers used in the RT-PCR experiments resulted in higher molecular-weight fragments (data not shown) due to the presence of introns, confirming the absence of contaminant genomic DNA in the RT-PCR amplifications with cDNA templates.

3.5. *In silico* analysis of aspartic proteinase ESTs from *Meloidogyne* spp.

The Parasitic Nematode Project (<http://www.nematode.net/>) has generated an increasing number of ESTs, from 200,000 [45] to 400,000 [46] in just two years. Indeed, transcriptome data mining is a powerful strategy to study several biology aspects of nematodes [47]. Aiming to generate a global view of AP diversification and expression pattern, we performed a search in the RKN EST data banks and found 26 ESTs encoding APs (Table 2). The analyses were normalized by *tubulin* ESTs. The assumption of *tubulin* constitutive expression was confirmed, with a mean of one *tubulin* EST per a thousand of total ESTs, when comparing different developmental stages with large EST number. Five ESTs encoding APs were found in RKN eggs, two of *M. paranaensis*, one of each *M. chitwoodi*, *M. javanica* and *M. arenaria*. Twenty ESTs were identified in RKN L2, four of *M. incognita*, seven of *M. hapla* and nine of *M. arenaria*. Only one EST was detected in RKN females, specifically of *M. hapla*.

All the ESTs were assembled by CLUSTAL_W in order to define groups of identical, overlapping nucleotide sequences, which resulted in 10 ESTs clusters (Table 3), corresponding to different AP genes and/or non-overlapping regions, just inside the same gene. For each cluster, the consensus sequence was created with contiguous ESTs, submitted to BLASTx comparisons at NCBI, and related to the six *C. elegans* APs previously characterized [48]. Considering this *C. elegans* gene family, *asp-4* is more related to *asp-3*, which are cathepsin D-like APs. On the other hand, *asp-1*, *asp-2*, *asp-5* and *asp-6* are grouped

as pepsin-like APs. These two divisions of *C. elegans* APs are strongly correlated with chromosome localization and gene evolution theory. The *asp-3* and *asp-4* are located in chromosome X, while *asp-1*, *asp-2*, *asp-5* and *asp-6* are in V [48]. In fact, *asp-5* and *asp-6*, which encodes highly similar APs, are very near in chromosome V, with just 4-Kbp distance of each other [49]. What matches perfectly with the gene-family evolution model is the fact that there are three probably pseudo-genes (because they were not detected in dbEST), encoding complete or partial AP domain, inside this small region between *asp-5* and *asp-6*, and there is another putative pseudo-gene besides *asp-5* [49].

The clusters A11 and A12 encode different proteins, but very close related ones, corresponding to *asp-5*, *asp-6* or *asp-1*. The four ESTs of cluster A2 encode a N-terminal protein similar firstly to ASP-1, and secondly to both ASP-5 and ASP-6. The cluster D corresponds to C-terminal of ASP-1 homologue, without overlapping region with cluster A2 because of a predicted 111-bp region between them. The cluster E, despite of high similarity to plant APs, probably encodes an ASP-2 homologue.

The cluster C, formed by two identical ESTs, matches very well with arthropod APs besides Mi-asp1 (e-value of $7e-55$, and identity of 66%). However, in this case the cluster C sequence is unquestionable, and it does not encode Mi-asp1, but a close related homologue with 80% of similarity over an alignment of 155 amino acids. The cluster H with only one EST has the first BLASTx alignment with ASP-3 homologue of *C. briggsae* and the second with the own ASP-3 (e-value of $7e-25$ and identity of 53%). Cluster C and H are correlated to N-terminal of ASP-3, but they did not have an excellent match on nucleotide or peptide sequence. The first hypothesis to consider is that they encode different APs close related to ASP-3. However, the cluster H sequence shows adenosine and thymidine bias and dragging. Curiously, the cluster H is more similar to ASP-3 and cluster C to arthropod APs.

The cluster B corresponds to ASP-4 in *C. elegans* (e-value of 1e-64 and identity of 65%) and encodes the N-terminal of Mi-asp1, reported here. The cluster G with just one sequence encodes the C-terminal of Mi-asp1 therefore did not match with cluster B. This EST is not identical to Mi-asp1 probably because of sequencing errors, since all differences were in just one, short region. Cluster F seems related to Mi-asp1, despite of relatively small identity (e-value of 6e-24 and identity of 61%). Its only EST shows one region that matches with Mi-asp1 and other region with adenosine bias and nucleotide repetition, a characteristic signal of problems in sequencing.

Thus, it seems that all six *C. elegans* APs homologues are present in dbEST of RKN. The representatives of cathepsin D-like ASP-3 and ASP-4 denotes some correlation to egg stage. All three ASP-3 homologues plus two ASP-4 homologues were found in egg. Larvae and female also express ASP-4 homologues (including *Mi-asp1*). On the other hand, the correspondents to pepsinogen-like ASP-1, 2, 5 and 6 are found only in larvae stage. Additional research work is necessary to prove these observations, which could be best solved by real time PCR because its high discrimination and sensitivity capability.

4. DISCUSSION

Aiming engineering plant resistance against endoparasitic nematodes by introduction of an antiparasitic transgene, we looked for potential target proteinases in nematode pathogenesis and/or survival. In this way, we cloned a cDNA encoding an aspartic proteinase (AP) from the root-knot nematode (RKN) *Meloidogyne incognita*, named *Mi-asp1* (**DQ360827**). Several disruption strategies could be applied, so that the antiparasitic transgene could encode highly specific blocking molecules, such as protein AP inhibitor, pro-region of

cognate AP, antibody domain or dsRNA. Indeed, the aligned nematode AP orthologues shared so high sequence identity (Fig. 4) that we hypothesize a large action-spectra inhibition, where transgenic plants could be resistant to the majority of the species belonging to genera *Meloidogyne*, *Globodera* and *Heterodera*.

Throughout RT-PCR, 5'RACE and 3'RACE, the *Mi-asp1* was isolated from second-stage larvae (L2). The *Mi-asp1* encodes a zymogen with classical, identified prepro-format (Fig. 2). Cluster G from *M. hapla* L2 forms a contiguous sequence with *Mi-asp1* at the 5' end, which encodes a signal peptide of 19 amino acids with its cleavage site near to the predicted *Mi-asp1* one. Thus, the pro-region and the mature proteinase of *Mi-asp1* are complete, missing only the signal peptide. The amplification of three consensus sequences from L2 cDNA by RT-PCR, the hybridization pattern of four bands through Southern blot (Fig. 3), the differential size of hybridization bands from egg, larva and female RNAs (Fig. 6), the assembling of RKN ESTs encoding APs (Table 3) and finally the literature, all together strongly support the existence of an AP gene family in RKN, which expression is developmentally controlled (Fig. 6). Different intensity of hybridization bands suggests that *Mi-asp1* is a single-copy gene, like its orthologues [44, 48], which is close related to three other AP paralogues (Fig. 3).

Double, similar motifs structure suggests that an ancestor gene of a homodimeric protein evolved by gene duplication and fusion, which encodes a bi-lobular protein [50]. The high level of AP conservation suggests that this molecule may have evolved with a very low pressure to select phenotypic variants [30]. In the Eukarya domain, AP genes present a seven-exon structure almost ubiquitous and, normally, nematode AP show four to nine exons [50]. The six APs of *C. elegans* present respectively 1, 3, 4, 6, 4 and 3 exons [48].

According to Merops classification ([http:// www.merops.sanger.ac.uk/](http://www.merops.sanger.ac.uk/)), nematodes APs are grouped into two subfamilies belonging to the peptidase family A1 (i.e., pepsin

family) of the Clan AA (i.e., aspartic proteinases). One group is nemepsin-3 (A01.053) that was found only the *C. elegans* ASP-1. Other is nemepsin-2 (A01.068), which is represented by *C. elegans* ASP-4 and includes several nematode APs (Table 1). Currently, in the literature, this group is known as cathepsin D-like AP. Several nematode APs are only grouped as unassigned peptidases (A01.UPA), including the *C. elegans* ASP-2, 3, 5 and 6. However, some of these unassigned peptidases present a unifying, common feature, which is a cysteine-rich insertion of 30-35 amino acids. Thus, there is clearly another group well characterized and named as pepsinogen-like AP (or nemepsin) that includes *C. elegans* ASP-2 [48, 49], *Haemonchus contortus* HcPEP-1 [22] and HcPEP-2 [51], *N. americanus* Na-APR-2 or necepsin-I [42]. Others sequences show high identity by missing the cysteine-rich insertion, as in *C. elegans* ASP-5 and 6, *B. malayi* BmAsp-1 and BmAsp-3, *Strongyloides stercoralis* Strongyloidespepsin [52]. Vertebrate cathepsin D are sorted to the lysosome via the mannose-6-phosphate pathway [27]. In spite of nematode cathepsin D-like APs lack the conserved N-glycosylation site, known to be important in vertebrate cathepsin D targeting into lysosome, and because that seemed to be non-lysosomal [53, 54], they do localized in the lysosome [44].

Both cathepsin D-like and pepsinogen-like APs from animal-parasitic nematodes have been strongly correlated to digestion of host hemoglobin, skin and/or tissue. Comparisons of optimum pH and hemoglobin cleavage sites of both in *N. americanus* suggest an ordered pathway, in which cathepsin D-like, Na-APR-1, initiates the hemoglobin processing followed by pepsinogen-like, Na-APR-2 [29]. Several others reports proved the importance of AP in hemoglobin digestion in *H. contortus* [22]. The trematode *Schistosoma mansoni* also has a cathepsin D-like orthologue involved in digestion of hemoglobin [55, 56] within its gut [31]. The hookworm *N. americanus*, a human parasite that can non-efficiently interact with dogs, possess Na-APR-1 that cleaves human hemoglobin two to six-fold more than canine

hemoglobin [57]. On the other hand, the hookworm *A. caninum*, a canine parasite that can survive in human, possess Ac-APR-1 that cleaves better canine hemoglobin than the human one. Both cathepsin D-like orthologues are expressed in the intestinal microvillar border of blood-feeding adult hookworms [29]. Hemoglobin digestion for these animal-parasitic nematodes is the major driving force of proteolysis specificity by adaptive evolution [57]. Host-specific correlation was also observed in pepsinogen-like Na-APR-2 digestion of canine and human hemoglobin and serum proteins [42].

The excretory-secretory products of adult *N. americanus* showed proteolytic activities of aspartic, cysteine and serine proteinases suggesting an extracorporea digestion of tissue connective proteins (Brown 1995), proved lately be important for parasite skin penetration and tissue migration in host [58]. Normal skin pH of 5.5 is a selective characteristic of mainly APs than other proteinase class activity (Brown, 1999). Larvae of *N. americanus* are obligated skin penetrators. Actually, larval secretions hydrolyzed collagen types I, III, IV, and V, fibronectin, laminin, and elastin. However, larval penetration was significantly inhibited only by pepstatin A (54.8%), confirming the importance of the APs activity during the skin penetration process (Brown 1999). Mouse antibodies to Na-APR-2 have been shown to interfere with larval L3 migration and 50% did not penetrate excised hamster skin *in vitro* (ref. hook worm aspartic proteinase). Antibody against the HcPEP1 and 2 fractions significantly reduced *H. contortus* egg counts by 48% and worm numbers by 36% (Smith, 2003).

Some non-parasitic functions of APs have been correlated to developmental process beyond luminal and lysosomal digestion. Nematodes could use APs in hatching by hydrolyzing of egg shell protein, ecdysis and molting [59]. Despite of coelomata-ecdysozoa phylogenetic problem, some ecdysis-apparatus undoubtedly are quite similar between nematodes and arthropods. An insect histolytic-specific, lysosomal AP showed temporal

expression pattern correlated with edcysis phases, and spatial expression with fat body histolysis. During metamorphosis, occurs leakage of adipocytes in the hemolymph, followed by lysosome-mediated programmed cell death [60]. Indeed, cathepsin L cysteine proteinases were essential to embryogenesis and molting in free-living [61] and animal-parasitic nematodes [62, 63].

Proteolytic mechanisms have also been implicated in the process of ageing, besides others many neurodegenerative disorders [64]. Under normal situations, the lysosomal or extracellular, luminal cathepsin D is responsible for protein digestion inside the cell or intestine. Otherwise, responding to insult activation, cathepsin D invades cell cytoplasm and plays a major, indispensable role in necrotic cell death, especially during neurodegeneration [65]. Several human neurodegenerative disorders are related to Alzheimer's, Huntington's and Parkinson's diseases, amyotrophic lateral sclerosis, spinocerebellar ataxias, transmissible spongiform encephalopathies [65], and also occurs in epilepsy, stroke, hypoglycaemia and trauma [66, 67]. Therefore, pathological neuronal death can occur by apoptosis or necrosis, or both of them [68]. Despite apoptosis and necrosis show enormous morphological differences [69], new findings indicate that necrosis follows specific patterns with common pathways [65]. Likewise, specific proteins are activated in both apoptotic and necrotic cells. Surprisingly, some times the same cells can undergo either necrotic or apoptotic cell death in response to different stimuli. Indeed, cell fate can be decided by the insult intensity, in a continuum response [65].

Amazingly, necrosis cell death seems to be highly conserved from nematodes to human, and the best models to understand these human diseases have been *Drosophila melanogaster* and principally *C. elegans* [70]. Considering the last, through RNA interference assays, the expression of *asp-4* was correlated to neurodegeneration [71]. Detailed studies proved that both ASP-3 and ASP-4 are executioners of neuron cells responding to several

insults that trigger necrotic cell death. In a small degree, the ASP-1 also helps in necrosis, on the other hand ASP-2, ASP-5 and ASP-6 do not [43]. Depending on the insult-simulation employed, ASP-4 participation was the same of ASP-3 or slightly higher [43].

Following the 'calpain–cathepsin' hypothesis of necrotic cell death [72], first, some insults trigger calcium increase in cytoplasm such as hypoxia [73, 74], energy depletion [75]. Second, vacuolar H⁺-ATPase, a pump that acidifies lysosomes, promotes an intracellular acidification [76]. Third, activated calpains (intra-cellular, calcium-dependent cysteine proteinases) induce lysosomal membrane rupture and also attack cytoskeletal proteins such as spectrin and fodrin, and other structural, cellular components. In fact, lysosomes fuse and localize around the nucleus and finally the nucleus condenses and migrates to periphery and the lysosomes rupture [77]. Four, lysosomal escaping of terminator cathepsins D, in acidic cytoplasm, finally causes the collapse of cell. In addition, lysosomal cathepsin B, H and L (cysteine proteinases) have been related to delayed neurodegeneration in cerebral ischaemia [78].

