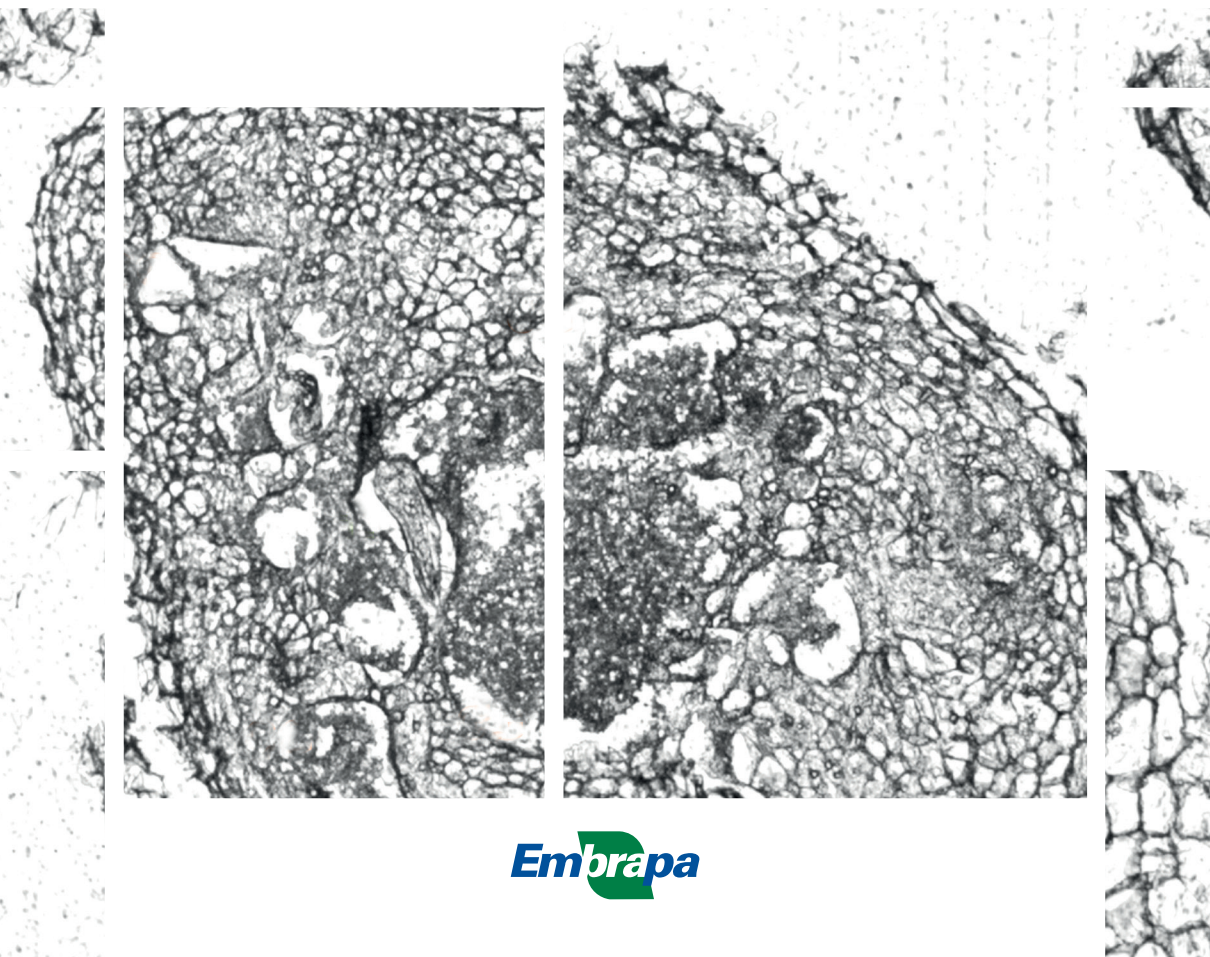


**Isolamento de células gigantes em
galhas de raízes de leguminosas por
microdissecção a laser (MDL)**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
379**

Isolamento de células gigantes em
galhas de raízes de leguminosas por
microdissecção a laser (MDL)

*Stephan Nielen
Maria Fátima Grossi-de-Sá
Patrícia Messenberg Guimarães
Ana Claudia Guerra de Araújo*

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2023

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica – PqEB
Av. W5 Norte (final)
CEP: 70770-917 Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4700/(61) 3448-4739
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Recursos Genéticos
e Biotecnologia

Presidente
Marcelo Lopes da Silva

Secretária-Executiva
Ana Flávia do Nascimento Dias

Membros
Andrielle Câmara Amaral Lopes;
Bruno Machado Teles Walter;
Débora Pires Paula Edson Junqueira Leite;
Marcos Aparecido Gimenes;
Solange Carvalho Barrios Roveri José

Supervisão editorial
Ana Flávia do Nascimento Dias

Revisão de texto
Ana Claudia Guerra de Araújo

Normalização bibliográfica
Rosamares Rocha Galvão (CRB - 1/2122)

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Foto da capa
Stephan Nielsen

1ª edição
Publicação digital (2023): PDF

Todos os direitos reservados.

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Isolamento de células gigantes em galhas de raízes de leguminosas por micro-
dissecção a laser (MDL) / Stephan Nielsen... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa
Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2023.

35 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos
e Biotecnologia, 379).

1. Microdissecção a laser. 2. Sítio de alimentação. 3. Soja. 4. Amendoim.
I. Nielsen, S. II. Série.

631.5233 CDD21

Rosamares Rocha Galvão (CRB-1/2122)

© Embrapa, 2023

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução.....	8
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	20
Conclusões.....	32
Agradecimentos.....	33
Referências	33

Isolamento de células gigantes em galhas de raízes de leguminosas por microdissecção a laser (MDL)

Stephan Nielen¹

Maria Fatima Grossi-de-Sá²

Patricia Messemberg Guimarães³

Ana Claudia Guerra de Araújo⁴

Resumo O desenvolvimento de novas estratégias para a produção de cultivares resistentes aos nematoides das galhas inclui o maior conhecimento de genes envolvidos no desenvolvimento de células gigantes (CG), formadoras dos sítios de alimentação, durante a infecção de plantas suscetíveis por nematoides da galha. A análise transcricional baseada em todo o tecido da raiz ou da galha formada pelo parasita resulta na identificação de numerosos genes diferencialmente expressos. Para identificar genes específicos da interação planta-nematoides formadores de galhas (NFG) e genes de suscetibilidade que possibilitam a infecção, uma abordagem promissora é estudar o transcrito específico das CGs. Neste estudo, a técnica de microdissecção a laser foi estabelecida para isolamento de CGs produzidas por *Meloidogyne* spp., em formação nas raízes de leguminosas (soja e amendoim) suscetíveis. Para tal, CGs de segmentos de raízes coletados após a inoculação com Juvenis 2 (J2) e incluídos em Paraplast foram microdissectadas a laser, e utilizadas para extração do RNA, seguida da síntese de DNA complementar, e da amplificação por PCR de genes expressos constitutivamente, como indicação indireta da integridade do RNA. O detalhamento do método e fluxo de trabalho aqui descritos para microdissecção a laser de CGs e células vasculares das raízes dessas leguminosas, com subsequente isolamento de RNA, cons-

¹ Biólogo, doutor em Ciências Naturais, bolsista na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

² Bióloga, doutora em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

³ Agrônoma, doutora (PhD) em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

⁴ Bióloga, PhD em Biofísica, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

titui uma ferramenta importante para a análise molecular detalhada durante a interação planta-patógeno.

Termos para indexação: microdissecção a laser; nematoides das galhas; transcritoma célula-específico; células gigantes; sítio de alimentação; raízes; soja; amendoim.

Isolation of giant cells from legume root-galls by laser microdissection (LMD)

Abstract The development of new strategies for the production of cultivars resistant to root-knot nematodes requires knowledge on the genes involved in the formation of giant cells (GC) as the feeding sites upon infection of susceptible plants with the respective pathogen. Transcriptional analyses based on whole root or gall tissues results in identification of numerous differentially expressed genes. To identify specific genes involved in the interaction between plant and root-knot nematodes (NFG), as well as susceptibility genes that enable infection, a promising approach is to study the specific transcriptome of GCs. In this study, the laser microdissection technique was established for the isolation of GCs produced by *Meloidogyne* spp., forming in the roots of susceptible legumes (soybean and peanut). To this end, GCs from paraffin-embedded root segments collected after inoculation with juveniles 2 (J2) were laser microdissected and used for RNA extraction followed by complementary DNA synthesis, and PCR amplification of constitutively expressed genes, as an indirect indication of RNA integrity. The detailed method and workflow described here for laser microdissection of GCs and vascular cells from the roots of these legumes, with subsequent isolation of RNA, constitutes an important tool for detailed molecular analysis of plant-pathogen interaction.

Index terms: laser microdissection; root-knot nematodes, single-cell transcriptome; giant cells; roots; soybean; peanut.

Introdução

Dentre as inúmeras pragas de importância agrônômica mundial, estão os nematoides das galhas (RKN) *Meloidogyne* spp., que infestam raízes de uma ampla variedade de espécies de plantas (Hussey; Janssen, 2002). Estima-se que cerca de 5% da produção agrícola mundial seja anualmente perdida por causa de diferentes espécies de *Meloidogyne* (Karajeh et al., 2008) e dentre as 97 espécies, *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. hapla* são responsáveis pela maior parte do prejuízo nas culturas.

O controle de RKNs é dispendioso e laborioso, sendo que as práticas mais utilizadas incluem rotação de culturas com espécies de plantas antagonicas, uso de fungos antagonistas (revisados pela Poveda et al., 2020) e algumas rizobactérias (Viljoen et al., 2019) ou antibióticos isolados de bactérias (Talavera-Rubia et al., 2020). Mas a principal forma de combate aos RKNs ainda é o uso de nematicidas (Grabal et al., 2020), banidos de muitos países devido ao alto nível de toxicidade. O desenvolvimento e uso de cultivares mais resistentes, por outro lado, é considerado o processo mais eficaz, econômico e ecologicamente adequado. Entretanto, o número de cultivares disponíveis com resistência significativa a RKNs ainda é relativamente limitado para a maior parte das culturas.

