

Brasília, DF / Fevereiro, 2026

Extração de RNA total de células-alvo isoladas por microdissecção a laser

Rafaela Schietti⁽¹⁾, Danielle Assis de Faria⁽²⁾, Nathália Nascimento de Aguiar⁽²⁾, Ana Claudia Guerra de Araujo⁽³⁾

⁽¹⁾ Graduanda em Biologia, bolsista, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. ⁽²⁾ Bolsista, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. ⁽³⁾ Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Introdução

A dinâmica celular pode variar mesmo entre células do mesmo tipo, próximas ou distantes entre si, ou entre células vizinhas imediatas. Apesar do reconhecimento dessa individualidade, a maioria dos estudos sobre expressão gênica se baseia ainda, em populações heterogêneas de células, tecidos ou órgãos, homogeneizados juntos. Assim, genes com níveis elevados de expressão frequentemente mascaram eventos transcripcionais de menor magnitude (Klink et al., 2007), gerando distorções no perfil gênico e comprometendo a precisão transcritômica em nível celular. Por essa razão, a acurácia no isolamento do RNA é determinante: quando este é obtido de uma única célula (*single-cell transcriptome*) ou de um grupo restrito de células-alvo, a probabilidade de reconstruir um panorama de transcrição mais compreensivo e fidedigno aumenta significativamente (Jovic et al., 2022; Perez et al., 2022).

O avanço das tecnologias de RNA-seq e o desenvolvimento da microscopia de dissecção a laser (MDL) facilitaram análises de transcriptoma de célula única (*single-cell transcriptome*) ou de grupo de células específicas. Essas tecnologias tornaram-se estratégicas para a obtenção de transcriptomas

mais robustos e a identificação de genes antes encobertos pela expressão dominante de outros genes (Ren et al., 2015; Satterlee et al., 2020; Han et al., 2023). Com a MDL e RNA-seq, a análise gênica atinge, pela primeira vez, uma resolução espaço-temporal em nível celular.

Inicialmente utilizada para o isolamento de células individuais em tecidos de mamíferos (Emmert-Buck et al., 1996; Bonner et al., 1997), a MDL passou a ser amplamente aplicada na área médica, destacando-se na patologia, análise de mutações em células únicas e caracterização molecular de células cancerígenas (Datta et al., 2015). Posteriormente, seu uso foi estendido a diferentes ramos das ciências ômicas, incluindo pesquisas com células de plantas (Barmukh et al., 2025). Entretanto, sua aplicação em plantas enfrenta desafios, uma vez que o RNA obtido a partir de tecidos vegetais frequentemente é fragmentado e em baixa concentração devido a dificuldades no processamento das amostras e isolamento do RNA, pois são células com parede celular e vacúolos que podem ter um grande volume, comprometendo análises de RNA-seq (Asano et al., 2002). Ainda assim, a técnica tem possibilitado avanços relevantes também na área vegetal, tal como a identificação de genes diferencialmente expressos em raízes em desenvolvimento e a caracterização de respostas a estresses e a processos infecciosos

(Lancot, 2024; Coll et al., 2025; Pelletier et al., 2025; Pereira et al., 2025; Wu; Scanlon, 2025; Zhou et al., 2024; Zhu et al., 2025).

Estima-se que os fitonematoides (da galha e de cisto) provoquem anualmente perdas em culturas importantes correspondendo a aproximadamente 80 bilhões de dólares em prejuízo para a agricultura (Abd-Elgawad; Askary, 2015).

Entre os patossistemas de nosso interesse, destacam-se os nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.), que infectam mais de 3.000 espécies vegetais e causam grandes perdas anuais na agricultura. O controle desse parasita é particularmente desafiador e requer múltiplas estratégias (Viljoen et al., 2019; Ayala-Dañas et al., 2020; Poveda et al., 2020). Embora o uso de cultivares resistentes seja uma das abordagens mais eficazes, sua disponibilidade ainda é limitada e frequentemente comprometida pela quebra de resistência pelo patógeno. Assim, o desenvolvimento de novas linhagens resistentes continuamente é essencial para contribuir para um manejo eficaz e sustentável (Afzal; Mukhtar, 2024).