In *C. elegans*, the specific calpains TRA-3 and CLP-1, each of them alone or in association, somehow activate the specific ASP-3 and/or ASP-4, which individually or combined proteolytic activity destroys the cell by necrosis [68]. Previous report detected high ASP-3 and ASP-4 expression in intestine of adult animals and low in body wall muscles, hypodermis, neurons, uterus and others [43]. They also detected expression in two-fold stage embryos, which corroborated with our RT-PCR results (Fig. 7). Programmed neuronal cell death is required during development to achieve the accurate wiring of the nervous system [68, 79].

Immunocytochemical analysis in rat brain revealed that high levels of lysosomal cathepsin D were detectable in embryonic tissues. On the other hand, in old rats during neurodegeneration cathepsin D was detected into the cytoplasm. Rat cathepsin D was

localized mainly in lysosomes of cerebral-cortical, young neurons, or in the cytosol of aged ones [80]. Cathepsin D knockout mice develop normally during the first 2 weeks, stop thriving in the third week and die in a state of anorexia at about day 26 [81]. Intriguingly, lysosome function was satisfactory but tissue homeostasis was not.

As described above, APs are involved in several other cellular processes beyond luminal digestion. Although we have no direct evidence of the function of *Mi-asp1*, the high sequence identity with other nematode APs related to embryogenesis suggests that its disruption could result in *M. incognita* control by impairment of nervous system formation during embryogenesis or metamorphosis during larval ecdysis. Subsequent studies are still necessary to localize the tissue and subcellular expression of *Mi-asp1*, define its host-protein substrates, and determine its role in plant parasitism.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Brazilian government EMBRAPA, CNPq and CAPES.

5. REFERENCES

- [1] Lilley CJ, Devlin P, Urwin PE, Atkinson HJ. Parasitic nematodes, proteinases and transgenic plants. *Parasitol Today* 1999;15:414-7.
- [2] Trudgill DL, Blok VC. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 2001;39:53-77.
- [3] Davis EL, Hussey RS, Baum TJ. Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends Parasitol* 2004;20:134-41.
- [4] Gheysen G, Fenoll C. Gene expression in nematode feeding sites. *Annu Rev Phytopathol* 2002;40:191-219.
- [5] Jasmer DP, Govere A, Smant G. Parasitic nematode interactions with mammals and plants. *Annu Rev Phytopathol* 2003;41:245-70.
- [6] Govere A, Rouppe van der Voort J, Roppe van der Voort C, Kavelaars A, Smant G, Schots A, et al. Naturally induced secretions of the potato cyst nematode co-stimulate the proliferation of both tobacco leaf protoplasts and human peripheral blood mononuclear cells. *Mol Plant Microbe Interact* 1999;12:872-81.
- [7] Baldwin JG, Nadler SA, Adams BJ. Evolution of plant parasitism among nematodes. *Annu Rev Phytopathol* 2004;42:83-105.
- [8] Bird DM, Kaloshian I. Are roots special? Nematodes have their say. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2003;62:115-123.

- [9] Atkinson HJ, Green J, Cowgill S, Levesley A. The case for genetically modified crops with a poverty focus. *Trends Biotechnol* 2001;19:91-6.
- [10] Lilley CJ, Urwin PE, Atkinson HJ. Characterization of plant nematode genes: identifying targets for a transgenic defence. *Parasitology* 1999;118 Suppl:S63-72.
- [11] Lilley CJ, Urwin PE, McPherson MJ, Atkinson HJ. Characterization of intestinally active proteinases of cyst-nematodes. *Parasitology* 1996;113 (Pt 4):415-24.
- [12] Michaud D, Cantin L, Bonade-Bottino M, Jouanin L, Vrain TC. Identification of stable plant cystatin/nematode proteinase complexes using mildly denaturing gelatin/polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1996;17:1373-9.
- [13] Fragoso RR, Batista JA, Neto OB, Grossi de Sa MF. Isolation and characterization of a cDNA encoding a serine proteinase from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Exp Parasitol* 2005;110:123-33.
- [14] Urwin PE, Lilley CJ, McPherson MJ, Atkinson HJ. Characterization of two cDNAs encoding cysteine proteinases from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Parasitology* 1997;114 (Pt 6):605-13.
- [15] Lilley CJ, Urwin PE, Atkinson HJ, McPherson MJ. Characterization of cDNAs encoding serine proteinases from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Mol Biochem Parasitol* 1997;89:195-207.

- [16] Neveu C, Abad P, Castagnone-Sereno P. Molecular cloning and characterization of an intestinal cathepsin L protease from the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2003;63:159-165.
- [17] Urwin PE, McPherson MJ, Atkinson HJ. Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs. *Planta* 1998;204:472-9.
- [18] Urwin PE, Lilley CJ, McPherson MJ, Atkinson HJ. Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *Plant J* 1997;12:455-61.
- [19] Urwin PE, Lilley CJ, Atkinson HJ. Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference. *Mol Plant Microbe Interact* 2002;15:747-52.
- [20] Silva FB, Batista JA, Marra BM, Fragoso RR, Monteiro AC, Figueira EL, et al. Pro domain peptide of HGCP-Iv cysteine proteinase inhibits nematode cysteine proteinases. *Genet Mol Res* 2004;3:342-55.
- [21] Redmond DL, Knox DP, Newlands G, Smith WD. Molecular cloning and characterisation of a developmentally regulated putative metallopeptidase present in a host protective extract of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 1997;85:77-87.
- [22] Longbottom D, Redmond DL, Russell M, Liddell S, Smith WD, Knox DP. Molecular cloning and characterisation of a putative aspartate

- proteinase associated with a gut membrane protein complex from adult *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 1997;88:63-72.
- [23] Pranav Kumar SK, Kulkarni VM. Insights into the selective inhibition of *Candida albicans* secreted aspartyl protease: a docking analysis study. *Bioorg Med Chem* 2002;10:1153-70.
- [24] Domingos A, Cardoso PC, Xue ZT, Clemente A, Brodelius PE, Pais MS. Purification, cloning and autoproteolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. *Eur J Biochem* 2000;267:6824-31.
- [25] Carginale V, Trinchella F, Capasso C, Scudiero R, Riggio M, Parisi E. Adaptive evolution and functional divergence of pepsin gene family. *Gene* 2004;333:81-90.
- [26] Coombs GH, Goldberg DE, Klemba M, Berry C, Kay J, Mottram JC. Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets. *Trends Parasitol* 2001;17:532-7.
- [27] Wittlin S, Rosel J, Hofmann F, Stover DR. Mechanisms and kinetics of procathepsin D activation. *Eur J Biochem* 1999;265:384-93.
- [28] Kalkanci A, Bozdayi G, Biri A, Kustimur S. Distribution of secreted aspartyl proteinases using a polymerase chain reaction assay with SAP specific primers in *Candida albicans* isolates. *Folia Microbiol (Praha)* 2005;50:409-13.
- [29] Williamson AL, Brindley PJ, Knox DP, Hotez PJ, Loukas A. Digestive proteases of blood-feeding nematodes. *Trends Parasitol* 2003;19:417-23.

- [30] Jean L, Pery P, Dunn P, Bumstead J, Billington K, Ryan R, et al. Genomic organisation and developmentally regulated expression of an apicomplexan aspartyl proteinase. *Gene* 2001;262:129-36.
- [31] Morales ME, Kalinna BH, Heyers O, Mann VH, Schulmeister A, Copeland CS, et al. Genomic organization of the *Schistosoma mansoni* aspartic protease gene, a platyhelminth orthologue of mammalian lysosomal cathepsin D. *Gene* 2004;338:99-109.
- [32] Hussey RS, Barker KR. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Report* 1973;57:1025-1028.
- [33] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403-10.
- [34] Marchler-Bauer A, Anderson JB, DeWeese-Scott C, Fedorova ND, Geer LY, He S, et al. CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Research* 2003;31:383-387.
- [35] Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 1997;10:1-6.
- [36] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673-80.

- [37] Page RDM. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 1996;12:357-358.
- [38] Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed: C.S. Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1982
- [39] Fourney R, Miyakoshi J, Day RI, Paterson M. Northern blotting: efficient RNA staining and transfer. *Focus* 1998;10:5-7.
- [40] Beynon RJ, Bond JS. *Proteolytic enzymes: a practical approach*: IRL Press, Oxford University PressMolecular; 1994
- [41] Williamson AL, Brindley PJ, Loukas A. Hookworm cathepsin D aspartic proteases: contributing roles in the host-specific degradation of serum proteins and skin macromolecules. *Parasitology* 2003;126:179-85.
- [42] Williamson AL, Brindley PJ, Abbenante G, Datu BJ, Prociv P, Berry C, et al. Hookworm aspartic protease, Na-APR-2, cleaves human hemoglobin and serum proteins in a host-specific fashion. *J Infect Dis* 2003;187:484-94.
- [43] Syntichaki P, Xu K, Driscoll M, Tavernarakis N. Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Nature* 2002;419:939-44.
- [44] Jolodar A, Fischer P, Buttner DW, Miller DJ, Schmetz C, Brattig NW. *Onchocerca volvulus*: expression and immunolocalization of a nematode

- cathepsin D-like lysosomal aspartic protease. *Exp Parasitol* 2004;107:145-56.
- [45] Parkinson J, Whitton C, Guiliano D, Daub J, Blaxter M. 200000 nematode expressed sequence tags on the Net. *Trends Parasitol* 2001;17:394-396.
- [46] Parkinson J, Mitreva M, Hall N, Blaxter M, McCarter JP. 400000 nematode ESTs on the Net. *Trends Parasitol* 2003;19:283-6.
- [47] Parkinson J, Mitreva M, Whitton C, Thomson M, Daub J, Martin J, et al. A transcriptomic analysis of the phylum Nematoda. *Nat Genet* 2004;36:1259-67.
- [48] Tcherepanova I, Bhattacharyya L, Rubin CS, Freedman JH. Aspartic proteases from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Structural organization and developmental and cell-specific expression of *asp-1*. *J Biol Chem* 2000;275:26359-69.
- [49] Geier G, Banaj HJ, Heid H, Bini L, Pallini V, Zwillig R. Aspartyl proteases in *Caenorhabditis elegans* - Isolation, identification and characterization by a combined use of affinity chromatography, two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and databank analysis. *European Journal of Biochemistry* 1999;264:872-879.
- [50] Jean L, Long M, Young J, Pery P, Tomley F. Aspartyl proteinase genes from apicomplexan parasites: evidence for evolution of the gene structure. *Trends Parasitol* 2001;17:491-8.

- [51] Smith WD, Skuce PJ, Newlands GF, Smith SK, Pettit D. Aspartyl proteases from the intestinal brush border of *Haemonchus contortus* as protective antigens for sheep. *Parasite Immunol* 2003;25:521-30.
- [52] Gallego SG, Slade RW, Brindley PJ. A cDNA encoding a pepsinogen-like, aspartic protease from the human roundworm parasite *Strongyloides stercoralis*. *Acta Trop* 1998;71:17-26.
- [53] Jolodar A, Miller DJ. Preliminary characterisation of an *Onchocerca volvulus* aspartic protease. *Int J Parasitol* 1997;27:1087-90.
- [54] Jolodar A, Miller DJ. Identification of a novel family of non-lysosomal aspartic proteases in nematodes. *Biochim Biophys Acta* 1998;1382:13-6.
- [55] Brindley PJ, Kalinna BH, Wong JY, Bogitsh BJ, King LT, Smyth DJ, et al. Proteolysis of human hemoglobin by schistosome cathepsin D. *Mol Biochem Parasitol* 2001;112:103-12.
- [56] Brinkworth RI, Prociv P, Loukas A, Brindley PJ. Hemoglobin-degrading, aspartic proteases of blood-feeding parasites: substrate specificity revealed by homology models. *J Biol Chem* 2001;276:38844-51.
- [57] Williamson AL, Brindley PJ, Abbenante G, Prociv P, Berry C, Girdwood K, et al. Cleavage of hemoglobin by hookworm cathepsin D aspartic proteases and its potential contribution to host specificity. *Faseb J* 2002;16:1458-60.

- [58] Brown A, Girod N, Billett EE, Pritchard DI. *Necator americanus* (human hookworm) aspartyl proteinases and digestion of skin macromolecules during skin penetration. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60:840-7.
- [59] Masler EP, Kovaleva ES, Sardanelli S. Aminopeptidase-like activities in *Caenorhabditis elegans* and the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. *J Helminthol* 2001;75:267-72.
- [60] Rabossi A, Stoka V, Puizdar V, Turk V, Quesada-Allue LA. Novel aspartyl proteinase associated to fat body histolysis during *Ceratitidis capitata* early metamorphosis. *Arch Insect Biochem Physiol* 2004;57:51-67.
- [61] Hashmi S, Britton C, Liu J, Guiliano DB, Oksov Y, Lustigman S. Cathepsin L is essential for embryogenesis and development of *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 2002;277:3477-86.
- [62] Britton C, Murray L. A cathepsin L protease essential for *Caenorhabditis elegans* embryogenesis is functionally conserved in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol* 2002;122:21-33.
- [63] Guiliano DB, Hong X, McKerrow JH, Blaxter ML, Oksov Y, Liu J, et al. A gene family of cathepsin L-like proteases of filarial nematodes are associated with larval molting and cuticle and eggshell remodeling. *Mol Biochem Parasitol* 2004;136:227-42.

- [64] Samara C, Tavernarakis N. Calcium-dependent and aspartyl proteases in neurodegeneration and ageing in *C. elegans*. *Ageing Res Rev* 2003;2:451-71.
- [65] Syntichaki P, Tavernarakis N. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat Rev Neurosci* 2003;4:672-84.
- [66] Yamashima T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog Neurobiol* 2000;62:273-95.
- [67] Yamashima T, Tonchev AB, Tsukada T, Saido TC, Imajoh-Ohmi S, Momoi T, et al. Sustained calpain activation associated with lysosomal rupture executes necrosis of the postischemic CA1 neurons in primates. *Hippocampus* 2003;13:791-800.
- [68] Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS Lett* 2005;579:3287-96.
- [69] Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3-15.
- [70] Driscoll M, Gerstbrein B. Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration. *Nat Rev Genet* 2003;4:181-94.
- [71] Tavernarakis N, Xu K, Driscoll M. Execution of necrotic-like cell death in *Caenorhabditis elegans* requires cathepsin D activity. *Nature Biotechnology* 2001;1:139SR.