Algumas linhagens e cultivares de soja mais resistentes estão há muito tempo sendo desenvolvidas para implementação em programas de melhoramento (Davis et al., 1998), tais como cultivares com resistência única ou múltipla, incluindo BRS Corisco (Oliveira e Landgraf, 2003), BRS 7980, BRS 8180RR (Embrapa Cerrados, 2013) e BRS 7380RR (Sousa, 2019) no Brasil. Já no caso do amendoim cultivado, *Arachis hypogaea*, a maioria das cultivares utilizadas é altamente suscetível, ao contrário de algumas espécies silvestres de *Arachis*. Cruzamentos interespecíficos utilizando material silvestre e o amendoim cultivado deram origem a novas variedades mais resistentes ao RKN (Simpson et al., 2001 e 2003), mas com baixo potencial de rendimento. Contudo, mais recentemente novas variedades e várias linhagens alotetraplóides induzidas artificialmente, com maior resistência à fungos e nematoide das galhas vem sendo disponibilizadas para o melhoramento de amendoim (ex. Bertioli et al., 2021).

É, portanto, imprescindível a ampliação do número de linhagens e cultivares mais resistentes a RKNs, e preferencialmente, associadas a outras características de interesse para que possam ser controlados de forma mais efetiva, com maior sustentabilidade e segurança ambiental.

Atualmente, vários genes, transcritos exclusivos, promotores de genes relacionados a defesa de plantas, além de efetores de RKN já foram identificados e promotores de genes relacionados a defesa de plantas, além de efetores de RKN vêm sendo identificados na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Basso et al., 2020a, 2020b; Mendes et al., 2021) e soja (*Glycine max*) (Lisei de Sá et al., 2012; Beneventi et al., 2013; Rocha et al., 2015) e *M. arenaria* e *Arachis* spp.) (Guimaraes et al., 2015; Mota et al., 2018; Pereira et al., 2019; Martins et al., 2020). Estes genes têm sido utilizados na construção de vetores para transformação de plantas-modelo e alvo (Guimaraes et al., 2017; Araujo et al., 2021) para avaliação de seus efeitos. Nesses estudos, a metodologia de isolamento do RNA das plantas infectadas e controle, utilizou todo o tecido radicular das plantas (diferentes tecidos e células) ou a galha e células adjacentes. É sabido que muitas vezes a identificação de genes determinantes na interação são discretamente regulados, e sua expressão baixa e pontual fica mascarada devido sua diluição entre outros transcritos mais abundantes, que podem ou não estar envolvidos com a interação planta-patógeno (Wang et al., 2003; Barcala et al., 2010). Desta forma, como alternativa mais assertiva e eficaz para a identificação de genes essenciais que possuem expressão temporal e espacial mais discreta durante a interação planta-patógeno, elegemos avaliar a expressão de genes expressos por células gigantes (CGs), que são células induzidas na região do feixe vascular radicular da planta hospedeira, pela secreção de moléculas do estágio Juvenil 2 do RKN, para formação do seu sítio de alimentação.

Para a identificação desses genes essenciais para o sucesso do parasitismo, utilizamos a técnica de Microscopia com Dissecção a Laser (MDL), que depende de equipamento especializado que facilita o isolamento de células individuais ou áreas específicas dos tecidos, primeiramente identificadas pela sua localização e morfologia característica, no microscópio de luz acoplado ao equipamento de Microscopia de Microdissecção a Laser (MDL).

O primeiro relato da aplicação da MDL para análise de expressão gênica em células vegetais foi publicado por Asano et al. (2002), que construíram

uma biblioteca de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA extraído de células microdissectadas do floema do arroz. Mas vários estudos de plantas vêm sendo conduzidos para análise dos processos de transcrição durante o início da infecção por RKNs. Ramsey et al. (2004) publicaram um protocolo detalhado para o isolamento de CGs de raízes de tomate infectadas por *M. javanica*, demonstrando que é possível recuperar RNA de alta qualidade para estudos de expressão gênica de CGs microdissectadas. Fosu-Nyarko et al. (2009) geraram bibliotecas de cDNAs a partir de RNA extraído de CGs isoladas por MDL em raízes de tomate (4 e 7 dias após inoculação) com *M. javanica* e identificaram genes que podem estar envolvidos na indução e desenvolvimento de CGs.

Mas, o MDL permite a identificação de genes específicos com expressão diferencial, que normalmente não são identificados quando se utiliza toda a raiz ou galha na raiz para o isolamento de RNA, já que certos eventos transcripcionais, como muitos daqueles envolvidos na interação planta-patógeno, podem ter sua expressão mascarada, como mostrado na análise de expressão comparativa de células sinciciais na soja (Klink et al., 2007).

Geralmente, as CGs podem ser identificadas 8-15 dias após a inoculação (DAI) com J2, pelo maior volume citoplasmático, ao longo do feixe vascular, além da associação com a formação de galhas na respectiva região da raiz. Assim, durante esse estudo, foi estabelecido o procedimento para o isolamento de CGs, a partir de raízes de plantas de amendoim e soja infectadas por *M. arenaria* e *M. incognita*, respectivamente, por essas células estarem envolvidas em uma etapa estratégica na interação leguminosas-RKNs e que, define o sucesso da infecção. A partir do isolamento de RNA células-específico (CGs), pretende-se obter bibliotecas de cDNAs para a execução de análises transcritômicas e identificação de genes de interesse na interação planta-RKN.

Assim, apresentamos aqui, de forma tutorial e detalhada, as etapas e parâmetros utilizados para o sucesso na síntese de cDNA, a partir de RNA isolado de CGs e de células da região vascular de plantas controle (não inoculadas), onde as CGs são induzidas por *Meloidogyne* spp. em raízes de amendoim e soja.

A partir do estabelecimento desses procedimentos, cDNAs obtidos de RNAs de CGs e células vasculares de raízes de plantas controle, de ambas

as espécies de leguminosas, poderão ser utilizadas para sequenciamento e análise transcritômica comparativa, a fim de se identificar genes candidatos conservados, com expressão exclusivas ou promotores, para posterior validação *in vivo*. Além disso, os parâmetros e procedimentos determinados para isolamento de CGs por MDL poderão contribuir para a obtenção de diferentes tipos celulares em estudo, e assim dar início a geração de bancos de transcritomas célula-específicos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, podendo assim, beneficiar diferentes áreas de estudos.

Material e Métodos

1) Obtenção de plantas

Sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* 'Runner IAC 886') e soja (*Glycine max* 'Williams 82') foram semeadas em copos de plástico de 200 ml contendo quatro orifícios no fundo, e uma mistura estéril de solo e do substrato para plantas (Carolina Soil, Brasil) (2:1; v/v). Os copos foram irrigados regularmente para germinação em uma sala de crescimento de plantas a 25 °C e fotoperíodo de 12h.

2) Bioensaios com nematoides

Raízes de plantas de amendoim e soja foram inoculadas quatro semanas após a germinação, com *Meloidogyne* spp. em estágio juvenil 2 (J2). Os inóculos foram obtidos a partir da eclosão de ovos isolados de raízes de tomate (*Solanum lycopersicum* 'Santa Clara') após 90 dias da inoculação (DAI) por *M. incognita* e raízes de amendoim infectadas por *M. arenaria*. Os ovos foram mantidos por 7 dias a 4 °C e, após sua eclosão, os J2 de *M. arenaria* e *M. incognita* foram coletados e inoculados nas raízes de amendoim e de soja, respectivamente, sem que houvesse irrigação no dia anterior. Cada planta foi inoculada com cerca de 5.000 J2, por dois pequenos orifícios no solo, com aproximadamente 2 cm de profundidade, feitos próximos as raízes. Plantas controle foram inoculadas da mesma forma, entretanto com água. As plantas foram mantidas em sala de crescimento e a irrigação foi retomada aos 2 DAI.

3) Preparação de amostras

Coleta de amostras

As raízes de plantas de amendoim e soja inoculadas com J2 e das respectivas plantas controle foram removidas nos seguintes pontos: 4, 8, 12, 14, 16, 20 e 30 DAI. As plantas foram cuidadosamente retiradas dos vasos e a mistura solo/substrato removida em água corrente. As raízes de cada planta foram transferidas para uma placa de Petri sobre gelo e a presença de galhas ao longo das raízes, identificadas com ajuda do estereomicroscópio Zeiss SV16 (Zeiss, Alemanha).

Processamento dos fragmentos de raízes

- **Fixação:** após a identificação de galhas nas raízes, fragmentos dessas raízes, com aproximadamente 1 cm de comprimento foram obtidos e transferidos para tubos de polipropileno de 2 ml contendo uma solução fixadora composta por etanol (EtOH) 100 %: ácido acético glacial (3: 1; v/v), recém preparada e incubados sob agitação (5 rpm) a 4 °C por 3 h. O mesmo procedimento foi feito para as plantas controle, onde fragmentos de raízes laterais de amendoim e secundárias e terciárias da soja foram excisados e fixados, conforme descrito para os fragmentos com galhas. A solução fixadora foi trocada por nova solução e incubada por mais 12 h, a 4 °C.
- **Desidratação:** soluções etanólicas aquosas com concentrações crescentes foram preparadas com água Millipore tratada com 0,1 % de dietilpirocarbonato (DEPC). A solução fixadora foi substituída por EtOH 50 % (2 x 15 min) a 4 °C, depois foram imersas em solução de EtOH 70% (3 x 1 h) a 4 °C. As amostras foram armazenadas em nova solução de EtOH 70% a 4 °C.
- **Infiltração:** a desidratação das amostras armazenadas foi continuada com a imersão destas, em solução 90% EtOH (1 x 1h), seguida de imersão em 100% EtOH (3 x 1h) a 4 °C para infiltração das amostras com Paraplast Plus® (Sigma, EUA), os fragmentos foram desidratados em mistura de EtOH 100 %: HistoChoice® Clearing Agent (HC) (Sigma, EUA) (2:1; v/v) por 1 h em temperatura ambiente, seguida pela

imersão em EtOH: HC (1: 1; v/v); EtOH: HC (1: 2; v/v) e em HC por 1 h em cada solução, em temperatura ambiente. Para derreter o Paraplast Plus®, pastilhas foram colocadas em tubo plástico de 50 ml e mantidas a 58 °C por 3 h. O HC das amostras foi substituído pela mistura HC: Paraplast Plus® derretido (1:1; v/v) por 1 h a 58 °C, então substituída por Paraplast Plus® puro por 12 h a 58 °C. Novo Paraplast Plus® puro foi adicionado por outras 3 h a 58 °C e ainda, com mais uma troca e mesma incubação.

- **Inclusão:** para inclusão em Paraplast Plus®, as amostras foram removidas cuidadosamente dos tubos, com auxílio de palitos de madeira esterilizadas. As amostras foram colocadas de forma orientada para obtenção de secções longitudinais, em moldes de alumínio contendo uma camada fina, com aproximadamente 1 mm de espessura de Paraplast Plus® derretido no fundo. Os moldes foram mantidos sobre uma placa de aquecimento a 58 °C e o Paraplast Plus® puro derretido foi adicionado lentamente aos moldes já com as amostras, até que uma superfície côncava de Paraplast Plus® fosse observada na superfície do molde. Este excesso de Paraplast Plus® é importante para não deixar a amostra descoberta, pois durante a polimerização, ocorre uma grande retração do Paraplast Plus®. As amostras resfriaram à temperatura ambiente e a polimerização final foi obtida após a colocação dos moldes sobre gelo. Para armazenar as inclusões, os moldes foram colocados a 4 °C em uma caixa contendo gel dessecante.
- **Montagem das inclusões:** as inclusões de Paraplast Plus® com as amostras foram removidas dos moldes, o excesso de Paraplast Plus® no entorno da amostra foi removido com auxílio de uma lâmina para bisturi e as inclusões foram fixadas em suportes para uso no micrótomo rotativo. Como suportes, foram utilizados blocos de madeira com superfície de cerca de 2 cm² e como adesivo, Paraplast Plus® derretido. A superfície com a amostra deve sempre ficar acessível para o seccionamento, ou seja, no lado oposto do bloco de madeira onde a inclusão é fixada.

4) Obtenção de secções e detecção de RNA

O seccionamento das amostras foi realizado no micrótomo rotativo Leitz 1512 (Leitz, Alemanha) após a limpeza geral e das áreas. As secções com

10 µm de espessura foram obtidas e transferidas para gotas de água livre de RNases sobre uma lâmina.

Para verificar a conservação de RNA total das amostras, algumas secções montadas em lâminas histológicas foram tratadas com laranja de acridina (3,6-dimetilaminoacridina), e observadas sob luz azul (460 nm) para excitação, que resulta em fluorescência vermelho-alaranjada onde existe o RNA (Ramsey et al., 2004). Para tal, o Paraplast Plus® das secções foi removido pela incubação das lâminas em HC (2x 5 min), seguida pela incubação em uma solução de EtOH 100%: HC (1: 1; v/v) por 2 min e em EtOH 100 % por outros 2 min. Após, as lâminas foram reidratadas em série etanólica em concentrações decrescentes (100, 90 e 70 %) por 1 min em cada solução, imersas em água DEPC e incubadas em solução aquosa de laranja de acridina 0,1 % (solução de armazenamento 10 mg/ml) por 15 min. Como controle da especificidade da fluorescência, outras secções do mesmo tecido foram tratadas com RNase A (0.5 mg/ml; 120 min 37 °C) antes da incubação com a solução de laranja de acridina. Posteriormente, as lâminas foram imersas em água DEPC e secaram ao ambiente protegidas de sujeira. As secções foram observadas em microscópio epifluorescente Zeiss Axiophot (Zeiss, Alemanha), utilizando um filtro de excitação com 460-490 nm e 515 nm para emissão. As imagens foram obtidas com a câmera AxioCam MRc (Zeiss, Alemanha) utilizando o programa de computador Axiovision 4.8 (Zeiss, Alemanha).

5) Seccionamento das amostras em micrótomo rotatório

Devido à ausência de qualquer coloração nas amostras seccionadas no micrótomo rotatório, observações iniciais em microscopia com campo claro no equipamento Zeiss Axioskope (Zeiss, Alemanha) foram necessárias para identificar a região contendo células-alvo. Identificada a região de interesse, nova remoção do excesso de Paraplast Plus® foi realizada e secções somente com a área de interesse foram obtidas e montadas em lâminas exclusivas para uso na Microscopia com Dissecção a Laser (MDL) da Leica (Leica Microsystems, Alemanha). Esta lâmina para MDL contém uma membrana de naftalato de polietileno (PEN), com 2,0 µm de espessura e livre de nucleases. Estas lâminas foram pré-tratadas por 30 min com luz ultravioleta para reduzir cargas elétricas e assim, facilitar a liberação da microdissecção a laser da membrana.

Cerca de 100 µl de água DEPC a 42 °C foi distribuída em 3 ou 4 gotas sobre a membrana da lâmina MDL e as secções transferidas para a superfície das gotas com auxílio de um pincel fino. As lâminas para MDL foram mantidas a 42 °C por 30 min para estender as secções e aumentar adesão destas a membrana. Cada lâmina foi inspecionada quanto à sua qualidade (número de secções, aderência das secções a membrana, ausência de dobras e sobreposição de secções) em microscopia de campo claro, utilizando a microscopia de luz e lente objetiva com magnificação de 10x. As melhores secções/lâminas foram selecionadas e armazenadas a 4 °C em caixas contendo gel dessecante, por até uma semana.

6) Microscopia de Dissecção a Laser (MDL)

- **Pré tratamento das lâminas:** antes da microdissecção a laser, ou seja, procedimento para o isolamento das células da área da raiz de interesse na secção utilizando a MDL, o Paraplast Plus® foi removido das lâminas conforme acima descrito e após, as lâminas secaram ao ambiente protegidas de sujeira. Importante mencionar que somente as lâminas que serão utilizadas na mesma sessão de trabalho da MDL (três lâminas em até três horas) devem ter o Paraplast Plus® removido, já que este também atua como proteção da amostra contra ação das RNases.
- **Parâmetros e organização das amostras no MDL:** para a microdissecção a laser utilizou-se o sistema Leica Microsystems LMD7000 (laser de 349 nm, frequência de pulso com 10-5000 Hz, comprimento de pulso menor que 4 ns e 120 µJ de energia máxima), acoplado ao microscópio Leica automatizado DM6000 B automatizado, com captura de imagens digital pela câmera Leica DFC310 FX e o programa Leica LMD V7.5.

Ainda, o laser foi calibrado, de acordo com as instruções do fabricante, usando a opção 'Laser Control' no painel do programa Leica MDL V7.5, e os diversos parâmetros, como p. ex. a potência do laser, abertura e velocidade, foram ajustados de acordo com a amostra a ser trabalhada. O objetivo destes ajustes é obter uma microdissecção bem definida e completa, em todo o entorno da(s) célula(s)-alvo ou região selecionada, evitando destruição das células de interesse e garantindo que, a micro-

dissecção seja depositada, pela ação da gravidade, exatamente na superfície interna da tampa aberta do microtubo no coletor. Assim evita-se que as microdissecções não se espalhem ou fiquem parcialmente aderidas a membrana da lâmina para MDL, devido a cargas eletrostáticas. O sistema está equipado com um suporte para três lâminas e um coletor de microdissecções para 4 microtubos plásticos de 0,5 ml, que, antes do uso, foram tratados com RNase Away®. Apenas uma lâmina e um tubo de coleta foi usada por vez, para minimizar possível contaminação. Na tampa aberta do microtubo de coleta foi adicionada 39 µl de Nuclease-Free Water (Ambion, EUA) e 1 µl de RNasin® Plus RNase Inhibitor 40u/µl (Promega, EUA). As lâminas foram observadas em microscopia de luz em campo claro no sistema Leica Microsystems LMD7000, usando objetiva de magnificação de 6,3x para localizar área de interesse nas secções. As coordenadas das regiões de interesse foram registradas no sistema Leica para posterior recuperação para execução da MDL.

O sucesso da captura das microdissecções pela MDL deve ser verificado regularmente pela visualização das microdissecções presentes na tampa do microtubo, utilizando a objetiva de magnificação de 6,3x e opção 'collector' no painel do programa.

- **Microdissecção a laser:** para iniciar a microdissecção a laser, as áreas de interesse registradas no sistema Leica foram acessadas e focalizadas com a objetiva de magnificação de 40x. Para se estabelecer a área mínima contendo células-alvo necessária para obtenção de RNA suficiente para síntese de cDNA em raízes de plantas de amendoim, a medida de cada área, em cada microdissecção, foi realizada e registrada automaticamente pelo programa Leica, e ao final, a soma das áreas microdissectadas (μm^2) forneceu uma estimativa da área total microdissectada, e indiretamente, o número de células por área microdissectada. Ao término da MDL, os microtubos foram cuidadosamente removidos do coletor, fechados e centrifugados rapidamente para transferir as microdissecções da tampa para o fundo dos microtubos, que foram armazenados a -80 °C.

Uma visão geral das etapas para dissecção a laser (MDL), com uma breve descrição e notas é mostrada na forma de esquema na Figura 1.

Bioensaios e coleta de amostras

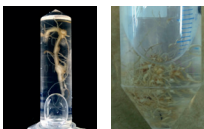


Inocular *Meloidogyne* spp. (J2) nas raízes com 3 ou 4 semanas de idade e aguardar 5 a 10 dias para a infecção. Remover plantas do vaso, lavá-las em água corrente e isolar fragmentos de raiz contendo galhas (1 cm), no estereomicroscópio e com pinças e bisturi.



Manter sempre as condições e utensílios livres de RNases para todas as etapas!

Isolamento de fragmentos de raízes, fixação e desidratação

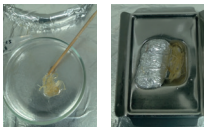


Submergir os fragmentos de raízes em um tubo contendo etanol: ácido acético, 3:1, v/v por 3 horas sobre gelo. Trocar por nova solução e incubar por 12 horas a 4 °C

Usar água DEPC para todas as soluções

Usar reagentes de qualidade

Infiltração e inclusão de amostras



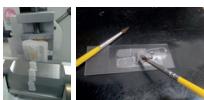
Desidratar lenta e gradualmente as amostras em soluções aquosas com concentrações crescente de etanol (50 % até 100%) a 4 °C e trocar gradualmente o último etanol puro por HistoChoice® a 4 °C. Adicionar lenta e gradualmente Paraplast Plus® dissolvido com as amostras no vidro, ao longo de 3 dias, a 58 °C - Para incluir as amostras, colocar uma camada de Paraplast Plus® dissolvido na forma de inclusão a 58 °C, orientar amostra nessa camada na forma e completar cuidadosamente, com o máximo possível de Paraplast Plus®

Dicas

Pode ser usado um forno, incubadora, placa aquecedora com vidro com tampa. Manter sempre Paraplast Plus® dissolvido

Inclusão de amostras em placa aquecedora. Armazenar as inclusões solidificadas a 4 °C

Obtenção de seções em lâminas MDL

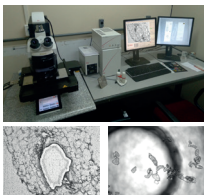


Seccionar as inclusões (10 µm de espessura) no ultramicrotomo rotatório. Posicionar a lâmina contendo 3 a 4 gotas (10 µl) e depositar a 4 seções semifinas sobre cada gota. A lâmina é exclusiva para uso em Microscopia de Dissecção a Laser (MDL) Remover o Paraplast Plus® das lâminas com as seções semifinas utilizando Histochoice® quando for iniciar a microdissecção a laser.

Dicas

Colocar as lâminas a 42 °C para estender as seções. Guardar lâminas em ambiente refrigerado e seco por até 2 semanas.