- [72] Yamashima T. Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell Calcium* 2004;36:285-93.
- [73] Aki T, Mizukami Y, Oka Y, Yamaguchi K, Uemura K, Fujimiya T, et al. Phosphoinositide 3-kinase accelerates necrotic cell death during hypoxia. *Biochem J* 2001;358:481-7.
- [74] Aki T, Yoshida K, Fujimiya T. Phosphoinositide 3-kinase accelerates calpain-dependent proteolysis of fodrin during hypoxic cell death. *J Biochem (Tokyo)* 2002;132:921-6.
- [75] Aki T, Yamaguchi K, Fujimiya T, Mizukami Y. Phosphoinositide 3-kinase accelerates autophagic cell death during glucose deprivation in the rat cardiomyocyte-derived cell line H9c2. *Oncogene* 2003;22:8529-35.
- [76] Syntichaki P, Samara C, Tavernarakis N. The vacuolar H⁺ -ATPase mediates intracellular acidification required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Curr Biol* 2005;15:1249-54.
- [77] Artal-Sanz M, Samara C, Syntichaki P, Tavernarakis N. Lysosomal biogenesis and function is critical for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 2006;173:231-9.
- [78] Seyfried DM, Veyna R, Han Y, Li K, Tang N, Betts RL, et al. A selective cysteine protease inhibitor is non-toxic and cerebroprotective in rats undergoing transient middle cerebral artery ischemia. *Brain Res* 2001;901:94-101.

- [79] Lettre G, Hengartner MO. Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:97-108.
- [80] Bi X, Yong AP, Zhou J, Gall CM, Lynch G. Regionally selective changes in brain lysosomes occur in the transition from young adulthood to middle age in rats. *Neuroscience* 2000;97:395-404.
- [81] Saftig P, Hetman M, Schmahl W, Weber K, Heine L, Mossmann H, et al. Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *Embo J* 1995;14:3599-608.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Characterization of the aspartic proteolytic activity of *Meloidogyne incognita* females. (A) The control reactions, three biological repetitions in triplicate, measured as absorbance intensity from the hydrolyzed fluorogenic substrate N-succinyl-Arg-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Try-MCA, specific to aspartic proteinases. (B) Inhibitory essays with Pepstatin A, inhibitor specific of aspartic proteinases.

Fig. 2. Nucleotide sequence of the aspartic proteinase *Mi-asp1* cDNA isolated from *Meloidogyne incognita* larvae and predicted amino acid sequence. Coding sequence is shown in upper case letters and 3' untranslated sequence in lower case letters. The stop codon is underlined and in bold. A putative polyadenylation signal at the 3' UTR is underlined and the conserved *N*-glycosylation site of cathepsin E is double underlined. The signal peptide (pre-region) is in italic and the prodomain (pro-region) is boxed and in bold. Conserved motifs of catalytic aspartic residues, are circled and in bold. This sequence has been submitted to the GenBankTM databases under accession number **DQ360827**.

Fig. 3. Southern blot analysis of *Mi-asp1*. Genomic DNA (8 µg) from *Meloidogyne incognita* was digested with *Eco* RI, *Hind* III, *Xba* I, *Pst* I or *Nsi* I and probed with an α -[³²P]-labeled cDNA encompassing the complete ORF of *Mi-asp1*. DNA size markers are indicated in kilobase. Minor signal indicates enzymes that do not cut the *Mi-asp1* ORF, resulting in large hybridization bands if there was not any eventual restriction site in introns, which numbers and sequence are unknown. Scissor represents restriction enzyme that cut *Mi-asp1* ORF at two positions.

Fig. 4. Multiple sequence alignment of pro-mature Mi-asp1 from *Meloidogyne incognita* with other nematode cathepsin D-like aspartic proteinase using CLUSTAL_W and edited with BOXSHADE. The sources of aspartic proteinases sequences are *Ancylostoma ceylanicum* (**AAO22152**), *Ancylostoma caninum* (**AAB06575**), *Necator americanus* (**CAC00543**), *Caenorhabditis briggsae* (**CAE61399**), *Caenorhabditis elegans* (**NP_510191**), *Brugia malayi* (**BAC05689**) and *Onchocerca volvulus* (**AAD00524**). Shading indicates identity (black) or similarity (gray). The vertical line separates the pro-region from the mature proteinase. The conserved N-glycosylation site of cathepsin E is boxed, aspartic acid residues of active site are marked (▼), predicted disulfide bonds are numbered and sequence alignment gaps (-) are also shown. The numeration does not considerate pre-region (signal peptide).

Fig. 5. Radial dendrogram of the protein sequence alignment of selected cathepsin D orthologues from several, varied origins: *Meloidogyne incognita* (**DQ360827**), *Necator americanus* (**CAC00543**), *Ancylostoma ceylanicum* (**AAO22152**), *Ancylostoma caninum* (**AAB06575**), *Caenorhabditis briggsae* (**CAE61399**), *Caenorhabditis elegans* (**NP_510191**), *Brugia malayi* (**BAC05689**), *Onchocerca volvulus* (**AAD00524**), *Todarodes pacificus* (**BAD15111**), *Anopheles gambiae* (**XP_307785**), *Drosophila melanogaster* (**NP_652013**), *Gallus gallus* (**NP_990508**), *Homo sapiens* (**AAP36305**), *Xenopus tropicalis* (**NP_988964**) and *Danio rerio* (**AAH42316**). The sectors denote phylum divisions. Some nematode clades and families are depicted. The multiple alignment sequence and the dendrogram were constructed using CLUSTAL_W and edited with TREEVIEW. The scale bar represents 0.1 amino acid substitutions per site.

Fig 6. Northern blot analysis of *Mi-asp1*. Total RNA (22 µg) from eggs, L2 larvae and females of *Meloidogyne incognita* were hybridized with α -[³²P]dCTP-labeled *Mi-asp1* cDNA.

The amount of RNA loaded per lane, normalized by ethidium bromide staining of the 18S rRNA, is shown at the bottom. Arrowheads show hybridization-band centers.

Fig. 7. Developmental expression pattern of *Mi-aspl*. Through semi-quantitative RT-PCR, cDNAs from eggs, larvae and females of *Meloidogyne incognita* were used as templates in the PCR with 27, 29, 31, 33 and 35 amplification cycles. The amount of cDNA loaded per reaction was normalized with *actin* amplification, whose PCR mix was the same for *actin* and *Mi-aspl* amplifications. (A) RT-PCR amplification patterns obtained with specific primers for *Mi-aspl* and *actin*. (B) The graph of optic density analysis of PCR fragments stained in ethidium bromide, normalized between gels by molecular mass marker.

Table 1
Characterization of aspartic proteinases belonging to the subfamily, nematode-specific cathepsin D-like proteins (A01.068 or nemepsin-2, by MEROPS).

Nematode species	Sequence names	Accession numbers	Identity/ E-value	Localization		Developmental stage and/or function	References
				Subcellular	Histological		
<i>Caenorhabditis briggsae</i>	Hypothetical protein	CAE61399	64.073 % 1.2e-128	—	—	—	Unpublished
<i>Necator americanus</i>	<i>Na-APR-1</i> necepsin II	CAC00543	65.144 % 3.4e-128	—	Intestine, amphids and excretory/secretory glands	L3 and adult Hemoglobin, serum and skin proteins digestion	(Williamson et al., 2002)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>asp-4</i> R12H7.2	NP_510191	64.524 % 8.9e-128	Cytoplasm and lysosome	Intestine, hypodermis, muscle and neurons	Late embryogenesis and early L1 Neurodegeneration	(Syntichaki et al., 2002)
<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	<i>Ay-APR-1</i> AceyASP	AAO22152	63.593 % 9.6e-127	—	—	—	Unpublished
<i>Brugia malayi</i>	<i>BmAsp-2</i>	BAC05689	62.061 % 6.6e-121	—	—	—	Unpublished
<i>Ancylostoma caninum</i>	<i>Ac-APR-1</i> <i>Acasp1</i>	AAB06575	59.859 % 4.9e-116	—	Intestine, amphids and excretory/secretory glands	L3 and adult Hemoglobin, serum and skin proteins digestion	(Williamson et al., 2002)
<i>Onchocerca volvulus</i>	<i>Ov-APR</i>	AAD00524	59.950 % 1.2e-110	Lysosome	Intestine, hypodermis, and reproductive organs	Mature oocytes, early morulae and adult. Digestion, oogenesis, embryogenesis and degeneration	(Jolodar et al., 2004)
<i>Heterodera glycines</i>	<i>Hgg-33</i>	AAL78216	71.282 % 3.4e-65	Lysosome	Intestine	—	(Gao et al., 2001)

Identities and E-values measured by pairwise comparisons of just overlapping-region between Mi-asp1 and each protein sequence.

Table 2
Root-knot nematode ESTs found by search tool at NCBI plus BLASTn at Parasitic Nematode Project.

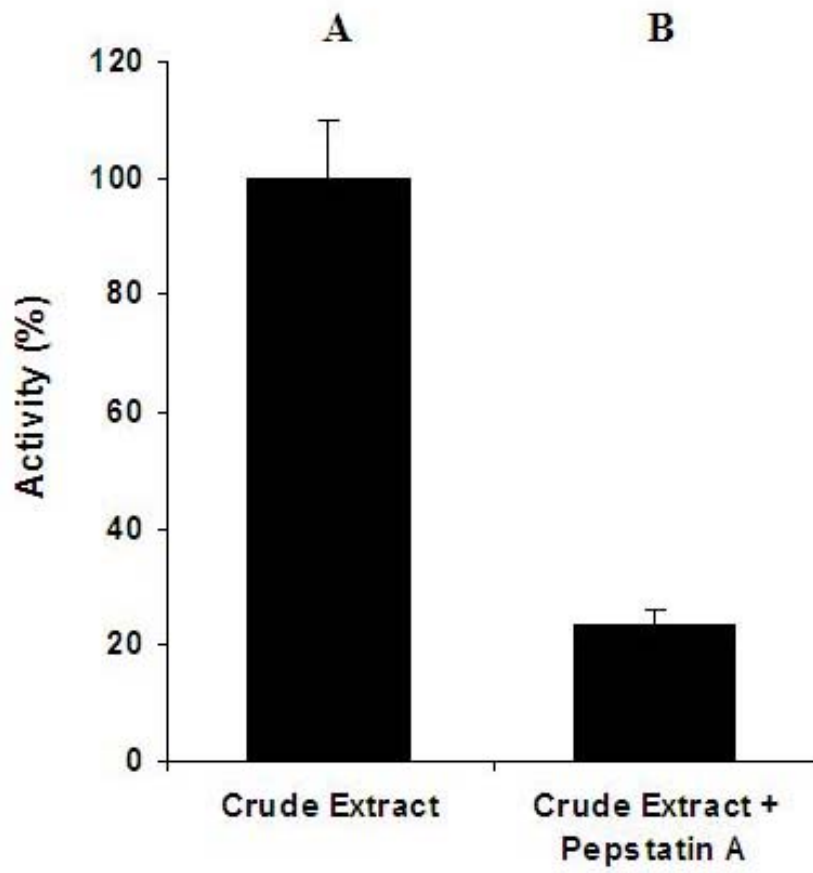
<i>Developmental stages of Meloidogyne spp.</i>							
	Egg	L2	L2/L3	L3/L4	Fem	Unknown	All
<i>Total</i>	35,153	24,150	788	1,946	10,849	134	73,020
Tubulin	36 (0.10)	21 (0.09)	4 (0.51)	4 (0.21)	12 (0.11)	–	77 (0.11)
Aspartic Proteinase	5 (0.01)	20 (0.08)	–	–	1 (0.01)	–	26 (0.04)

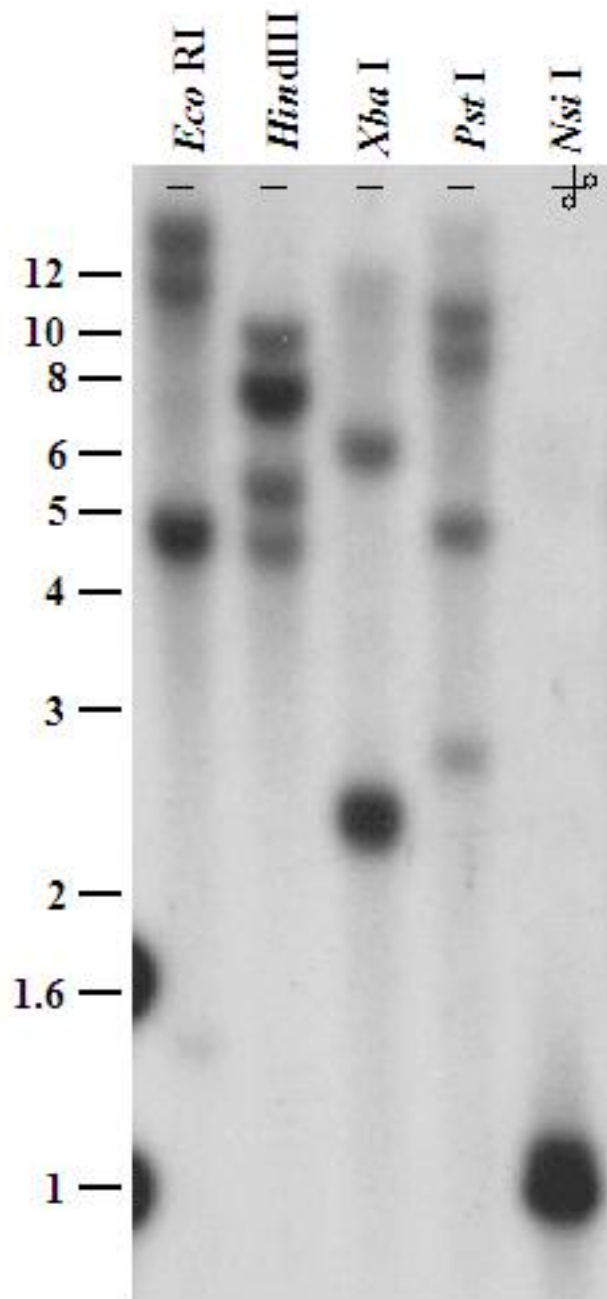
Numbers in parenthesis represent the percentage of each search result in relation of total EST.