Microscopia e Dissecção a Laser (MDL)



Ajustar os parâmetros do MDL, buscar as células-alvo no microscópio MDL, fotografar as regiões contendo as células-alvo, medi-las e registrar seus endereços para posterior busca

Adicionar 40 µl de H₂O com RNase inibidor à tampa aberta do microtubo e inseri-lo no coletor de amostras do MDL. Proceder cuidadosamente a microdissecção a laser das células-alvo

Fotografar a região onde as células foram microdissectadas e conferir regularmente se as microdissecções estão na tampa do tubo



Atenção às condições e aos utensílios livres de RNases, principalmente nessa etapa

Não proceder a microdissecção a laser por mais de 1 hora na mesma lâmina, pois o laser aquece

Figura 1. Visão das etapas para realização da microdissecção de GCs.

7) Isolamento de RNA

O isolamento do RNA obtido a partir das células-alvo (células vasculares de raízes de plantas controle) e CGs microdissectadas a partir de plantas infectadas foi realizado utilizando o *kit* PicoPure™ RNA Isolation *Kit* (Arcturus, EUA), seguindo as instruções do fabricante, com modificações. Como este *kit* atende outro sistema de microdissecção a laser, denominado Microdissecção de Captura a Laser, cujo método é o uso de uma catapulta para direcionar as microdissecções para o microtubo, as etapas iniciais para o isolamento do RNA foram adaptadas a partir do *kit*. Assim, as amostras foram centrifugadas imediatamente após o descongelamento, por 10 min, 16.000 rpm a 4 °C.

O sobrenadante foi removido e o precipitado foi ressuspenso com 10 µl do Tampão de Extração e incubado a 42 °C, por 30 min. Após a primeira etapa com o Tampão de Lavagem 1, foi feito o tratamento com DNase. Para tal, 40 µl da solução contendo 5 U de DNase TURBO™ (Ambion, EUA) em 1x de Tampão de Reação foram adicionados à coluna de purificação. Após 15 min de incubação à temperatura ambiente, outros 40 µl de Tampão de Lavagem 1 foram adicionados à coluna, que foi centrifugada por 15 s a 8.000 rpm. O RNA isolado foi eluído da coluna com a adição de 11 µl do Tampão de Eluição e armazenado a -80 °C.

8) Síntese de cDNA

As amostras foram submetidas à síntese da primeira fita de cDNA usando a enzima SuperScript™III Reverse Transcriptase (TR) (Invitrogen, EUA). Foram utilizados diferentes volumes de RNA, cuja concentração não foi possível ser estimada devido ao limite mínimo de detecção (≤ 2 ng/µl) do espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, EUA), segundo Aranda IV et al. (2009). Como a reação é realizada em duas etapas, duas misturas foram preparadas, totalizando 20 µl no volume final da reação. A Solução 1 (13 µl total) continha 1 µl de oligo (dT)₂₀ (50 µM); 1 µl de dNTP (10 µM) e 11 µl de RNA (5, 8 e 10 µl de RNA com volume final completado com água livre de nucleases para 11 µl). A Solução 2 (7 µl total) continha 4 µl de Tampão 5X; 2 µl de DTT 0,1M e 1 µl de SuperScript™ III RT (200 unidades/µl).

Em um termociclador (Bio-Rad Laboratories, EUA), a Solução 1 foi incubada por 5 min a 65 °C e mantida em gelo por 5 min. Em seguida, foi adicio-

nado ao tubo contendo a Solução 1, 7 µl da Solução 2 e o tubo foi incubado a 50 °C por 60 min, e por 15 min a 70 °C para inativar a reação. As amostras foram armazenadas -20 °C.

9) Amplificação de DNA complementar (cDNA)

A amplificação por PCR do cDNA de transcritos de genes expressos constitutivamente foi usada como um *proxy* para avaliar a qualidade e quantidade dos RNAs isolados. Os cDNAs sintetizados foram usados como sequências molde para a amplificação de sequências de genes com reconhecida expressão constitutiva em raízes de amendoim e soja, frequentemente usados em amplificações semiquantitativas em tempo real (RT-qPCR) (Tabelas 1 e 2). As sequências de nucleotídeos dos pares de iniciadores de PCR (*primers forward e reverse*) foram selecionados para amendoim (Morgante et al., 2011) e para soja (Miranda et al., 2013). As amostras para amplificação por PCR com volume final de 25 µl foram assim preparadas: 2,5 µl de tampão de reação 10x; 0,5 µl de MgCl₂ (25 mM); 0,5 µl de mistura de dNTP (10 µM); 1,0 µl de mistura de iniciadores (10 µM); 0,2 µl de enzima Taq DNA Polimerase (5 U/µl) (Cello, Brasil); 2 e 4 µl de molde do cDNA e o volume final completado com água para 25 µl. O programa usado para PCR foi: 95 °C - 5 min; 40 x (95 °C por 30 s; 60 °C por 30 s; 72 °C por 30 s); 72 °C por 2 min; 12 °C - ∞. Quinze microlitros do produto de PCR foram misturadas com o Tampão de Carregamento e colocados em gel de agarose 1,5% contendo o corante SYBR[™] Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, EUA) para separação eletroforética dos fragmentos amplificados.

Tabela 1. Iniciadores (*primers*) utilizados para amplificação de cDNAs das amostras de soja.

Gene	Descrição	Sequências de iniciadores (Fw e Rv)	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
<i>ELF1A</i>	Eukaryotic elongation factor 1-alpha	GACCTTCTTCGTTTCTCGCA/ CGAACCTCTCAATCACACGC	195
<i>UBC2</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	TCCCCTCACACCCTTCCTC/ CCATCCCAAGGGGTGTCAT	155
<i>CYP2</i>	Cyclophilin	CGGGACCAAGTGTGCTTCTTCA/ CCCCTCCACTACAAAGGCTCG	154

Tabela 2. Iniciadores (*primers*) utilizados para amplificação de cDNAs das amostras de amendoim.

Gene	Descrição	Sequências de iniciadores (Fw e Rv)	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
<i>60 S</i>	60S ribosomal protein L10	TGGAGTGAGAGGTGCATTTG/ TCTTTTGACGACCAGGGAAC	155
<i>ACT1</i>	Actin depolymerizing factor-like protein	TGGTCTCGGTTTCCTGAGTT/ AATACCACTCCAAAGCAAACG	114
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	CAACAACGGAGACATCAACG/ ATCACTGCCACCCAGAAAAC	190

Resultados e Discussão

O desenvolvimento e ajustes do protocolo aqui detalhadamente apresentado fornece uma base estratégica para se obter transcritomas específicos de CGs e células vasculares que dão origem a essas CGS, possibilitando a identificação de padrões de expressão conservados entre genes e/ou expressão diferencial ou exclusiva, em raízes de soja e amendoim infectadas pelo RKN *Meloidogyne* spp.

Processamento de células vasculares com RNA preservado

Um dos principais desafios da metodologia de microdissecção a laser é estabelecer a forma mais adequada para que as moléculas de RNA, nas células e tecido alvo sejam preservadas ao longo o processamento, desde a limpeza de plantas e isolamento dos fragmentos de raízes, passando pela fixação com uso de agentes químicos, desidratação intensa, infiltração com Paraplast Plus® sob alta temperatura, seccionamentos com inevitável exposição das células à RNases, bem como o isolamento de RNA em concentração e qualidade suficientes e finalmente, a síntese de bibliotecas de cDNA.

As microdissecções de tecidos radiculares de plantas de amendoim infectadas (9 DAI) com *M. arenaria* foram analisadas após tratamento com o corante, laranja de acridina (Figura 2). A ocorrência da cor vermelho-alaran-

jada na maioria das células, incluindo os conteúdos citoplasmáticos dos CGs, confirmou a presença de RNA total. Já nas secções tratadas com RNase A, a fluorescência vermelho-alaranjada em grande parte não foi detectada, nem nas regiões do citoplasma das GCs, onde a fluorescência verde indica a presença de DNA.

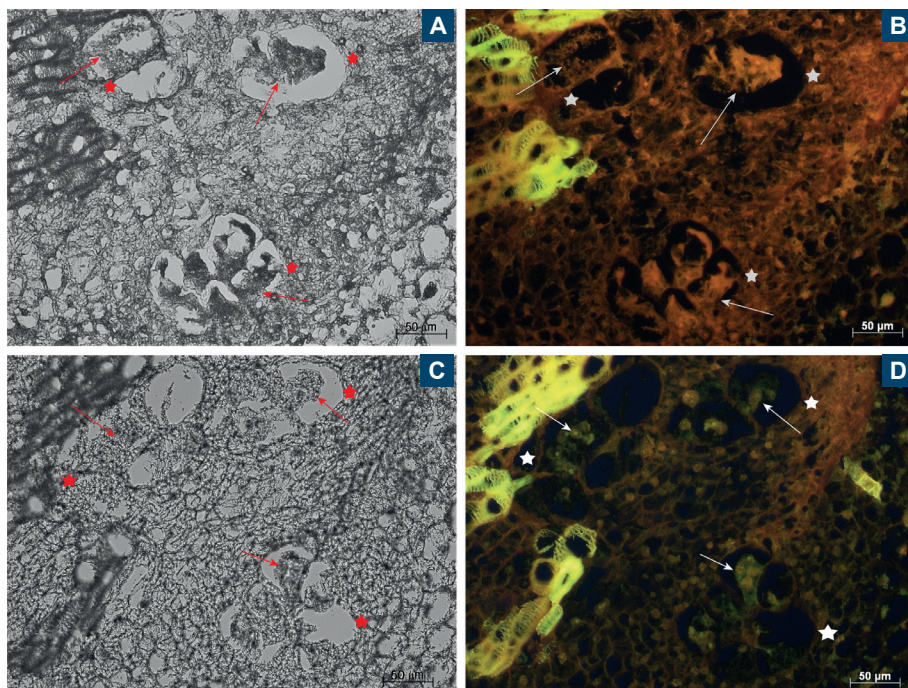


Figura 2. Duas secções do mesmo tecido vascular de raiz de planta de amendoim infectada com *M. arenaria* mostrando as CGs (*). As lâminas foram tratadas com o corante laranja de acridina (A, C: luz branca; B, D: luz azul – emissão em 460-490 nm). O vermelho-alaranjado indica a preservação de moléculas de RNA, enquanto a fluorescência verde se deve à presença de DNA e a amarela, à autofluorescência do xilema lignificado. O conteúdo citoplasmático dos CGs (*) aparece vermelho-alaranjado (b, setas), enquanto após o tratamento com RNase A, não se detectada essa cor (d, setas). Barras de magnificação: 50 µm.

A ocorrência de RNA indicada por vermelho-alaranjado em todas as células confirmou preservação de RNA total, apesar das numerosas etapas de processamento, permitindo assim, que avançássemos nos procedimentos para MDL, seguindo os mesmos cuidados para coleta e processamento das demais amostras, prescindindo deste tratamento para novas amostras.

Ajustes do MDL para isolamento de células radiculares

O isolamento das células com precisão suficiente e sua acumulação nas tampas dos microtubos pela gravidade, de maneira eficiente, é de particular importância na MDL, principalmente no presente estudo, onde as CGs tem número limitado em cada galha (2-6); possuem volume ainda reduzido no início do desenvolvimento e se sobrepõe entre si e outros tipos celulares. Por isso, o sistema de microdissecção a laser requereu ajustes finos dos parâmetros para emissão do feixe de laser entre outros para a realização da microdissecção com precisão suficiente para o isolamento das células-alvo, o que garantiu que as microdissecções fossem depositadas nas tampas dos microtubos, apesar de ainda terem algumas microdissecções aderidas a membrana da lâmina, indicando que a gravidade foi superada por outros tipos de força, tais como cargas eletrostáticas (Figura 3).

Os parâmetros de uso do feixe de laser mais adequados para alcançar resultados satisfatórios, de forma geral foram: potência: 38; abertura: 4; velo-

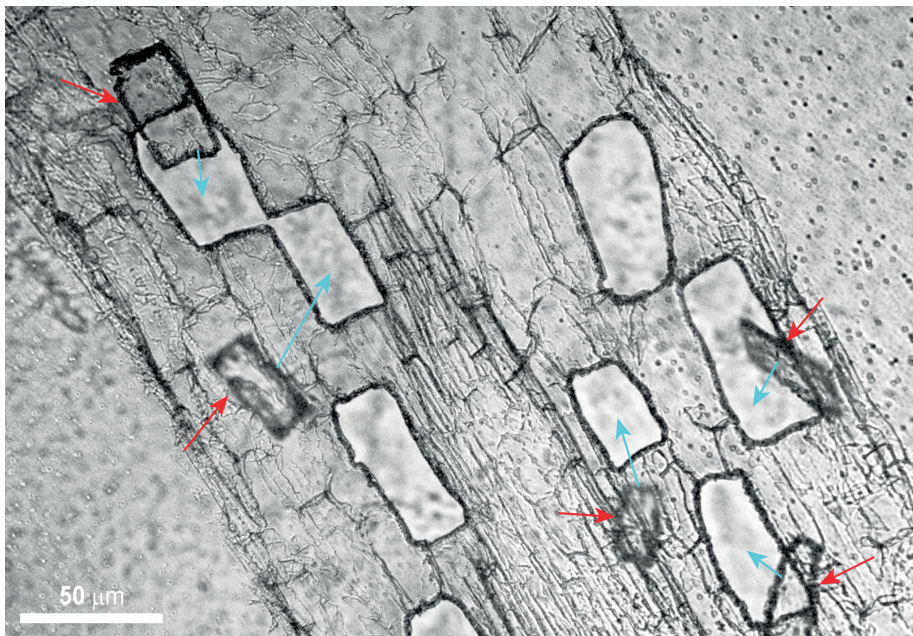


Figura 3. Células corticais radiculares aderidas a membrana PEN da lâmina LMD (setas vermelhas) devido às cargas eletrostáticas. Contorno da região onde estavam células que foram microdissectadas (setas azuis). Barra de magnificação: 50 µm.

cidade: 4; *specimen balance*: 10; *head current*: 95%; frequência de pulso do laser: 92 Hz. Sem esses ajustes anteriores e com o material em estudo, pode ocorrer uma grande perda das microdissecções ou simplesmente, adesão parcial dessas a membrana PEN da lâmina Leica, pois a força da gravidade é superada por outros tipos de força. Além disso, o tratamento com ultravioleta das lâminas MDL, antes da montagem das secções, foi uma medida importante para reduzir as cargas. Também durante o decorrer da calibração do raio laser, microdissecções-teste devem ser realizadas em outras células que não são células-alvo, pois o ajuste pode afetar a área de interesse.

Portanto, o ajuste fino da frequência de emissão do laser, no que diz respeito a potência, raio, pulsação e velocidade do feixe durante a microdissecção, na maioria dos casos, assumido menores valores, reduziram este efeito indesejado de perda de microdissecções. Mas importante lembrar que a busca pela adequação dos parâmetros deve ser realizada para cada nova lâmina quando colocada no MDL, e muitas vezes, numa mesma lâmina, os parâmetros têm que ser revistos devido às variações de temperatura e, principalmente de umidade, no microambiente da MDL.

Microdissecções de células vasculares utilizando a MDL

Quando os parâmetros apropriados para a operação do laser já estavam estabelecidos para isolamento de células do tecido vascular escolhido das raízes de plantas de amendoim controle (Figura 4), a microdissecção a laser foi realizada sem interrupção, a fim de reduzir o tempo de exposição das amostras para evitar contaminação com RNases. A microdissecção de células isoladas e de áreas do tecido vascular contendo essas células agrupadas visou a obtenção de um maior número de células de interesse, de forma mais acelerada e evitando danos ao RNA das células-alvo, causados pelo feixe de laser.

Aproximadamente 100 células do tecido vascular das raízes, oriundas da mesma região onde os nematoides induzem a formação das CGs foram individualmente microdissectadas (Figura 4A). Ainda, microdissecções de áreas do tecido vascular com várias células foram obtidas e coletadas separadamente (Figura 4B). Independentemente se eram células microdissectadas individualmente ou microdissecções de áreas de tecido vascular, a maioria das microdissecções foram direcionadas para as tampas dos microtubos (Figuras 4C, 4D).

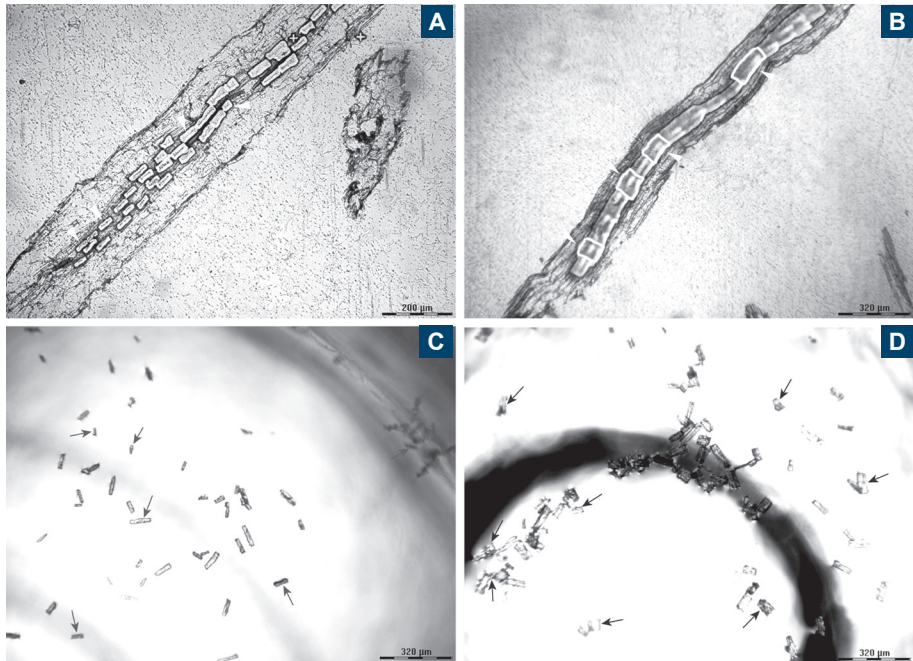


Figura 4. Raízes de plantas controle de amendoim. a) microdissecções de células vasculares individuais (cabeças de seta); b) regiões de tecido vascular microdissectadas (cabeças de seta); c) células individualmente microdissectadas observadas na tampa do microtubo no coletor (setas) e, d) áreas de tecido vascular microdissectadas na tampa (setas). Barras de magnificação: a: 200 μm ; b-d: 320 μm .

A alta porcentagem de microdissecções direcionadas para as tampas dos tubos no coletor, equivalendo a mais de 80%, independentemente de serem células vasculares isoladas ou em conjunto, corrobora a extrema importância dos ajustes feitos no sistema Leica, antes e durante a MDL em uma mesma lâmina, além do efeito positivo do tratamento com UV da lâmina para MDL.

Isolamento de RNA células-específico e um *proxy* para avaliação da concentração

Os RNAs foram isolados a partir das microdissecções tanto de células vasculares individualizadas microdissectadas, como áreas de tecido vascular de raízes de plantas controle de amendoim foram utilizados para a síntese de cDNAs. Devido à pequena quantidade de RNA obtidos, estes tiveram que ser

eluidos das colunas de extração do *kit* PicoPure® com o volume mínimo recomendado (11 µl) de Tampão de Extração. Mas ainda assim, não foi possível estimar as concentrações do RNA, pois estas possivelmente estavam abaixo do limite de detecção do espectrofotômetro UV Nanodrop ND1000, de 2 ng/µl (Aranda IV et al., 2009). Mas, como a transcriptase reversa utilizada permite a síntese de cDNA a partir de concentrações de RNA (10 pg), a síntese foi realizada utilizando-se 8 µl de RNA (mais de 70% do RNA total obtido).

A amplificação de genes com expressão constitutiva, tal como o *GAPDH* no cDNA molde, obtido a partir do RNA isolado das 100 células vasculares microdissectadas individualmente, não resultou em banda detectável, independentemente da quantidade de cDNA usada como molde (2 e 4 µl) (Figura 5, colunas 3, 4). No entanto, bandas no gel com o tamanho do fragmento amplificado esperado (190 pb) foram observadas, apesar de fracas, quando o cDNA foi obtido do RNA isolado de áreas do tecido vascular, tanto em menor, quanto maior concentração de cDNA molde (2 e 4 µl) (Figura 5, colunas 5 e 6, respectivamente).

Estes resultados indicam que, por meio indireto (*proxy*), a quantidade de RNAm isolado de células vasculares de raízes controle de amendoim, individualmente microdissectadas não foi suficiente para a síntese de cDNA, e que necessariamente, o número dessas células terá que ser aumentado, ou preferencialmente, estabelecer o uso de áreas de tecidos vasculares microdissectadas.

Isolamento de RNAm de CGs e um *proxy* para avaliação da concentração

A área total das CGs microdissectadas individualmente a partir de raízes de plantas de amendoim infectadas por *M. arenaria*, que já tinham galhas em formação correspondeu a 171,548 µm² (aproximadamente 0,171 mm²), área quase dez vezes menor do que a área de tecido vascular microdissectada com 1.675,323 µm² (aproximadamente 1,675 mm²) (Figura 6).