Table 3
Analysis of clusters of root-knot nematode ESTs encoding APs from the GenBank.

EST Clusters^a	Nematode species	Life stages	GenBank accession	BLASTx results^b
A11 [ASP-1 or ASP-5]	<i>M. arenaria</i>	L2	CF357960	AAD09345
	<i>M. arenaria</i>	L2	CF357948	<i>Strongyloides</i>
	<i>M. arenaria</i>	L2	CF357852	<i>stercoralis</i>
	<i>M. arenaria</i>	L2	CF357235	(3e-05) 26%
	<i>M. arenaria</i>	L2	CF357186	
A12 [ASP-5, 1 or 6]	<i>M. arenaria</i>	L2	CF358275	AAD09345
	<i>M. arenaria</i>	L2	CF357624	<i>S. stercoralis</i>
	<i>M. arenaria</i>	L2	CF357084	(5e-09) 29%
A2 [ASP-1]	<i>M. hapla</i>	L2	CA997489	AAB65878
	<i>M. hapla</i>	L2	BU094921	<i>C. elegans</i>
	<i>M. hapla</i>	L2	BU094650	(4e-07) 29%
	<i>M. hapla</i>	L2	BQ836667	
B [ASP-4]	<i>M. javanica</i>	egg	BE578940	Mi-asp1
	<i>M. arenaria</i>	egg	BI746532	(1e-119) 97%
	<i>M. arenaria</i>	L2	CF358292	
	<i>M. incognita</i>	L2	AW829206	
	<i>M. incognita</i>	L2	AW870930	
	<i>M. incognita</i>	L2	AW871162	
C [ASP-3]	<i>M. paranaensis</i>	egg	CK242497	AAX33731
	<i>M. paranaensis</i>	egg	CK242452	<i>Blomia tropicalis</i> (2e-89) 76%
D [ASP-1]	<i>M. hapla</i>	L2	CN572742	CAA08899 <i>C. elegans</i> (4e-08) 30%
E [ASP-2]	<i>M. hapla</i>	L2	BU094593	BAA19607 <i>Cucurbita pepo</i> (3e-07) 28%
F [ASP-4]	<i>M. hapla</i>	female	CN576295	Mi-asp1 (6e-24) 61%
G [ASP-4]	<i>M. hapla</i>	L2	BQ836960	Mi-asp1 (4e-11) 80%
H [ASP-3]	<i>M. chitwoodi</i>	egg	CB931365	CAE65791 <i>C. briggsae</i> (3e-26) 56%

^aIn square brackets, the probably *C. elegans* AP analogues closest related to EST clusters, named A-H. ^bIn parenthesis, the e-value, followed by percentage of peptide sequence identity.





A. cey SVHRRRTFHQRRRVKSVLSRQPTLRERLLCGSSWEDYCKQR-YHYQKRLAKYAAN-----RASK 60
A. can SVHRRRTFHRRRVKSVLSRQPTLRERLLCGSSWEDYCKQR-YHYQKRLAKYAAI-----RATK 60
N. ame SVHRRRLFHQARRHVSVLSRQPTLRERLLCGSSWEDYCKQR-YHYQKRLAKYAAN-----RASK 60
C. bri -----LHHRHKQPKLRTISLRSQPTLRERLLCGSSTPTFAHRH-HGYQKRLAKYHGNH-----HFDK 56
C. ele -----LHWHRRQCKLRTVSLRSQPTLRERLLCGSSTPTFAHRH-HGY-KRYLKTINGNH-----HFDK 55
M. inc --IRHHHSRHHHVDRIISLRSMDTIRSMIAQVGSPTFAHRH-HDALRRRFAIAEKEGGQVDE 63
B. mal -----TQQNHETRIIRKQNSLRKHLLEESWPAYSRLINPQIQRRRIQQPMGL-----NLHF 53
O. vol -----EENHETRIALRQDSIRSHLLRAGSWEPYSSELVNPQIQRRRIQRRY-----EFGS 50

A. cey LQSTN---EIDELLRNYMDAQYFGTICIGTPAQNFTVIFDTGSSNLWVPSRKCPCFYDIACMLHHR 123
A. can LQSTN---EIDELLRNYMDAQYFGTICIGTPAQNFTVIFDTGSSNLWVPSRKCPCFYDIACMLHHR 123
N. ame LQSAN---EIDELLRNYMDAQYFGTICIGTPAQNFTVIFDTGSSNLWVPSRKCPCFYDIACMLHHR 123
C. bri YNGVVKPLGEIDELLRNYMDAQYFGTISIGTPEQNFTVIFDTGSSNLWVPSRKCPCFYDIACMLHHR 122
C. ele YQALNVEGEIDELLRNYMDAQYFGTISIGTPEQNFTVIFDTGSSNLWVPSRKCPCFYDIACMLHHR 121
M. inc ENAVVCIIGEIDELLRNYMDAQYFGTISIGTPEQNFTVIFDTGSSNLWVPSRKCPCFYDIACMLHHR 129
B. mal TSEFNAISGEIDELLRNYMDAQYFGTISIGTPEQNFTVIFDTGSSNLWVPSRKCPCFYDIACMLHHR 119
O. vol RSQKSIAGGETDEVLRNYMDAQYFGTISIGTPEQNFTVIFDTGSSNLWVPSRKCPCFYDIACMLHHR 116

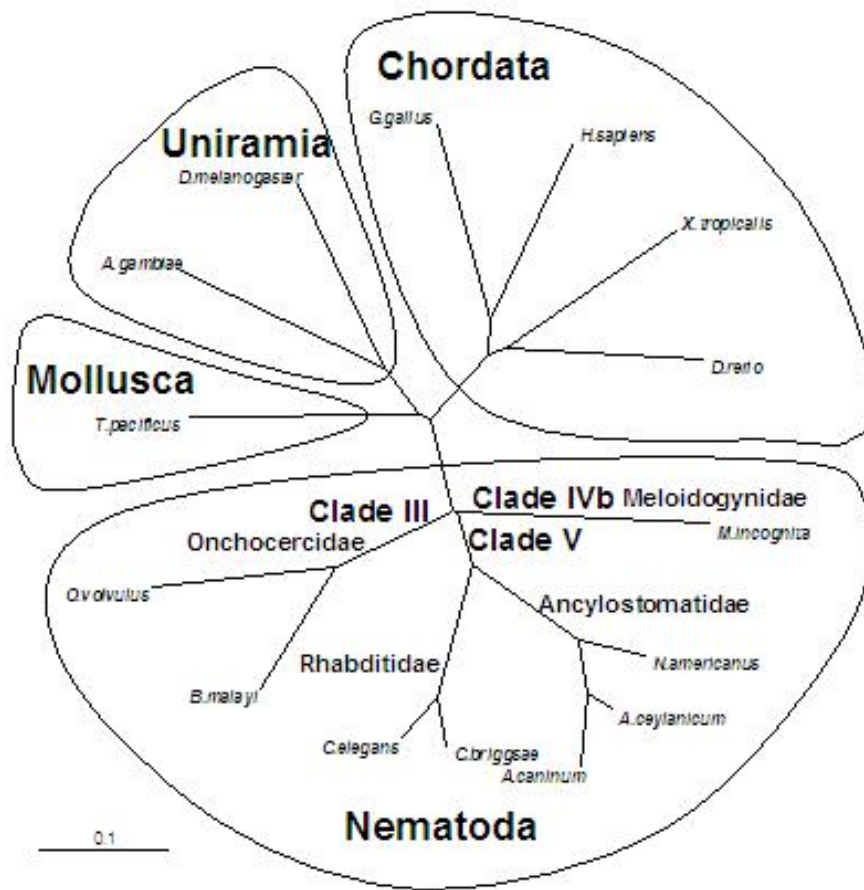
A. cey DSGSSSTYKEDGRMAIQYGTGSMRGFISKDNVCIAGICAEQPPFAEATSEPGITFFAAKFDGILG 189
A. can DSGSSSTYKEDGRMAIQYGTGSMRGFISKDNVCIAGICAEQPPFAEATSEPGITFFAAKFDGILG 189
N. ame DSGSSSTYKEDGRMAIQYGTGSMRGFISKDNVCIAGICAEQPPFAEATSEPGITFFAAKFDGILG 189
C. bri DSGSSSTYKEDGRMAIQYGTGSMRGFISKDNVCIAGICAEQPPFAEATSEPGITFFAAKFDGILG 188
C. ele DSGSSSTYKEDGRMAIQYGTGSMRGFISKDNVCIAGICAEQPPFAEATSEPGITFFAAKFDGILG 187
M. inc DSGSSSYRDDGRMCIQYGTGSMRGFISKDNVCIAGICAEQPPFAEATSEPGITFFAAKFDGILG 195
B. mal KGTSTSTYKEDGRMCIQYGTGSMRGFISKDNVCIAGICAEQPPFAEATSEPGITFFAAKFDGILG 185
O. vol KGTSTSTYKEDGRMCIQYGTGSMRGFISKDNVCIAGICAEQPPFAEATSEPGITFFAAKFDGILG 182

A. cey MAFFEISVVLGVFPVFHTIEQKKVPSVVFAPWLNRRNPDSELGGEITGGMDRRYVEPITWTPVTR 255
A. can MAFFEISVVLGVFPVFHTIEQKKVPSVVFAPWLNRRNPDSELGGEITGGMDRRYVEPITWTPVTR 255
N. ame MAFFEISVVLGVFPVFHTIEQKKVPSVVFAPWLNRRNPDSELGGEITGGMDRRYVEPITWTPVTR 255
C. bri MAFFEISVVLGVFPVFHTIEQKKVPSVVFAPWLNRRNPDSELGGEITGGMDRRYVEPITWTPVTR 254
C. ele MAFFEISVVLGVFPVFHTIEQKKVPSVVFAPWLNRRNPDSELGGEITGGMDRRYVEPITWTPVTR 253
M. inc MAFFEISVVLGVFPVFHTIEQKKVPSVVFAPWLNRRNPDSELGGEITGGMDRRYVEPITWTPVTR 261
B. mal MAFFEISVVLGVFPVFHTIEQKKVPSVVFAPWLNRRNPDSELGGEITGGMDRRYVEPITWTPVTR 251
O. vol MAFFEISVVLGVFPVFHTIEQKKVPSVVFAPWLNRRNPDSELGGEITGGMDRRYVEPITWTPVTR 248

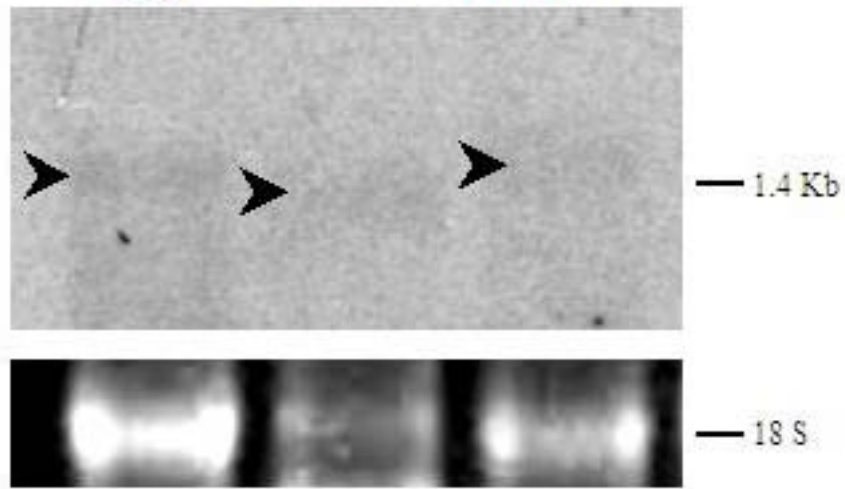
A. cey RGYWQFRMDKVQGS-STSTACPF---NGCQAIADTGTSLIAGPRAQVEAIQKFI GAEPILMGEYMIIP 317
A. can RGYWQFRMDKVQGS-STSTACPFNEPSCCQAIADTGTSLIAGPRAQVRAEENRSLIIEEYVEGEYMIIP 320
N. ame RGYWQFRMDKVQGS-SBSTACPF---NGCQAIADTGTSLIAGPRAQVEAIQKFI GAEPILMGEYMIIP 317
C. bri RGYWQFRMDKVQGS-SGVLCGS---NGCQAIADTGTSLIAGPRAQIEAIQKFI GAEPILMGEYMIIP 315
C. ele RGYWQFRMDKVQGS-SGVLCGS---NGCQAIADTGTSLIAGPRAQIEAIQKFI GAEPILMGEYMIIP 314
M. inc RGYWQFRMDKVQGS-SGVLCGS---NGCQAIADTGTSLIAGPRAQIEAIQKFI GAEPILMGEYMIIP 324
B. mal RGYWQFRMDKVQGS-SGVLCGS---NGCQAIADTGTSLIAGPRAQIEAIQKFI GAEPILMGEYMIIP 313
O. vol RGYWQFRMDKVQGS-SGVLCGS---NGCQAIADTGTSLIAGPRAQIEAIQKFI GAEPILMGEYMIIP 310