Em contraste com o cDNA gerado a partir de RNA isolado de CGs microdissectadas individualmente que não gerou fragmentos de amplificação, o cDNA molde obtido a partir de áreas de tecido vascular amplificou a expressão do gene *ACT1*, gene expresso constitutivamente em raiz de amendoim (Figura 7).

Interessante mencionar que em um estudo prévio de células da epiderme de cotilédones de *Arabidopsis* por microdissecção a laser, Sakai et al. (2018)

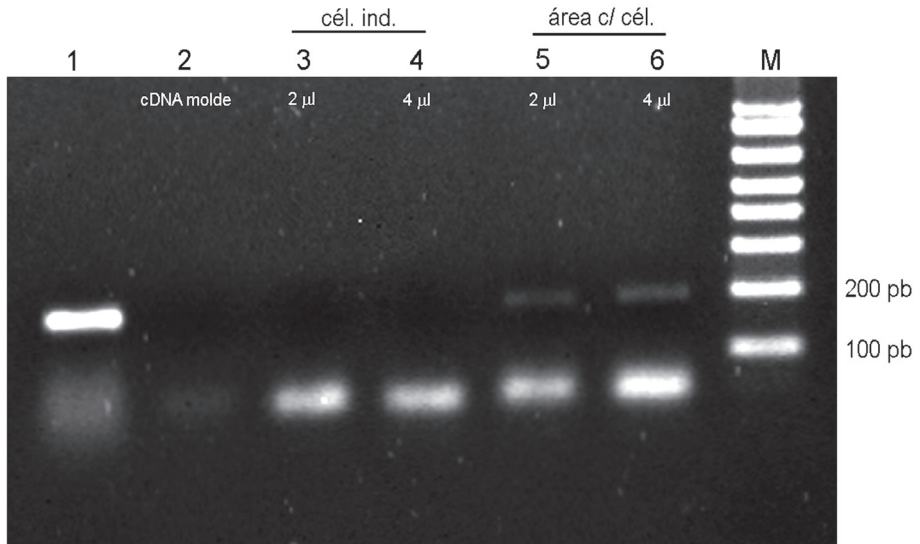


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose com bandas de fragmentos amplificados por PCR, correspondentes aos transcritos do gene *GAPDH* em cDNA obtido a partir do RNA isolado de áreas com tecido vascular (áreas c/ cel.) e células vasculares individuais (cel. Ind.) a partir da MDL de raízes de plantas controle de amendoim. 1) controle positivo (cDNA obtido de RNA isolado de várias raízes de amendoim); 2) controle negativo (água); cDNA obtido de RNA isolado a partir de 100 células vasculares microdissectadas individualmente: 3) 2 µl de cDNA molde, e 4) 4 µl de cDNA molde; cDNA obtido de RNA de áreas de tecido vascular microdissectado: 5) 2 µl de cDNA molde e 6) 4 µl de cDNA molde. As bandas abaixo de 100 pb são produtos de PCR devido à formação de dímeros de primers. M: marcador de peso molecular para DNA de 1 Kb.

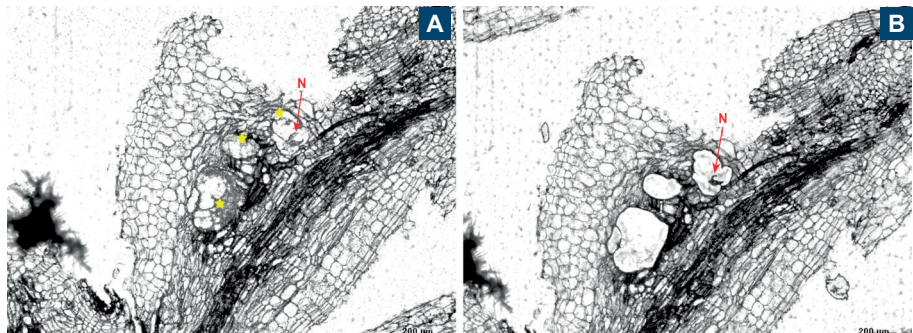


Figura 6. MDL da região da raiz de plantas de amendoim infectadas com *M. arenaria* antes (a) e após (b) a microdissecção de CGs (*) em uma galha. N=Nematoide. Barras de magnificação: 200 µm.

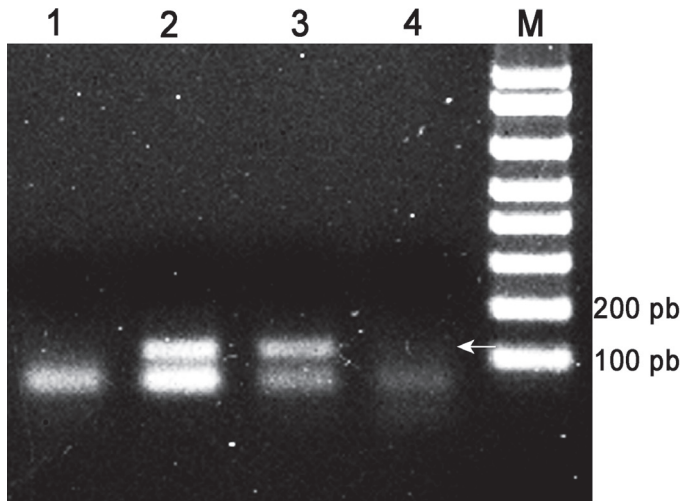


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose mostrando as bandas correspondentes aos fragmentos amplificados por PCR resultantes da expressão do gene *ACT1* em raízes de plantas de amendoim controle e infectado com *M. arenaria*, utilizando como molde, o cDNA obtido de RNA de regiões vasculares e CGs de raízes de plantas controle e infecção de amendoim. 1) controle negativo do PCR (água livre de nucleases). 2) controle positivo (cDNA oriundo de RNA isolado a partir de várias raízes de plantas de amendoim). 3) cDNA oriundo de 5 μ l RNA isolado das áreas vasculares microdissectadas de raízes de plantas controle de amendoim. 4) cDNA oriundo de 5 μ l RNA isolado das CGs microdissectadas. A seta branca marca o tamanho da banda esperada, 114 pb. Band M: marcador de peso molecular de DNA 1 kB.

relataram o isolamento de 200 pg de RNA, a partir de 20.000 μ m² de área microdissectadas. Considerando esta referência, conversões das microdissecções obtidas a partir de raízes de amendoim deveriam produzir cerca de 16,75 ng de RNA (1,5 ng/ μ l) e 1,7 ng (0,15 ng/ μ l), a partir das áreas vasculares de plantas controle e de CGs individualizadas, respectivamente. Mesmo que estas concentrações presumidas correspondessem à realidade das células de tecidos do amendoim, estas ainda seriam inferiores ao limite de detecção do espectrofotômetro, conforme discutido por Portillo et al. (2009). Portanto, as concentrações necessárias para obtenção de cDNA permaneceram sem ser estimadas.

Por outro lado, levando-se em consideração esse mesmo relato e ainda, presumindo-se que as áreas de tecido vascular microdissectada de raízes de plantas controle de amendoim fossem transcricionalmente similares a de coti-

lédones de *Arabidopsis*, poderia sim, obter-se RNA em quantidade suficiente para sintetizar cDNA, o que não aconteceu possivelmente devido a diferentes transcritos em células e tecidos, e fases de desenvolvimento.

Com base nesta premissa de RNA (3 µl) oriundos de áreas com tecido vascular, o cDNA molde utilizado para amplificação dos três genes com expressão constitutiva em raízes de amendoim não revelou outras bandas no gel além daquelas dos controles positivos (cDNA de raízes inteiras de amendoim), ou seja, a concentração de RNA aqui isolado foi menor do que aquela presumida para *Arabidopsis* (Sakai et al., 2018).

Ainda, as novas sínteses de cDNA realizadas utilizando maior quantidade de RNA ainda, tanto daquele isolado de microdissecções de tecido vascular, como de CGs individualizadas de plantas de amendoim mostraram amplificação apenas do *ACT1*, com tamanho de bandas correspondente ao descrito para os transcritos deste gene (Figura 7).

As bandas de amplificação de *ACT1* foram facilmente observadas quando o cDNA molde foi obtido de RNA de tecido vascular, enquanto a banda gerada pelo cDNA obtido de RNA de CGs, era mais discreta (Figura 7). No entanto, bandas amplificadas dos outros genes constitutivos não mostrados (*60S* e *GAPDH*) não foram observadas nos géis.

Ramsey et al. (2004) utilizaram apenas 7 µl de RNA (do total de 15 µl isolados com o *kit* PicoPure) de CGs microdissectadas de raízes de tomate 10 DAI com *M. javanica* para síntese do cDNA e na amplificação de *ACT* de tomate e da mitogen-activated protein kinase (MAPK), obtiveram bandas fracas em comparação com os controles positivos. Uma vez que, por exemplo, MAPK é regulado positivamente em CGs (Wang et al., 2003), a banda fraca indica também que a quantidade de RNA extraído de células individualmente microdissectadas é um fator limitante.

A soja: raízes, galhas, CGs, células vasculares, RNA, cDNA e amplificações

Considerando a importância da soja no Brasil e sua vulnerabilidade a RKNs, a MDL para análises transcricionais é bastante interessante, e portanto, experimentos foram realizados da mesma forma já descrita para amendoim foram conduzidas em raízes de plantas de soja controle e inoculadas

com *M. incognita*, a partir tecido vascular de raízes de soja (controle) e CGs em raízes infectadas por J2 de *M. incognita* (Figura 8).

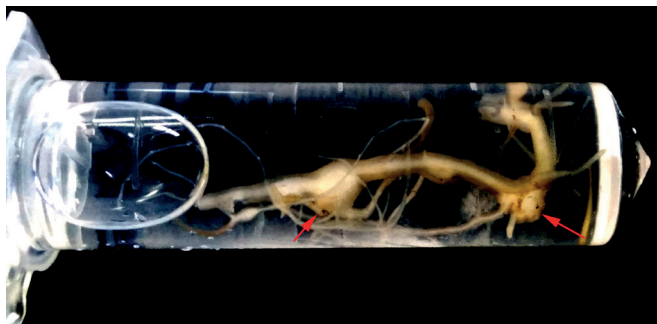


Figura 8. Sistema radicular de soja 17 DAI com J2 de *Meloidogyne incognita* dentro um microtubo de 2 ml.

As microdissecções em raízes de soja foram conduzidas com sucesso, conforme os parâmetros estabelecidos para amendoim (Figura 9). O isolamento de RNA com o mesmo *kit*, a obtenção de cDNA (10 μ l de RNA) e amplificação dos genes constitutivos *ELF1A*, *UBC2* e *CYP2* com bandas com diferentes intensidades ocorreram de forma fácil e mais rápida, já que o aprendizado com amendoim foi todo aplicado para soja.

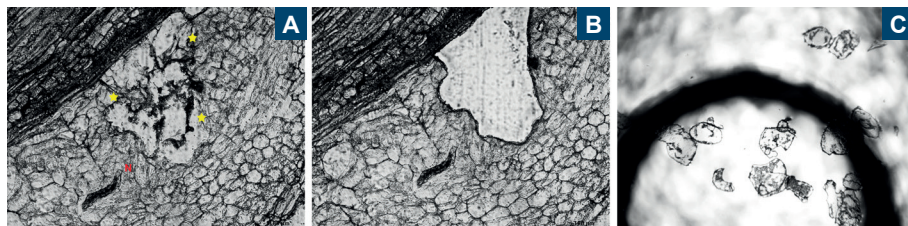


Figura 9. Raízes de plantas de soja infectadas com J2 de *M. incognita*. A) antes e B) após a microdissecção de CGs (*); C) presença das microdissecções na tampa aberta dos microtubos no coletor junto ao nematoide (N). Barras de magnificação: A, B:100 μ m; C: 320 μ m.

A banda com a amplificação de *CYP2* foi mais evidente com o cDNA oriundo de CGs individualmente microdissectadas do que no cDNA oriundo de RNA de células do tecido vascular, e a banda do controle positivo (Figura 10). Já a amplificação de *ELF1A* com o cDNA oriundo de CGs gerou uma banda

com baixa intensidade e foi indetectável a partir do cDNA oriundo do RNA de tecido vascular. Por outro lado, as bandas de *UBC2* mostraram certa especificidade de amplificação, conforme o cDNA molde utilizado: banda com fraca intensidade para o cDNA de RNA de CGs e controle positivo, e intensidade marginal com o cDNA de RNA de tecido vascular. Interessante que a expressão de *ELF1A* e *UBC2* foram exclusivamente detectadas no cDNA de CGs e de controle positivo.

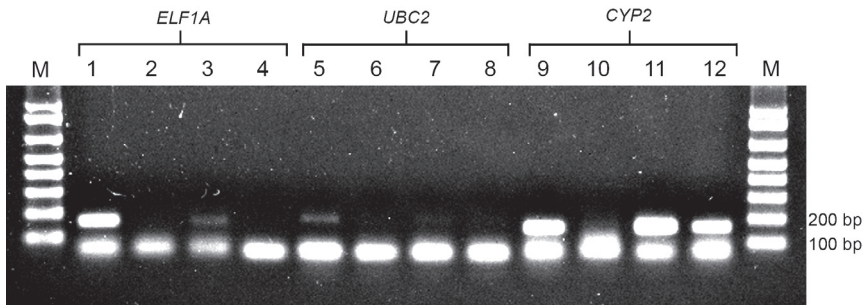


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose com bandas de fragmentos amplificados por PCR de três genes com expressão constitutiva, e utilizando como moldes, o cDNAs obtidos a partir do RNA isolado de CGs de raízes de plantas de soja inoculadas com *M. incognita* (17 DAI) e RNA de células de áreas de tecido vasculares das plantas de soja controle. Colunas 1-4) *ELF1A*; 5-8) *UBC2*; 9-12) *CYP2* e 1, 5, 9) controle positivo (cDNA obtido de RNA isolado de raízes de soja). Colunas 2, 6, 10) controle negativo (água); 3, 7, 11) cDNA de RNA de CGs microdissectadas individualmente; 4, 8, 12) cDNA obtido de RNA isolado de tecido vascular. M: marcador de peso molecular de DNA com 1 kB.

Os três genes selecionados têm expressão estável, sendo utilizados para normalização em estudos de expressão gênica semi-quantitativa (RT-qPCR) em soja (Miranda et al., 2013) e foram amplificados no controle positivo e a partir do o cDNA obtido de RNA oriundo de CGs de soja, indicando que a concentração de RNA e cDNA estavam disponíveis. O fator de alongamento eucariótico 1A (*ELF1A*) é mostrado como o gene de referência para RT-qPCR com a expressão mais estável em análises de expressão de genes de raízes infectadas com *M. incognita*. Jian et al. (2008) relataram também a estabilidade de expressão relativa em soja para os genes *CYP2*, *ELF1A* e *UBC2*. Portanto, a diferença na intensidade das bandas no gel dos fragmentos amplificados é provavelmente devido às variações nas concentrações de RNA isolado e usado para a síntese de cDNAs, e não por diferentes níveis de expressão.

A metodologia, aqui apresentada de forma didática, permitirá uma análise aprimorada do transcrito de CGs, células induzidas pelos nematoides da galha *Meloidogyne* spp., durante etapas iniciais da interação planta-patógeno por meio do isolamento de RNA específico destas células. Isto é sobretudo importante para os esforços contínuos do nosso grupo de pesquisa, bem como de outros grupos, que buscam identificar padrões de expressão gênica conservados ou exclusivos durante o desenvolvimento das GCs que formam o sítio de alimentação do parasita. Foram utilizadas plantas de duas leguminosas importantes, a soja e o amendoim, ambos suscetíveis a infecção por *Meloidogyne* spp., para estabelecer o procedimento mais adequado para obtenção de um transcrito específico de células essenciais para a sobrevivência e desenvolvimento do nematoide.

Na maioria dos estudos que tratam de análises transcricionais, baseadas em RNA obtido de células microdissectadas em um MDL, o principal desafio é manter a integridade do RNA ao longo das inúmeras etapas de processamento das amostras, seccionamento e isolamento do RNA em concentração mínima necessária para análise do transcrito por RT-qPCR (Portillo et al., 2009), para geração de bibliotecas de cDNAs, sequenciamento (Fuso-Nykaró et al., 2009) ou produção de RNA amplificado para abordagens de RNAseq (Honaas et al., 2013).

No presente trabalho, demonstramos que, no caso de microdissecção de células de raiz de soja e amendoim, o RNA isolado permitiu a síntese de cDNA confirmada pela expressão de alguns genes constitutivos, ratificando assim, a robustez de todos os ajustes no procedimento estabelecido.

O cDNA derivado de CGs em soja pode ainda ser usado para análise por RT-qPCR da expressão de genes específicos, que foram identificados em estudos anteriores, auxiliando a estabelecer, o seu envolvimento em mecanismos de defesa, tais como aqueles reportados por Beneventi et al. (2013), glicosiltransferases, peroxidases, proteínas responsivas a auxina e genes regulados por giberelina. Assim, verificar se de fato os genes candidatos possuem um papel importante para resistência da soja à RKN. O sequenciamento de bibliotecas de cDNAs derivadas de CGs e comparadas com as de áreas com tecido vascular de raízes de plantas não inoculadas permitirá a identificação de genes diferencialmente ou exclusivamente expressos, que em estudos anteriores, baseados na extração de RNA de toda a raiz,

possivelmente foram mascarados devido à sua baixa expressão e pequena quantidade de genes.

Além disso, os dados aqui apresentados, juntamente com outros da literatura (Ramsay et al., 2004 e Chavan et al., 2018) permitirão a transferência dos ajustes estabelecidos para a MDL de forma rápida e simples, para a realização de outros estudos que requerem transcrito de célula- ou tecido-específico, tornando a análise mais confiável e interpretável.

Conclusão

Os resultados aqui apresentados demonstram que o procedimento para a microdissecção a laser de CGs de raízes de leguminosa infectada por *Meloidogyne* spp. pela MDL foi estabelecido, com algum sucesso, possibilitando o isolamento de diferentes quantidades de RNA, sendo que alguns desses foram suficientes para a síntese de cDNA. Entretanto está evidente a necessidade de isolamento de um número muito maior de CGs. Para isso, vamos inocular duas vezes mais J2 de *M. arenaria* nas raízes de amendoim e utilizaremos a espécie *M. javanica* para inocular raízes de soja, já que essa espécie é altamente infectiva.

Por fim, este detalhamento do procedimento de obtenção de RNA específico de CGs pela MDL ou mesmo outras células-alvo em raízes destas leguminosas poderão auxiliar outros estudos, incluindo o com espécies diferentes de plantas ou mesmo outras espécies de *Meloidogyne* e nematoides. Dessa forma, contribuiremos para o avanço em estudos de transcritos específicos, de forma mais eficaz e assertiva, e trazer avanços para os programas de melhoramento genético visando controle de RKNs.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio à Pesquisa do DF (FAP-DF) pelas bolsas de pós-doutorado sênior a S. Nielen. Agradecimentos especiais à A.C. Meneses Gomes pelo suporte técnico e à B. Medeiros Pereira pelo fornecimento de nematoides.