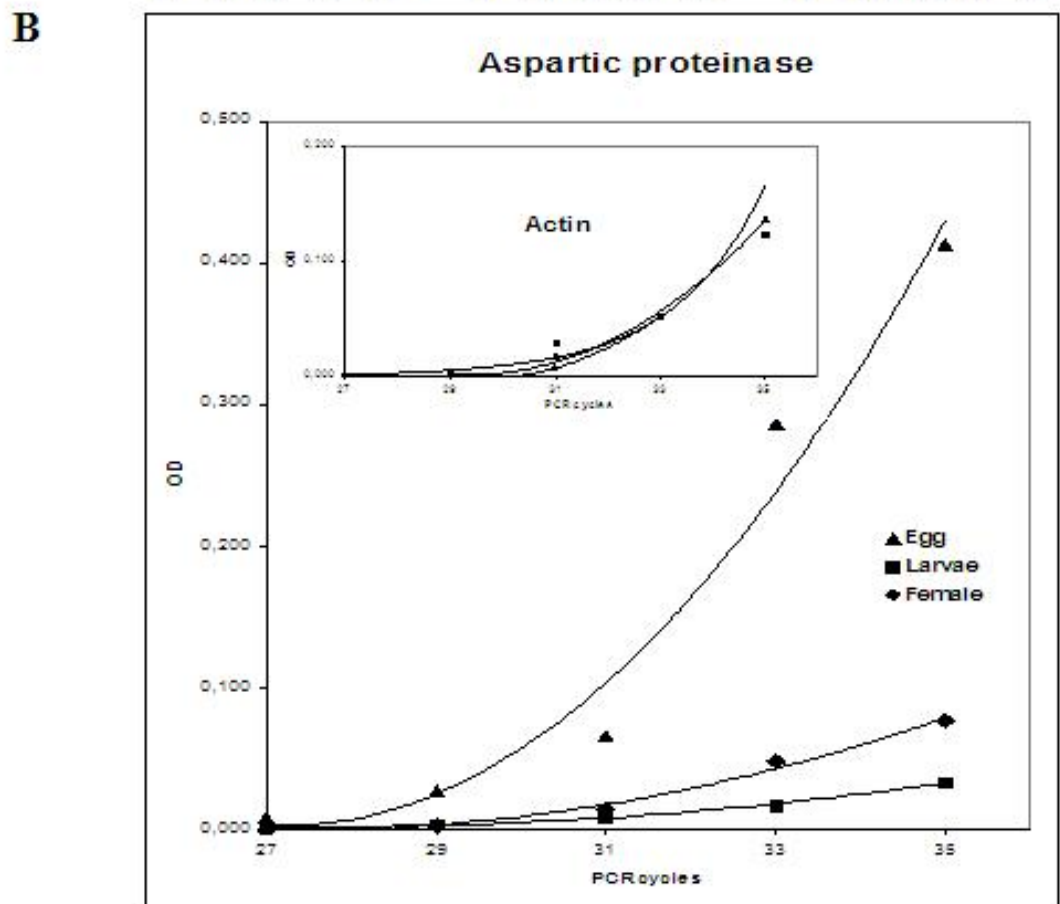
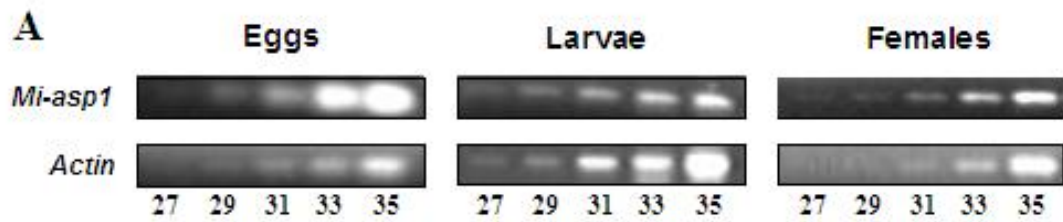
A. cey CDRVPSLPDVSFPIIDGRTFTLKGEDYVLRVAGGKSIKLSGFMGMDPERIGELSWILGDVFIGRYY 383
A. can CDRVPSLPDVSFPIIDGRTFTLKGEDYVLRVAGGKSIKLSGFMGMDPERIGELSWILGDVFIGRYY 386
N. ame CDRVPSLPDVSFPIIDGRTFTLKGEDYVLRVAGGKSIKLSGFMGMDPERIGELSWILGDVFIGRYY 383
C. bri CDRVPSLPDVSFPIIDGRTFTLKGEDYVLRVAGGKSIKLSGFMGMDPERIGELSWILGDVFIGRYY 381
C. ele CDRVPSLPDVSFPIIDGRTFTLKGEDYVLRVAGGKSIKLSGFMGMDPERIGELSWILGDVFIGRYY 380
M. inc CDRVPSLPDVSFPIIDGRTFTLKGEDYVLRVAGGKSIKLSGFMGMDPERIGELSWILGDVFIGRYY 390
B. mal CDRVPSLPDVSFPIIDGRTFTLKGEDYVLRVAGGKSIKLSGFMGMDPERIGELSWILGDVFIGRYY 379
O. vol CDRVPSLPDVSFPIIDGRTFTLKGEDYVLRVAGGKSIKLSGFMGMDPERIGELSWILGDVFIGRYY 376

A. cey TVFDVGCARRLGFAQAQKSEDCYFVGPVAVRRNK-----FSEDSGSDDEDVFTL----- 430
A. can TVFDVGCARRLGFAQAQKSEDCYFVGPVAVRRNK-----FSEDSGSDDEDVFTL----- 433
N. ame TVFDVGCARRLGFAQAQKSEDCYFVGPVAVRRNK-----LQEDSGSDDEDVFTL----- 430
C. bri TVFDVGCARRLGFAQAQKSEDCYFVGPVAVRRNK-----VFDNE-SEESSEQDDQ----- 429
C. ele TVFDVGCARRLGFAQAQKSEDCYFVGPVAVRRNK-----VFDNE-SEESSEQDDQ----- 427
M. inc TVFDVGCARRLGFAQAQKSEDCYFVGPVAVRRNK-----VFDNE-SEESSEQDDQ----- 449
B. mal TVFDVGCARRLGFAQAQKSEDCYFVGPVAVRRNK-----VFDNE-SEESSEQDDQ----- 428
O. vol TVFDVGCARRLGFAQAQKSEDCYFVGPVAVRRNK-----VFDNE-SEESSEQDDQ----- 394



Eggs Larvae Females





ANEXO V.ii.

Isolation and characterization of a cDNA encoding a serine proteinase from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*

Rodrigo da Rocha Fragoso^{a,b}, João Aguiar Nogueira Batista^a,
Osmundo Brilhante Oliveira Neto^{a,b}, Maria Fátima Grossi de Sá^{a,*}

^a EMBRAPA, Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil

^b Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

Received 23 August 2004; received in revised form 14 February 2005; accepted 16 February 2005

Available online 23 March 2005

Abstract

This report describes the first serine proteinase gene isolated from the sedentary nematode *Meloidogyne incognita*. Using degenerate primers, a 1372 bp cDNA encoding a chymotrypsin-like serine proteinase (*Mi-ser1*) was amplified from total RNA of adult females by RT-PCR and 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends. The deduced amino acid sequence of *Mi-ser1* encoded a putative signal peptide and a prodomain of 22 and 33 amino acids, respectively, and a mature proteinase of 341 amino acids with a predicted molecular mass of 37,680 Da. Sequence identity with the top serine proteinases matches from the databases ranged from 23 to 27%, including sequences from insects, mammals, and other nematodes. Southern blot analysis suggested that *Mi-ser1* is encoded by a single or few gene copies. The pattern of developmental expression analyzed by Northern blot and RT-PCR indicated that *Mi-ser1* was transcribed mainly in females. The domain architecture composed of a single chymotrypsin-like catalytic domain and the detection of a putative signal peptide suggested a digestive role for *Mi-ser1*.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Index Descriptors and Abbreviations: RKN, root-knot nematode; RACE, rapid amplification of cDNA ends; EST, expressed sequence tag; RT-PCR, reverse transcription and polymerase chain reaction

Keywords: cDNA cloning; *Meloidogyne*; Nematode; Serine proteinase

1. Introduction

Plant parasitic nematodes are economically important pests for several crops worldwide. Three endoparasitic sedentary genera—*Globodera*, *Heterodera* (cyst nematodes), and *Meloidogyne* (root-knot nematodes, RKN)—cause enormous economic losses to world agriculture (Sasser, 1980) estimated at US \$100 billion annually (Lilley et al., 1999). Among the species involved, *Meloidogyne incognita*, the southern root-knot nematode, is considered to be the most important because it is

the most widely distributed phytonematode species (Sasser et al., 1983; Trudgill, 1995) and has an extensive host range (Ehwaeti et al., 1999; Jepson, 1987). As a result, this species is probably the major pathogen responsible for damage to plants worldwide (Trudgill and Blok, 2000).

The current agricultural practices of crop rotation and chemical applications are usually expensive, inefficient, and environmentally hazardous (Shomaker and Been, 1999). Indeed, the use of highly toxic nematicides may result in environmental contamination or human intoxication (Jeyaratnam, 1990). A better solution has been found in plant-resistant genotypes, and several genes have been included in genetic breeding programs of perennial and annual plants in attempts to improve

* Corresponding author.

E-mail address: fatimasa@cenargen.embrapa.br (M.F. Grossi de Sá).

the control of these nematodes by environmentally safe practices (Roberts, 1992). However, the breeding of resistant plants by classic genetics is limited by the reduced number of naturally resistant sources and sexual incompatibility among different species. Thus, plant transformation through genetic engineering is a promising alternative for the development of nematode-resistant plants (Atkinson et al., 2001).

Proteinases are important targets for intervention because of their fundamental roles in many metabolic processes and in host–parasite interactions (Beynon and Bond, 1994). Proteinases of the four major classes are present in parasitic helminths (Sakanari, 1990) and several roles have been suggested for these enzymes in the mechanisms of parasitism, including tissue invasion, evasion of the host immune system, and nourishment of the parasite (Coombs and Mottram, 1997). Anti-feeding strategies in natural host–parasite interactions involve the production of enzymatic inhibitors, such as seen in plants that are resistant or tolerant to insects or pathogens (Carlini and Grossi-de-Sa, 2002). The accumulation of serine proteinase inhibitors detected in subterranean organs of solanaceous plants could contribute to the plant defense against RKN (Trudgill and Blok, 2000).

Serine and cysteine proteinases predominate in plant nematode intestines (Lilley et al., 1996) whereas aspartic, cysteine, and metallo-proteinases predominate in animal nematode intestines (Chappell and Dresden, 1986; Longbottom et al., 1997; Redmond et al., 1997). All of the three sedentary endoparasitic genera show marked proteolytic activity. A protein homogenate of females of the potato cyst nematode *Globodera pallida* contains a major serine and a minor cysteine proteinase (Koritsas and Atkinson, 1994). The different species of RKN vary in proteinase composition and affinity, as shown by proteolytic assays using crude extracts from *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* (Michaud et al., 1996). Studies with *Heterodera glycines* resulted in the isolation of genes encoding three serine proteinases, *hgsp-I*, *hgsp-II*, and *hgsp-III* (Lilley et al., 1997) and two cysteine proteinases, *hgcp-I* and *hgcp-II* (Urwin et al., 1997a).

The induction of resistance to nematodes in host plants through the expression of proteinase inhibitors has been described (Urwin et al., 1997b, 1998). Thus, transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing a mutant of a rice cysteine proteinase inhibitor (Oc-I Δ D86) were resistant to *Heterodera schachtii* and *M. incognita* (Urwin et al., 1997b). Major effects in the parasites included reduced female size and fecundity as a result of undernourishment. Enhanced resistance was obtained by using a dual gene construct containing a serine proteinase inhibitor, CpTI (cowpea trypsin inhibitor from *Vigna unguiculata*), and Oc-I Δ D86 (Urwin et al., 1998).

As part of an effort to develop nematode-resistant transgenic plants based on an anti-feeding strategy, we

have isolated the genes encoding proteinases of *M. incognita*. A cDNA encoding a serine proteinase from *M. incognita* females was isolated using RT-PCR and RACE and named *Mi-ser1*. Disruption of the proteinase activity encoded by *Mi-ser1* may represent a target for *M. incognita* controlling.

2. Material and methods

2.1. Growth and collection of *M. incognita*

Nematodes were propagated on tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots and harvested by standard protocols (Hussey and Barker, 1973) at three life stages: eggs, second stage juveniles (J2), and females. The roots were triturated in 0.5%(v/v) sodium hypochlorite and the egg-containing fraction was separated using 400-mesh sieves and suspended in kaolin prior to centrifugation at 2500g for 10 min. The pellet was resuspended in 50%(w/v) sucrose, centrifuged at 2500g for 1 min, and the eggs were collected from the supernatant on a 500-mesh sieve. Juveniles were obtained from eggs hatched in plastic trays with distilled water and were concentrated by centrifugation at 2500g for 30 min. Females were obtained from roots incubated for 12 h in 40%(v/v) pectinase and then triturated. The 100-mesh fraction was precipitated with kaolin and further purified as described for the eggs, except that 40%(w/v) sucrose was used.

2.2. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplifications

Reverse transcription of total RNA (2 μ g) from eggs, J2, and females of *M. incognita* was done with an oligo(d(T))-anchor primer and AMV-RT (Boehringer Mannheim), according to the manufacturer's instructions. PCR amplifications were done using the degenerate primers Ser1 (5'ACTGCTGCHCAYTG3') and Ser2inv (5'GGRCCACCAGAGTCRCC3'), based on conserved motifs present beside the histidine and serine catalytic residues of serine proteinases. The PCR system (final volume, 25 μ l) contained 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 2.0 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, and 400 nM of each primer. The PCR program consisted of an initial denaturation at 94 °C for 1 min, 30 cycles of amplification at 94 °C for 20 s, 42 °C for 20 s, and 72 °C for 30 s, followed by a final elongation step at 72 °C for 2 min. An aliquot of the PCR product was then used for a second round of amplification using the same conditions.

2.3. 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends

The 5' end of the cDNA fragment derived from the RT-PCR was amplified by 5' rapid amplification of

cDNA ends (RACE) using a 5'/3' RACE kit (Boehringer Mannheim) according to the manufacturer's instructions. The antisense primer Mi-sera (5'GTGTGCAGT TGGCCGCT3') was used for reverse transcription and the antisense primers Mi-serb (5'AACAGCAGGCGG TCGGTC3') and Mi-serc (5'GCGACGCATGTCCA GTAC3') were used for the first and second round of a nested PCR, respectively. The first-round PCR conditions were a denaturation step at 94 °C for 1.5 min, 30 cycles of 94 °C for 45 s, 42 °C for 45 s, and 72 °C for 1.5 min, and a final elongation step at 72 °C for 5 min. The same conditions were used in the second PCR round, except that the annealing temperature was 52 °C. A second 5' RACE was done using Mi-serc for reverse transcription and two additional antisense primers, Mi5serd (5'GGTCCCACCGTACGCC3') and Mi5sere (5'CTGCTTAAGACAGCTGG3'), for the nested PCR amplification. The reaction conditions were the same as described above, except that the annealing temperature was 45 °C in the first PCR round and 55 °C in the second round. The complete cDNA sequence was obtained by 3' RACE using the nested sense primers derived from the 5' RACE sequence, Mi3serf (5'CAGC GGCCAACTGCACAC3') and Mi3serg (5'GGGAA CACCATCGAATG3'). PCR amplifications were done with a denaturation step at 94 °C for 1.5 min, 30 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 1.5 min, and a final elongation at 72 °C for 5 min.