Referências

- ARANDA, IV. R.; DINEEN, S. M.; CRAIG, R. L.; GUERRIERI, R. A.; ROBERTSON, J. M. Comparison and evaluation of RNA quantification methods using viral, prokaryotic, and eukaryotic RNA over a 104concentration range. **Analytical Biochemistry**, v. 387, p. 122–127, 2009.
- ARAUJO, A. C. G.; GUIMARAES, P. M.; MOTA, A. P. Z.; GUIMARAES, L. A.; PEREIRA, B. M.; VINSON, C. C.; LACERDA, A. L.; MARTINS, A. C. Q.; BRASILEIRO, A. C. M. Overexpression of DUF538 from Wild Arachis Enhances Plant Resistance to *Meloidogyne* spp. **Agronomy**, v. 11, n. 559, 2021.
- ASANO, T.; MASUMURA, T.; KUSANO, H.; KIKUCHI, S.; KURITA, A.; SHIMADA, H.; KADOWAKI, K. Construction of a specialized cDNA library from plant cells isolated by laser capture microdissection: toward comprehensive analysis of the genes expressed in the rice phloem. **The Plant Journal**, v. 32, p. 401-408, 2002.
- BARCALA, M.; GARCÍA, A.; CABRERA, J.; CASSON, S.; LINDSEY, K.; FAVERY, B; GARCÍA-CASADO, G.; SOLANO, R.; FENOLL, C.; ESCOBAR, C. Early transcriptomic events in microdissected Arabidopsis nematode-induced giant cells. **The Plant Journal**, v. 61, p. 698-712, 2010.
- BASSO, M. F.; LOURENÇO-TESSUTTI, I. T.; BUSANELLO, C.; PINTO, C. E. M.; DE OLIVEIRA FREITAS, E.; RIBEIRO, T. P.; DE ALMEIDA ENGLER, J. DE OLIVEIRA A. C.; MORGANTE, C. V., ALVES-FERREIRA, M.; GROSSI-DE-AS, M. F. Insights obtained using different modules of the cotton uceA1.7 promoter. **Planta**, v. 251(2):56, 2020a.
- BASSO, M. F.; ARRAES, F. B. M., GROSSI-DE-SÁ, M.; MOREIRA, V. J. V.; ALVES-FERREIRA, M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Insights Into Genetic and Molecular Elements for Transgenic Crop Development. **Front Plant Science**, v. 11:509, 2020b.
- BENEVENTI, M. A.; SILVA, O. B. da JR.; DE SÁ, M. E.; FIRMINO, A. A.; DE AMORIM, R. M.; ALBUQUERQUE, E. V.; DA SILVA, M. C.; DA SILVA, J. P.; CAMPOS, M. D. E. A.; LOPES, M. J.; TOGAWA, R. C.; PAPPAS, G. J. J. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Transcription profile of soybean-root-knot nematode interaction reveals a key role of phytohormones in the resistance reaction. **BMC Genomics**, v. 14, n. 322, 2013.
- BERTIOLI, D. J.; GAO, D.; BALLENTABORDA, C.; CHU, Y.; OZIAS-AKINS, P.; JACKSON, S. A.; HOLBROOK, C. C.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M. Registration of GA-BatSten1 and GA-MagSten1, two induced allotetraploids derived from peanut wild relatives with superior resistance to leaf spots, rust, and root-knot nematode. **Journal of Plant Registrations**, v. 15(2), p. 372-378, 2021.
- CHAVAN, S.; SCHNABEL, E.; CHRISTOPHER SASKI, C.; FRUGOLI, J. Fixation and laser capture microdissection of plant tissue for RNA extraction and RNASeq library preparation. **Current Protocols in Plant Biology**, v. 3, p. 14–32, 2018.
- DAVIS, E. L.; MEYERS, D. M.; BURTON, J. W.; BARKER, K. R. Resistance to root-knot, reniform, and soybean cyst nematodes in selected soybean breeding lines. **Journal of Nematology**, v. 30 (4S), p. 530-541, 1998.
- EMBRAPA Cerrados. Soluções Tecnológicas: Soja - BRS 7980. Disponível em: <https://www.embrapa.br/cerrados/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/182/soja---brs-7980>. Acesso em: 19 dez. 2022.

EMBRAPA Cerrados. Soluções Tecnológicas: Soja - BRS 8180RR. Disponível em: <https://www.embrapa.br/cerrados/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/181/soja---brs-8180rr>. Acesso em: 19 dez. 2022.

FOSU-NYARKO, J.; JONES, M.; WANG, Z. Functional characterization of transcripts expressed in early-stage *Meloidogyne javanica*-induced giant cells isolated by laser microdissection. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 237-248, 2009.

GUIMARAES, L. A.; MEDEIROS PEREIRA, B.; GUERRA ARAUJO, A. C.; MESSENERG GUIMARAES, P.; MIRANDA BRASILEIRO, A. C. Ex vitro hairy root induction in detached peanut leaves for plant–nematode interaction studies. **Plant Methods**, v. 13, n. 25, 2017.

GUIMARAES, P. M.; GUIMARAES, L. A.; MORGANTE, C. V.; SILVA, O. B. JR.; ARAUJO, A. C. G.; MARTINS, A. C. Q.; SARAIVA, M. A. P.; OLIVEIRA, T. N.; TOGAWA, R. C.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; BRASILEIRO, A. C. M. Root Transcriptome Analysis of Wild Peanut Reveals Candidate Genes for Nematode Resistance. **PLoS One**, v. 10, n. e0140937, 2015.

HUSSEY, R. S.; JANSSEN, G. J. W. Root-knot Nematodes: *Meloidogyne* Species. In: STARR, J. L.; COOK, R.; J. BRIDGE, J. (Eds). **Plant Resistance to Parasitic Nematodes**, CAB International, p. 43-70, 2002.

JIAN, B.; LIU, B.; BI, Y.; HOU, W.; WU, C.; HAN, T. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 9, n. 59, 2008.

KARAJEH, M. Interaction of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) and tomato as affected by hydrogen peroxide. **Journal of Plant Protection Research**, v. 48, n. 2, p. 181-187, 2008.

KLINK, V. P.; OVERALL, C. C.; ALKHAROUF, N. W.; MACDONALD, M. H.; MATTHEWS, B. F. Laser capture microdissection (LCM) and comparative microarray expression analysis of syncytial cells isolated from incompatible and compatible soybean (*Glycine max*) roots infected by the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) **Planta**, v. 226, p. 1389–1409, 2007.

LISEI DE SÁ, M. E.; CONCEICAO LOPES, M. J.; DE ARAUJO CAMPOS, M.; PAIVA, L. V.; DOS SANTOS, R. M.; BENEVENTI, M. A.; FIRMINO, A. A.; GROSSI DE SÁ, M. F. Transcriptome analysis of resistant soybean roots infected by *Meloidogyne javanica*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 272–282, 2012.

MARTINS, A. C.; MEHTA, A.; MURAD, A. M.; MOTA, A. P.; SARAIVA, M. A.; ARAÚJO, A. C.; MILLER, R. N. G.; BRASILEIRO, A. C. M.; GUIMARÃES, P. M. Proteomics unravels new candidate genes for *Meloidogyne* resistance in wild *Arachis*. **Journal of Proteomics**, v. 217, 103690, 2020.

MENDES, R. A. G.; BASSO, M. F.; DE ARAÚJO, J. F.; DE MELO, B. P.; LIMA, R. N.; RIBEIRO, T. P.; DA SILVA MATTOS, V.; SALIBA ALBUQUERQUE, E. V.; GROSSI-DE-SA, M.; DESSAUNE TAMEIRAO, S. N.; DA ROCHA FRAGOSO, R.; MATTAR DA SILVA M. C.; VIGNOLS, F.; FERNANDEZ, D.; GROSSI-DE-SA, M. F. Minc00344 and Mj-NULG1a effectors interact with GmHub10 protein to promote the soybean parasitism by *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. **Experimental Parasitology**, v. 229, 108153, 2021.

MIRANDA, V. D. J.; COELHO, R. R.; BARBOSA VIANA, A. A.; DE OLIVEIRA NETO, O. B.; DECHECHI GOMES CARNEIRO, R. M.; LIMA ROCHA, T.; GROSSI DE SÁ, M. F.; ROCHA FRAGOSO, R. Validation of reference genes aiming accurate normalization of qPCR data in soybean upon nematode parasitism and insect attack. **BMC Research Notes**, v. 6, n. 196, 2013.

MORGANTE, C. V.; GUIMARAES, P. M.; MARTINS, A. C. Q.; ARAUJO, A. C. G.; LEAL-BERTIOLI, S. C.; BERTIOLI, D.; BRASILEIRO, A. C. M. Reference genes for quantitative

reverse transcription-polymerase chain reaction expression studies in wild and cultivated peanut. **BMC Research Notes**, v. 4, n. 339, 2011.

MOTA, A. P. Z.; VIDIGAL, B.; DANCHIN, E. G. T.; TOGAWA, R. C.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; GUERRA ARAUJO, A. C. G.; MIRANDA BRASILEIRO, A. C.; MESSENBURG GUIMARAES, P. Comparative root transcriptome of wild *Arachis* reveals NBS-LRR genes related to nematode resistance. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 159, 2018.

OLIVEIRA, A. C. B. de; LANDGRAF, L. BRS Corisco reluz no nordeste brasileiro. Embrapa Soja, 2003. 1 folder.

PEREIRA, B. M.; GUIMARAES, L. A.; SOUZA, N. O.; SARAIVA, M. A.; GUIMARAES, P. M.; BRASILEIRO, A. C. M. Overexpression of wild *Arachis* lipocalin enhances root-knot nematode resistance in peanut hairy roots. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 37(1), p. 74-86, 2019.

PORTILLO, P.; LINDSEY, K.; CASSON, S.; GARCÍA-CASADO, G.; SOLANO, R.; FENOLL, C.; ESCOBAR, C. Isolation of RNA from laser-capture-microdissected giant cells at early differentiation stages suitable for differential transcriptome analysis. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 523-535, 2009.

POVEDA, J.; ABRIL-URIAS, P.; ESCOBAR, C. Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes by Filamentous Fungi Inducers of Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, a. 992, 2020.

RAMSAY, K.; WANG, Z.; JONES, M. G. K. Using laser capture microdissection to study gene expression in early stages of giant cells induced by root-knot nematodes. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, p. 587-592, 2004.

ROCHA, R. O.; MORAIS, J. K.; OLIVEIRA, J. T.; OLIVEIRA, H. D.; SOUSA, D. O.; SOUZA, C. E. A.; MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; DE SOUZA JÚNIOR, J. D. A.; GROSSI DE SÁ, M. F.; VASCONCELOS, I. M. Proteome of soybean seed exudates contains plant defense-related proteins active against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63(22), p. 5335-5343, 2015.

SAKAI, K.; TACONNAT, L.; BORREGA, N.; YANSOUNI, J.; BRUNAUD, V.; PAYSANT-LE ROUX, C.; DELANNOY, E.; MARTIN MAGNIETTE, M.-L.; LEPINIEC, L.; FAURE, J. D.; BALZERGUE, S.; DUBREUCQ, B. Combining laser-assisted microdissection (LAM) and RNA-seq allows to perform a comprehensive transcriptomic analysis of epidermal cells of *Arabidopsis* embryo. **Plant Methods**, v. 14, n. 10, 2018.

SIMPSON, C. E.; STARR, J. L. Registration of 'COAN' peanut. **Crop Science**, v. 41, p. 918, 2001

SIMPSON, C. E.; STARR, J. L.; CHURCH, G. T.; BUROW, M. D.; PATERSON, A. H. Registration of 'NemaTAM' peanut. **Crop Science**, v. 43, p. 1561, 2003.

SOUSA, T. R. C. de. Relatório de avaliação dos impactos de tecnologias geradas pela Embrapa. Nome da tecnologia: Cultivar de Soja BRS 7380 RR. Embrapa Cerrados, 2020, 21 p.

TALAVERA-RUBIA, M.; VELA-DELGADO, M. D.; VERDEJO-LUCAS, S. Nematicidal efficacy of Milbemectin against root-knot nematodes. **Plants**, v. 9, n. 839, 2020.

VILJOEN, J. J. F.; LABUSCHAGNE, N.; FOURIE, H.; SIKORA, R.A. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomatoes and carrots by plant growth-promoting rhizobacteria. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, p. 284-291, 2019.

WANG, Z.; POTTER, R. H.; JONES, M. G. K. Differential display analysis of gene expression in the cytoplasm of giant cells induced in tomato roots by *Meloidogyne javanica*. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 361-371, 2003.



*Recursos Genéticos
e Biotecnologia*

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA
E PECUÁRIA



CGPE 017993