2.4. DNA sequencing and sequence analysis

The amplified cDNA fragments were cloned into pGEM-T Easy (Promega) and sequenced in an automated ABI DNA sequencer. Computer analyses of the sequences were done using the GCG software package (Genetics Computer Group, University of Wisconsin). Databank comparisons were done using the BLASTx software (Altschul et al., 1990) from the NCBI databank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The Conserved Domain Database search (CDD-Search) from the NCBI site was used to compare motif identity and similarity with known conserved domains (Marchler-Bauer et al., 2003). Identification of the signal peptide sequence, including cleavage-site localization, was done using the SignalP software (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) of the Prediction Server of the Center for Biological Sequence Analysis, BioCentrum-DTU Technical, University of Denmark (Nielsen et al., 1997). Sequence alignments were done using CLUSTAL W software (Thompson et al., 1994) and were edited with the BOXSHADE software (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html); the dendrograms were edited with the TreeView software. The molecular mass and predicted pI of the deduced protein were determined by the Protein Machine software available at the ExPasy site (<http://us.expasy.org/tools/>).

2.5. Southern blotting analysis

Genomic DNA from *M. incognita* eggs was isolated according to Sambrook et al. (1989) and digested (8 µg per digestion) with *EcoRI*, *HindIII*, *XbaI*, and *NsiI*. The DNA digests were separated on a 0.8% agarose gel and transferred to a Hybond N⁺ nylon membrane (Amersham Pharmacia Biotech, UK) using standard procedures (Sambrook et al., 1989). The *Mi-ser1* cDNA was labeled with α-[³²P]dCTP to a high specific activity using the Megaprimer DNA-labeling kit (Amersham Pharmacia Biotech) and used to probe the blot. The membrane was washed to a stringency of 0.1 × SSC with 0.2% SDS at 65 °C.

2.6. Analysis of expression by Northern blot and RT-PCR

Total RNA from *M. incognita* eggs, J2, and females was purified using an RNeasy RNA extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol and stored at -80 °C. Gel electrophoresis (Fourney et al., 1998) of total RNA from each developmental stage (22 µg per lane) and the hybridizations were done according to standard procedures (Sambrook et al., 1989). The membrane was washed to a stringency of 0.1 × SSC at 65 °C. The signal intensities were compared using optical densities determined by Zero-Dscan software (Scanalytics) from digital images obtained with a Duoscan T1200 (AGFA) transparency scanner.

RT-PCR was done using internal primers specific for actin or *Mi-ser1* and, as a template, a 1:20 dilution of reverse transcribed cDNA from each developmental stage. cDNAs were obtained as described for the RT-PCR amplifications. A control was done using the same set of primers used in the RT-PCR and genomic DNA as template.

2.7. Database searching and sequence retrieval for nematode serine proteinases

The nucleotide sequence of *Mi-ser1* was used as a query in BLAST searches of the *Caenorhabditis elegans* genome at WormBase (<http://www.wormbase.org>) and of the plant-parasite nematode dbEST at the Nematode Center (<http://www.nematode.net>). A GenBank search at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) was also done using as a query a combination of words that defined nematode species, developmental stage, and gene annotation.

3. Results

3.1. Cloning of a cDNA encoding a putative serine proteinase from *M. incognita* females

Preliminary results using in vitro assays with fluorogenic substrates and specific inhibitors revealed high

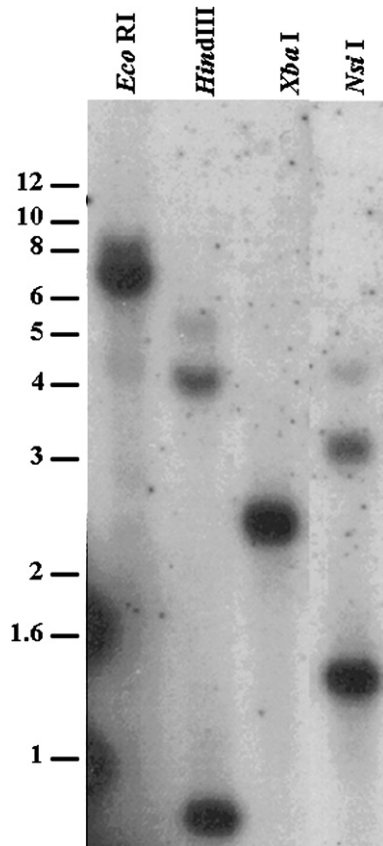


Fig. 2. Southern blot analysis of *Mi-ser1*. Genomic DNA (8 μ g) from *M. incognita* was digested with *Eco*RI, *Hind*III, *Xba*I or *Nsi*I and probed with an α - 32 P-labeled cDNA fragment encompassing the complete ORF of *Mi-ser1*. DNA size markers are indicated in kilobase.

pattern suggests *Mi-ser1* is encoded by a single or few gene copies in the haploid genome of *M. incognita*.

3.2. Characterization of the deduced amino acid sequence of *Mi-ser1*

The *Mi-ser1* cDNA had a single 1188-bp ORF encoding a putative 396-amino acid protein (Fig. 1). Comparison of the deduced *Mi-ser1* protein sequence with other sequences from the databanks using BLASTp showed 23–27% identity to a multitude of serine proteinases, including chymotrypsins, trypsin, plasminogens, coagulation IX factors, enteropeptidases, enterokinases, elastases, kallikreins, and arginine esterase precursors, all from animal species (data not shown). Despite the large repertoire of physiological functions of these proteins, all of them share a closely related serine proteinase domain (Krem et al., 1999) and belong to the chymotrypsin-like clan of serine proteinases (Hedstrom, 2002). Domain analysis of *Mi-ser1* using the CDD-Search (Conserved Domain Database) yielded an *e* value of $1e-27$ relative to a trypsin-like serine proteinase (cd00190) and $2e-17$ relative to trypsin (pfam00089). An analysis using the CDART (Conserved Domain Archi-

tecture Retrieval Tool) indicated that *Mi-ser1* possesses a single chymotrypsin domain.

Sequence analysis of *Mi-ser1* revealed a putative signal peptide of 22 residues, a prodomain of 33 residues, and a mature proteinase of 341 residues (Fig. 1), with a predicted molecular mass of 37,680 Da. Using SignalP software (Nielsen et al., 1997), the N-terminal of *Mi-ser1* was found to share high similarity with several eukaryote signal peptides, and had a putative cleavage site at residues 22–23 (VVC–EK). The N-terminal residues of mature serine proteinases are highly conserved, with the R–IVGG motifs being the most commonly found in vertebrate and invertebrate trypsin (Muharsini et al., 2001; Valaitis et al., 1999). Comparison of the N-terminal of the mature *Mi-ser1* proteinase with other serine proteinases indicated a zymogen activation site at residues 55–56 (R–AYGG).

Non-redundant nematode sequences of serine proteinases from different families were used for the multiple alignment (Fig. 3). The amino acid residues of the catalytic triad of serine proteinases are found in conserved motifs and *Mi-ser1* catalytic triad residues were identified in these consensus regions (His46, Asp119, and Ser221). However, in contrast to most serine proteinases that normally have three conserved disulfide bridges (Jiang and Kanost, 2000; Mulenga et al., 2001), only two were identified in *Mi-ser1* (Fig. 3). The disulfide bridge that was absent in *Mi-ser1*, corresponding to the third pair in the figure, has a key role in active site formation when the residues determining substrate specificity are placed together in the oxyanion hole (Yoshida et al., 1998).

Conserved residues of S1 site specificity (marked by losangs in Fig. 3), lining the substrate binding pocket that contribute to the trypsin specificity (Asp, Gly, and Gly) or to the chymotrypsin specificity (Ser, Gly, and Gly), were not identified in *Mi-ser1* (Czapinska and Otlewski, 1999; Krem et al., 1999; Perona and Craik, 1997). The primary specificity residue in *Mi-ser1* was Gly215 which indicates other specificity rather than trypsin or chymotrypsin (Bangyeekhun et al., 2001; Chiou et al., 1998; Kawamoto et al., 1999; Mazumdar-Leighton et al., 2000; Zhu et al., 2000). In addition, the Ala244 and Asp262 may tune the S1 site entrance which suggests a binding to small aliphatic residues at P1 site of the substrate, a characteristic of elastases (Hedstrom, 2002).

3.3. Expression of *Mi-ser1* mRNA in the developmental stages of *M. incognita*

The cDNA fragment containing the *Mi-ser1* ORF was used to probe the developmental expression of the gene during the nematode life cycle. Northern blot analysis (Fig. 4A) revealed a single band of approximately 1.4 kb, in accordance with the size of the amplified *Mi-ser1* cDNA. Expression was detected mainly in eggs and

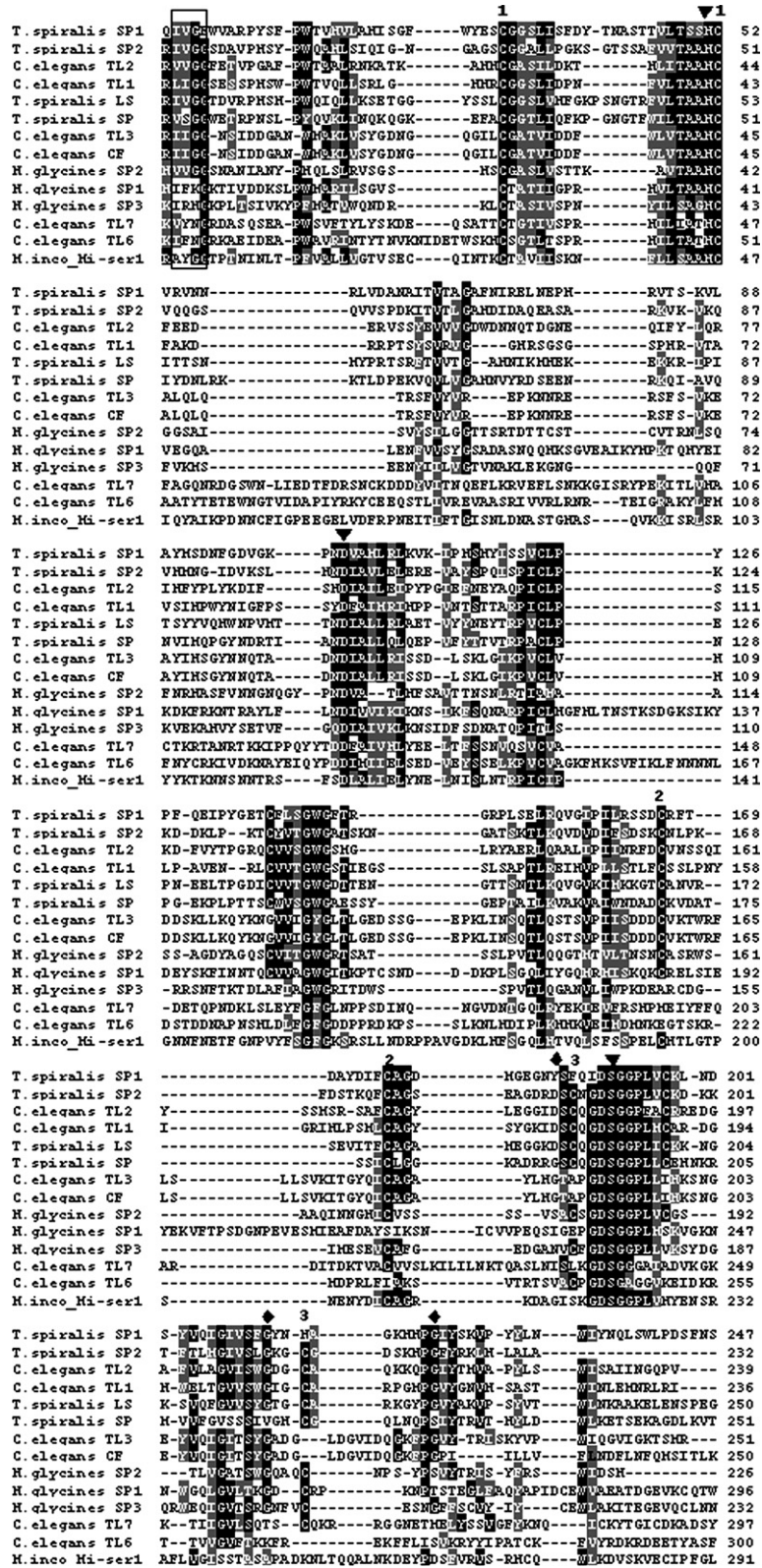


Fig. 3. Alignment of Mi-ser1 from *M. incognita* with other nematode serine proteinases using CLUSTAL W. The sequences are from *Trichinella spiralis* (SP— AAK16516; SP1— AAK31787; SP2— AAD09211; LS— AAK16520), *Caenorhabditis elegans* (TL1— AAA68746; TL2— AAB00662; TL3— AAB09110; TL6— AAB93344; TL7— AAB54144; CF— NP_500999), and *Heterodera glycines* (SP1— CAA74206; SP2— CAA74205; SP3— CAA74204). Residues are numbered beginning from the predicted N-terminal end of the mature proteins. The furthestmost C-terminal residues of the sequences are not included in the alignment. The activation site is boxed and the predicted disulfide bonds are numbered. The catalytic triad (▼), substrate specificity residues (◆), and sequence alignment gaps (—) are also shown.

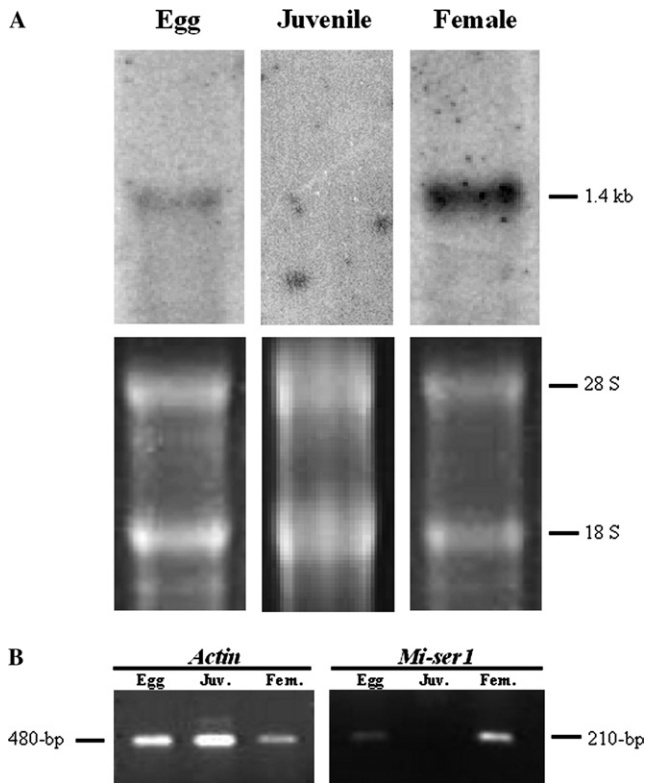


Fig. 4. Developmental expression of *Mi-ser1*. (A) Northern blot of total RNA (22 g) from eggs, J2 juveniles, and females of *M. incognita* hybridized with α -[³²P]dCTP-labeled *Mi-ser1* cDNA. The amount of RNA loaded per lane, normalized by ethidium bromide staining of the 28S and 18S rRNAs, is shown at the bottom. (B) RT-PCR amplification patterns obtained with specific primers for *Mi-ser1* and actin.

females. Normalization of the amount of RNA loaded for each sample using the intensity of the rRNAs, and comparison between females and eggs, showed a hybridization signal that was 6.9-fold higher in females than in eggs, indicating a higher level of expression in adult females. Similar results were obtained in the RT-PCR analysis (Fig. 4B). In the densitometric analysis, a very weak band was also detected in J2, with a signal intensity that was 26- and 3.8-fold lower than in females and eggs, respectively. However, we cannot exclude the possibility that this result corresponds to a contamination of the J2 sample with eggs. Amplification of genomic DNA with the same set of primers used in the RT-PCR resulted in the amplification of a higher molecular weight fragment (data not shown), confirming the specificity of the RT-PCR amplifications from the cDNA templates.

3.4. In silico analysis of serine proteinase ESTs from *Meloidogyne* spp

So far, the Parasitic Nematode Project (<http://www.nematode.net/>) has generated approximately 400,000 ESTs (Parkinson et al., 2003), of which nearly 73,000 are from RKN and nearly 20,000 are from *M. incognita*. We used this dataset to expand the characterization of *Mi-ser1*. Although few proteinase genes from plant parasitic nematodes have been isolated and characterized, functional genomic analyses of many nematodes species are currently underway and a large number of nematode ESTs are available in databanks. To obtain clues on the expression profile of nematode proteinases, we searched for serine proteinases in the RKN EST databanks. As a control, the same analysis was also done for actin ESTs and the results are shown in Table 1. Among the RKN, the number of ESTs available from eggs and J2 is much larger than from females, which represent only around 15% of the available sequences. Three ESTs encoding serine proteinases were identified in egg cDNA libraries from *M. incognita*, six in *M. hapla*, four in *M. arenaria*, and five in *M. chitwoodi*, giving a total of 18 sequences. Considering the total number of egg ESTs from all species, the mean was one serine proteinase EST per 2027 ESTs. No serine proteinase sequences were found in J2 or female libraries, however only a low number of ESTs from females were available for comparison.

Sequence analysis of the 18 RKN serine proteinase ESTs revealed at least nine different sequences and three gene clusters (Fig. 5). The largest cluster comprised 11 ESTs, including five from *M. chitwoodi* and two each from *M. incognita*, *M. hapla*, and *M. arenaria*. The identity between the sequences varied from 58 to 91%, with a mean of 74.5%. When compared to other serine proteinases, the best match was 41% identity over a 115 amino acid overlap with HGSP-III from *H. glycines*. Another cluster was represented by two ESTs, one from *M. hapla* and the other from *M. arenaria*, with 85.6% identity in its amino acid sequences. BLAST search results with the *M. arenaria* ESTs revealed 38% identity over a 91 amino acid overlap with *H. glycines* HGSP-I.

One EST from *M. arenaria* eggs (rm47d11.y1) encoded a chymotrypsin-like serine proteinase that showed 99% identity (*e* value of 6.6e–96) with *Mi-ser1* over a 148 amino acid overlap. This 447-nt EST was

Table 1
Number of ESTs found by the NCBI search tool in nematode developmental stages

	<i>M. incognita</i>			<i>M. hapla</i>			<i>M. arenaria</i>		<i>Meloidogyne</i> spp.		
	Egg	J2	Fem	Egg	J2	Fem	Egg	J2	Egg	J2	Fem
Total	7314	7556	4428	9783	9668	5001	3366	1652	36,486	24,932	10,849
Actin	24 (0.328)	62 (0.821)	4 (0.090)	56 (0.572)	757 (7.830)	7 (0.140)	9 (0.267)	4 (0.242)	114 (0.340)	852 (3.417)	11 (0.101)
Serine proteinase	3 (0.041)	—	—	6 (0.061)	—	—	4 (0.119)	—	18 (0.049)	—	—

Numbers in parentheses represent the percentage of each search result relative to the total number of ESTs.

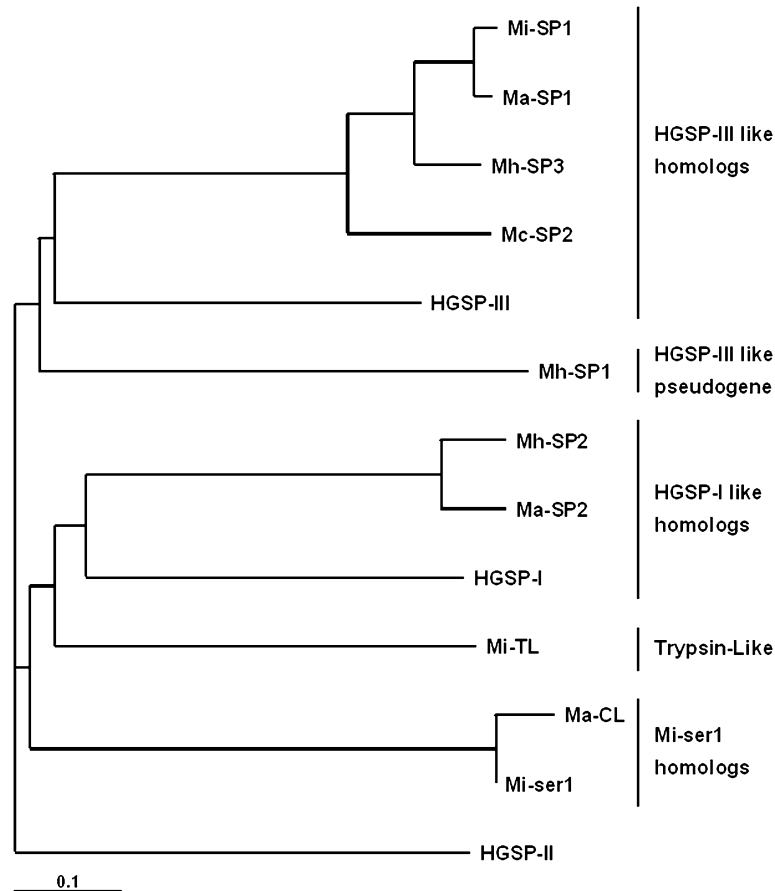


Fig. 5. Dendrogram of the alignment of the predicted protein sequence of *Mi-ser1* and selected ESTs from *Meloidogyne* spp., and the *H. glycines* serine proteinases. The alignment and the dendrogram were constructed using CLUSTAL W and edited with TreeView. The first two letters in each sequence name indicate the species of origin. The scale bar represents 0.1 amino acid substitutions per site.

identical to *Mi-ser1*, except for a single nucleotide that resulted in the substitution of an alanine by threonine. Another gene represented by a single EST from *M. incognita* showed 32% identity (over a 134 amino acid overlap) to a *Drosophila melanogaster* trypsin. The remaining three ESTs from *M. hapla* showed high identity to HGSP-III over a small stretch in the region surrounding the serine catalytic residue, but had little identity elsewhere; they also had several stop codons in the three frames and probably corresponded to a pseudogene.

In contrast to the high amino acid sequence identity within the clusters, the identity among sequences in different clusters was low (mean identity of 17%). The identity between the *M. incognita* ESTs Mi-SP1 and Mi-TL (Fig. 5) was 16% and, when compared to *Mi-ser1*, showed a mean identity of only 10.5%.

4. Discussion

In plants infected by nematodes, there is enhanced expression of defense genes such as trypsin inhibitors, peroxidases, chitinases, lipoxygenases, and extensins at

the sites of nematode feeding (Gheysen and Fenoll, 2002). Increased expression of trypsin inhibitors was observed in *L. esculentum* (Williamson and Hussey, 1996) and *A. thaliana* (Vercauteren et al., 2001) infected with *M. incognita*, suggesting a critical role for serine proteases in plant–nematode interactions.

Despite reports showing that cysteine and serine proteinases are the major proteolytic enzymes in plant parasitic nematodes and the importance of proteinases in host–parasite interactions and in essential physiological processes of parasites (Koritsas and Atkinson, 1994; Lilley et al., 1996, 1997; Michaud et al., 1996), little is still known about the role of these endoproteolytic enzymes in the parasite life cycle. Since few proteinase genes have been cloned and characterized from plant parasitic nematodes (Atkinson et al., 2003), we chose to isolate and characterize serine proteinase cDNAs from *M. incognita* as an initial step to identifying potential targets for the development of nematode-resistant transgenic plants based on anti-feeding strategies.

The sequence reported here, *Mi-ser1*, is the first full-length serine proteinase gene cloned and characterized from RKNs. Although detection of a putative signal peptide indicated that the predicted protein sequence of

Mi-ser1 was complete, comparison of the 5' end of the *Mi-ser1* cDNA sequence with the classic spliced leader and some variant forms described from *C. elegans* (Ross et al., 1995) and *M. javanica* (Koltai et al., 1997) did not reveal any significant similarity, indicating that the cloned cDNA could still be incomplete. A spliced leader is a common feature at the 5' end of about 80% of *C. elegans* mRNAs (Nilsen, 1993), and the corresponding sequence has been used as a primer for the amplification of nematode proteinase genes (Neveu et al., 2003). Alternatively, the spliced leader of *M. incognita* could differ from those previously described and may represent a novel variant or simply be absent. However, even if the 5' untranslated region of *Mi-ser1* were incomplete, the presence of two stop codons in-frame with the *Mi-ser1* ORF immediately upstream of the putative start codon indicated that translation did not begin further upstream.

In many insect pests, serine proteinases are encoded by multigene families. In the *D. melanogaster* genome, these enzymes constitute the second largest gene family, with 377 different sequences, whereas in the *C. elegans* genome serine proteinases are encoded by just 18 genes (Rubin et al., 2000). If a lower number of serine proteinase genes was a general feature of nematodes, this may make the inhibition of these enzymes easier in plant parasitic nematodes when compared with many insects that have a larger repertoire of these genes. Southern blot analysis indicated that *Mi-ser1* was encoded by a single or a few copies in the *M. incognita* genome. However, the EST databank searches revealed the existence of serine proteinase genes grouped in clusters among the RKNs. There is a low sequence identity between clusters, but high sequence identity within each cluster, suggesting that the serine proteinase diversity in RKNs appeared before species speciation. The high identity among the serine proteinase homologues in different species of RKN suggests that inhibitors against a specific serine proteinase will be effective against its homologues in a broad range of species within the genus.

The tentative classification and functional annotation of *Mi-ser1* was based on the high-scoring database matches from the BLAST search and on the identification of key residues determinant of specificity. Serine proteases, which constitute almost one-third of all known proteolytic enzymes, are classified in 10 clans according to protein structure, fold and mechanics (Hedstrom, 2002). Clan A is the major one and groups 301 known serine proteases that share a common origin with chymotrypsin. This clan possesses 10 families of serine proteases, which retain the order His/Asp/Ser on the catalytic site (Barrett and Rawlings, 1995). The principal family is the S1, also referred as chymotrypsin-like proteases (Hedstrom, 2002). All serine proteases found in the BLAST search with *Mi-ser1* belong to the family S1, presenting a chymotrypsin fold characterized by two

perpendicular β -barrel domains, each formed by six anti-parallel β -strands, and the C-terminal α -helix (Czapinska and Otlewski, 1999; Krem et al., 1999; Perona and Craik, 1997), where the active site cleft is located between these two barrels (Hedstrom, 2002). However, this approach may not be completely reliable, particularly since the top database matches gave low pairwise identities and important residues predictive of chymotrypsin or trypsin specificity were not found in *Mi-ser1*. Sequence analysis suggested that *Mi-ser1* may have an elastase specificity, but the precise classification and functional annotation of *Mi-ser1* will depend on more enzymatic and biochemical data.

Since the *in situ* localization of *Mi-ser1* was not investigated here, we have no information on the histological expression of *Mi-ser1*. The structure of the mature *Mi-ser1* protein consisted of only a trypsin domain and a putative signal peptide, indicating that *Mi-ser1* is secreted and could be involved in midgut digestion (Beynon and Bond, 1994). The expression of *Mi-ser1* was developmentally regulated and showed to be higher in females than in eggs and almost undetectable in J2. The Northern blot and RT-PCR results were supported by the *in silico* analysis of serine proteinase ESTs from *Meloidogyne* spp. in which ESTs encoding serine proteinases were found in eggs but not in J2. A precise comparison with females was not possible because the number of available female EST sequences was much lower.

These data agree with previous reports that showed high levels of proteinases expression in the feeding stages of parasitic nematodes (Atkinson et al., 2003). In phytoparasitic sedentary nematodes, females represent the parasitic stage that needs to digest plant proteins to obtain free amino acids and energy, while the J2 infective stage is a non-feeding stage (Wyss et al., 1992) that obtains energy by the consumption of its own lipid reserves (Reversat, 1981). This fact is supported by the analysis of J2 ESTs in which genes involved in the glyoxylate pathway were detected in high numbers (McCartter et al., 2003). The expression of serine proteinases in eggs is less clear. It is possible that the consumption of protein stores is necessary for larval growth. Alternatively, serine proteinases have a key role in several developmental processes that may be necessary for larval growth.

The results described here indicate that *Mi-ser1* is a major serine proteinase in *M. incognita* females and suggest it may be important for female nourishment and, consequently, growth and reproduction. Further characterization of *Mi-ser1* and the proteolytic system of *M. incognita*, combined with the use of a proteinase inhibitor-based approach should contribute to the development of transgenic plants resistant to parasitic nematodes, perhaps by using anti-feeding strategies to control the spatial and temporal expression of specific inhibitors against *M. incognita* proteinases. In this way,

further work is being directed towards the heterologous expression of Mi-ser1 and the use of the recombinant protein to select specific inhibitors through the screening of mutagenized bacteriophage libraries of serine proteinase inhibitors by phage display.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Brazilian government EMBRAPA, CNPq, and CAPES.

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403–410.
- Atkinson, H.J., Green, J., Cowgill, S., Levesley, A., 2001. The case for genetically modified crops with a poverty focus. *Trends in Biotechnology* 19, 91–96.
- Atkinson, H.J., Urwin, P.E., McPherson, M.J., 2003. Engineering plants for nematode resistance. *Annual Review of Phytopathology* 41, 615–639.
- Bangyeekhun, E., Cerenius, L., Soderhall, K., 2001. Molecular cloning and characterization of two serine proteinase genes from the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Journal of Invertebrate Pathology* 77, 206–216.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., 1995. Families and clans of serine peptidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 318, 247–250.
- Beynon, R.J., Bond, J.S., 1994. *Proteolytic Enzymes: a Practical Approach*. IRL Press, Oxford University Press.
- Carlini, C.R., Grossi-de-Sa, M.F., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicol* 40, 1515–1539.
- Chappell, C.L., Dresden, M.H., 1986. *Schistosoma mansoni*: proteinase activity of 'hemoglobinase' from the digestive tract of adult worms. *Experimental Parasitology* 61, 160–167.
- Chiou, S.J., Vanden Broeck, J., Janssen, I., Borovsky, D., Vandenbusche, F., Simonet, G., De Loof, A., 1998. Cloning of the cDNA encoding Scg-SPRP, an unusual Ser-protease-related protein from vitellogenic female desert locusts (*Schistocerca gregaria*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28, 801–808.
- Coombs, G.H., Mottram, J.C., 1997. Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. *Parasitology* 114, S61–S80.
- Czapinska, H., Otlewski, J., 1999. Structural and energetic determinants of the S-1-site specificity in serine proteases. *European Journal of Biochemistry* 260, 571–595.
- Ehwaeti, M.E., Fargette, M., Phillips, M.S., Trudgill, D.L., 1999. Host status differences and their relevance to damage by *Meloidogyne incognita*. *Nematology* 1, 421–432.
- Fourney, R., Miyakoshi, J., Day, R.I., Paterson, M., 1998. Northern blotting: efficient RNA staining and transfer. *Focus* 10, 5–7.
- Gheysen, G., Fenoll, C., 2002. Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology* 40, 191–219.
- Hedstrom, L., 2002. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews* 102, 4501–4523.
- Hussey, R.S., Barker, K.R., 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Report* 57, 1025–1028.
- Jepson, B.S., 1987. Identification of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* Species). CAB Int., Wallingford, UK.
- Jeyaratnam, J., 1990. Acute pesticide poisoning: a major global health problem. *World Health Statistics Quarterly* 43, 139–144.
- Jiang, H., Kanost, M.R., 2000. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 95–105.
- Kawamoto, S., Mizuguchi, Y., Morimoto, K., Aki, T., Shigeta, S., Yasueda, H., Wada, T., Suzuki, O., Jyo, T., Ono, K., 1999. Cloning and expression of Derf 6, a serine protease allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1454, 201–207.
- Koltai, H., Chejanovsky, N., Raccah, B., Spiegel, Y., 1997. The first isolated collagen gene of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* is developmentally regulated. *Gene* 196, 191–199.
- Koritsas, V.M., Atkinson, H.J., 1994. Proteinases of females of the phytoparasite *Globodera pallida* (potato cyst nematode). *Parasitology* 109, 357–365.
- Krem, M.M., Rose, T., Di Cera, E., 1999. The C-terminal sequence encodes function in serine proteases. *Journal of Biological Chemistry* 274, 28063–28066.
- Lilley, C., Urwin, P.E., Atkinson, H.J., McPherson, M.J., 1997. Characterization of cDNAs encoding serine proteinases from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 89, 195–207.
- Lilley, C.J., Devlin, P., Urwin, P.E., Atkinson, H.J., 1999. Parasitic nematodes, proteinases and transgenic plants. *Parasitology Today* 15, 414–417.
- Lilley, C.J., Urwin, P.E., McPherson, M.J., Atkinson, H.J., 1996. Characterization of intestinally active proteinases of cyst-nematodes. *Parasitology* 113, 415–424.
- Longbottom, D., Redmond, D.L., Russell, M., Liddell, S., Smith, W.D., Knox, D.P., 1997. Molecular cloning and characterisation of a putative aspartate proteinase associated with a gut membrane protein complex from adult *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 88, 63–72.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., DeWeese-Scott, C., Fedorova, N.D., Geer, L.Y., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Jacobs, A.R., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Madej, T., Marchler, G.H., Mazumder, R., Nikolskaya, A.N., Panchenko, A.R., Rao, B.S., Shoemaker, B.A., Simonyan, V., Song, J.S., Thiessen, R.A., Vasudevan, S., Wang, Y., Yamashita, R.A., Yin, J.J., Bryant, S.H., 2003. CDD, a curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Research* 31, 383–387.
- Mazumdar-Leighton, S., Babu, C.R., Bennett, J., 2000. Identification of novel serine proteinase gene transcripts in the midguts of two tropical insect pests, *Scirpophaga incertulas* (Wk.) and *Helicoverpa armigera* (Hb.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 57–68.
- McCarter, J.P., Mitreva, M.D., Martin, J., Dante, M., Wylie, T., Rao, U., Pape, D., Bowers, Y., Theising, B., Murphy, C.V., Kloek, A.P., Chiapelli, B.J., Clifton, S.W., Bird, D.M., Waterston, R.H., 2003. Analysis and functional classification of transcripts from the nematode *Meloidogyne incognita*. *Genome Biology* 4, R26.
- Michaud, D., Cantin, L., Bonade-Bottino, M., Jouanin, L., Vrain, T.C., 1996. Identification of stable plant cystatin/nematode proteinase complexes using mildly denaturing gelatin/polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 17, 1373–1379.
- Muharsini, S., Dalrymple, B., Vuocolo, T., Hamilton, S., Willadsen, P., Wijffels, G., 2001. Biochemical and molecular characterization of serine proteases from larvae of *Chrysomya bezziana*, the Old World Screwworm fly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 1029–1040.
- Mulenga, A., Sugimoto, C., Ingram, G., Ohashi, K., Misao, O., 2001. Characterization of two cDNAs encoding serine proteinases from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 817–825.
- Neveu, C., Jaubert, S., Abad, P., Castagnone-Sereno, P., 2003. A set of genes differentially expressed between avirulent and virulent *Meloidogyne incognita* near-isogenic lines encode secreted proteins. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 16, 1077–1084.

- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G., 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10, 1–6.
- Nilsen, T.W., 1993. Trans-splicing of nematode premessenger RNA. *Annual Review of Microbiology* 47, 413–440.
- Parkinson, J., Mitreva, M., Hall, N., Blaxter, M., McCarter, J.P., 2003. 400000 nematode ESTs on the Net. *Trends in Parasitology* 19, 283–286.
- Perona, J.J., Craik, C.S., 1997. Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. *Journal of Biological Chemistry* 272, 29987–29990.
- Redmond, D.L., Knox, D.P., Newlands, G., Smith, W.D., 1997. Molecular cloning and characterisation of a developmentally regulated putative metallopeptidase present in a host protective extract of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 85, 77–87.
- Reversat, G., 1981. Consumption of food reserves by starved second-stage juveniles of *Meloidogyne javanica* under conditions including osmobiogenesis. *Nematologica* 27, 207–214.
- Roberts, P.A., 1992. Current status of the availability, development, and use of host plant resistance to nematodes. *Journal of Nematology* 24, 213–227.
- Ross, L.H., Freedman, J.H., Rubin, C.S., 1995. Structure and expression of novel spliced leader RNA genes in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* 270, 22066–22075.
- Rubin, G.M., Yandell, M.D., Wortman, J.R., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C.R., Hariharan, I.K., Fortini, M.E., Li, P.W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J.M., Henikoff, S., Skupski, M.P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boguski, M.S., Brody, T., Brokstein, P., Celniker, S.E., Chervitz, S.A., Coates, D., Cravchik, A., Gabrielian, A., Galle, R.F., Gelbart, W.M., George, R.A., Goldstein, L.S., Gong, F., Guan, P., Harris, N.L., Hay, B.A., Hoskins, R.A., Li, J., Li, Z., Hynes, R.O., Jones, S.J., Kuehl, P.M., Lemaître, B., Littleton, J.T., Morrison, D.K., Mungall, C., O'Farrell, P.H., Pickeral, O.K., Shue, C., Voshall, L.B., Zhang, J., Zhao, Q., Zheng, X.H., Lewis, S., 2000. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287, 2204–2215.
- Sakanari, J.A., 1990. Anisakis—from the platter to the microfuge. *Parasitology Today* 6, 323–327.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sasser, J.N., 1980. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant Disease* 64, 36–41.
- Sasser, J.N., Eisenback, J.D., Carter, C.C., 1983. The international *Meloidogyne* project—its goals and achievements. *Annual Review of Phytopathology* 21, 271–288.
- Shomaker, C.H., Been, T.H., 1999. A model for infestation foci of potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Phytopathology* 89, 583–590.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680.
- Trudgill, D.L., 1995. Origins of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp. Nematoda) in relation to their cultural control. *Phytoparasitica* 23, 191–194.
- Trudgill, D.L., Blok, V.C., 2000. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 39, 53–77.
- Urwin, P.E., Lilley, C.J., McPherson, M.J., Atkinson, H.J., 1997a. Characterization of two cDNAs encoding cysteine proteinases from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Parasitology* 114, 605–613.
- Urwin, P.E., Lilley, C.J., McPherson, M.J., Atkinson, H.J., 1997b. Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *Plant Journal* 12, 455–461.
- Urwin, P.E., McPherson, M.J., Atkinson, H.J., 1998. Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs. *Planta* 204, 472–479.
- Valaitis, A.P., Augustin, S., Clancy, K.M., 1999. Purification and characterization of the western spruce budworm larval midgut proteinases and comparison of gut activities of laboratory-reared and field-collected insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 405–415.
- Vercauteren, I., Van Der Schueren, E., Van Montagu, M., Gheysen, G., 2001. *Arabidopsis thaliana* genes expressed in the early compatible interaction with root-knot nematodes. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 14, 288–299.
- Williamson, V.M., Hussey, R.S., 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell* 8, 1735–1745.
- Wyss, U., Grundler, F.M.W., Munch, A., 1992. The parasitic behaviour of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica* 38, 98–111.
- Yoshida, S., Taniguchi, M., Suemoto, T., Oka, T., He, X., Shiosaka, S., 1998. cDNA cloning and expression of a novel serine protease, TLSP. *Biochimica et Biophysica Acta* 1399, 225–228.
- Zhu, Y.C., Kramer, K.J., Dowdy, A.K., Baker, J.E., 2000. Trypsinogen-like cDNAs and quantitative analysis of mRNA levels from the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 1027–1035.

ANEXO V.iii.

Lista de artigos publicados (co-autor).

Molecular cloning of α -amylases from cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* and structural relations to plant inhibitors: an approach to insect resistance. Osmundo Brilhante de Oliveira-Neto, João A. N. Batista, Daniel J. Rigden, Octávio L. Franco, Rosana Falcão, **Rodrigo R. Fragoso**, Luciane V. Mello, Roseane C. dos Santos and M. Fátima Grossi-de-Sá. *Journal of Protein Chemistry*, v. 22, n. 1, p. 77-87 (2003).

Characterization of novel Brazilian strains *Bacillus thuringiensis* effective against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. Shirley M. Buffon Silva, Joseilde O. Silva-Werneck, Mariana Magalhães T. Q., **Rodrigo R. Fragoso**, João A. N. Batista, Osmundo B. Oliveira-Neto, M. Fátima Grossi-de-Sá and Rose G. Monnerat. *Applied Entomology-Zeitschrift Für Angewandte Entomologie*, v. 128, n. 2, p. 102-107 (2004).

A diverse family of serine proteinase genes expressed in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*): Implications for design of pest-resistant transgenic cotton plants. Osmundo B. Oliveira-Neto, João A. N. Batista, Daniel J. Rigden, **Rodrigo R. Fragoso**, Rodrigo O. Silva, Eliane A. Gomes, Octavio L. Franco, Simoni C. Dias, Rose G. Monnerat and M. Fátima Grossi-de-Sá. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, v. 34, n. 9, p. 903-918 (2004).

Molecular cloning of a cysteine proteinase from cotton boll weevil *Anthonomus grandis* (Coleoptera: curculionidae). Osmundo Brilhante de Oliveira Neto, João A. N. Batista, Daniel J. Rigden, Octávio L. Franco, **Rodrigo R. Fragoso**, Ana C. S. Monteiro, Rose G. Monnerat and M. Fátima Grossi-de-Sá. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 68, n. 6, p. 1235-1242 (2004).

Inhibition of cyst and root-knot nematode cysteine proteinases by the propeptide of the Hgcp-I cysteine proteinase of *Heterodera glycines*. Francine B. Silva, João A. N. Batista, Brener M. Marra, **Rodrigo R. Fragoso**, Ana Carolina S. Monteiro, Juvenil E. Cares and Maria F. Grossi-de-Sá. *Genetics Molecular Biology*, v. 3, n. 3, p. 342-355 (2004).

ANEXO V.iv.

Lista de artigos em fase de submissão (co-autor).

Cloning and molecular characterization of a trypsin-like proteinase highly expressed in larval stage of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). Cláudio Picanço Magalhães, **Rodrigo da Rocha Fragoso**, Octávio Luiz Franco, Djair Santos de Lima e Souza, Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa, Carlos Peres Silva, Flávio Finardi-Filho, Maria Fátima Grossi-de-Sá

Characterization of a novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain S811 active toward cotton insect pests. Mariana Torquato Quezado Magalhães, **Rodrigo da Rocha Fragoso**, Shirley M. Buffon Silva, Simoni Campos Dias, Osmundo Brilhante Oliveira-Neto, João Aguiar Nogueira Batista & Maria Fátima Grossi de Sá.

JBURE-IIB: cloning of cDNA and molecular modeling of full length protein. Fernanda Mulinari, M. S. Almeida, **Rodrigo da Rocha Fragoso**, Maria Fátima Grossi de Sá & Célia R. Carlini.