As células gigantes (CG), originadas de células do periciclo vascular (CV) em raízes de plantas infectadas por *Meloidogyne* spp. são reprogramadas em resposta às secreções liberadas pelo nematoide, para constituir o sítio de alimentação essencial ao parasita (Escobar et al., 2015). As CV passam por profundas alterações estruturais e funcionais e atuam como fonte de nutrientes para o patógeno até a fase adulta e, portanto, a formação das CG representa uma etapa central e indispensável na interação nematoide-hospedeira (Bleve-Zacheo; Melillo, 1997). A formação das CG inicia-se após a penetração do J2 na raiz e migração ao longo do cilindro vascular, quando o nematoide secreta metabólitos para alterar a fisiologia de algumas CV. Células com maior volume (100 x maior), citoplasma pouco denso e presença de múltiplos núcleos começam a ser observadas juntamente com a proliferação e hipertrofia das células vizinhas do cilindro vascular e córtex para a formação da galha. Esse ciclo de vida varia consideravelmente, mas pode ser completado entre 21 a 30 dias após a infecção (DAI) quando a temperatura do solo está entre 21 e 32 °C. Esse tempo também varia em função da planta hospedeira, da virulência do inóculo além de outras condições. Em nossos experimentos foi determinado que a maior parte dos J2 penetrava as

raízes até o 5 DAI e, portanto, a formação das CG e das galhas tem início aproximadamente a partir de 9 DAI.

A aplicação da MDL para o estudo da interação planta-*Meloidogyne* ,foi pioneiramente descrita por Ramsey et al. (2004), que obtiveram RNA de CG em tomateiro infectado por *M. javanica* e identificaram a expressão mais elevada de dois genes de ciclina do tipo D, *LeCycD3;2* e *LeCycD3;3* em comparação com outros genes de ciclina relacionados ao ciclo celular, sugerindo que a indução da fase G1 do ciclo celular pode ser desencadeada pelo nematoide. Desde então, diversos estudos têm utilizado a técnica para isolar RNA de células-alvo e, posteriormente, analisar transcritos de células de sítios de alimentação, incluindo sincícios induzidos por nematoides de cisto (Ithal et al., 2007; Klink et al., 2007). Além disso, Fosu-Nyarko et al. (2009) identificaram um homólogo do gene da proteína Phi-1 relacionado ao ciclo celular no tabaco, expresso 8,5 vezes a mais no citoplasma das CG do que em CV. Mais recentemente, avanços técnicos permitiram a obtenção de RNA de alta qualidade em diferentes hospedeiros (Anjam et al., 2022; Schmidt, 2025; Zhang et al., 2025), facilitando a possível identificação de genes com expressão diferencial.

Nosso grupo de pesquisa da Embrapa Cenargen, tem se dedicado à caracterização da expressão gênica diferencial em leguminosas infectadas por *Meloidogyne* spp., visando identificar genes candidatos associados à reprogramação celular, modulação metabólica e supressão de defesas. A identificação de tais genes abre caminho para o desenvolvimento de novos ativos biotecnológicos e ferramentas inovadoras a serem incorporados a programas de melhoramento genético, visando à geração de cultivares mais resistentes a *Meloidogyne*. Além disso, a caracterização funcional desses genes pode revelar alvos moleculares promissores, tanto para a engenharia genética, quanto para estratégias de edição de genomas (por exemplo, via CRISPR-Cas), contribuindo para ampliar o arsenal de alternativas para um manejo sustentável desse patógeno altamente impactante para a agricultura.

Neste trabalho, apresentamos um novo protocolo para o isolamento de RNA de CG e CV de raízes de soja e amendoim infectadas ou não por *Meloidogyne* spp., respectivamente, utilizando a MDL. Foram identificadas etapas críticas responsáveis por grande parte da degradação e perda de RNA: (i) a infiltração e inclusão dos

fragmentos radiculares a altas temperaturas (Paraplast Plus®); (ii) a microtomia das secções à temperatura ambiente; (iii) longo tempo de exposição ao laser durante a microdissecção; (iv) a pouca quantidade e baixa preservação das células-alvo microdissectadas e (v) o processo de isolamento do RNA. Para superar essas questões, foram utilizados diferentes protocolos disponíveis na literatura, ou não com modificações. Assim foi incluído o criométodo, a fixação e remoção do meio de inclusão das criosecções; a dissecção a laser foi agilizada, um número maior de células-alvo coletado e preservados em solução protetora de RNA e, finalmente, a avaliação preliminar da qualidade e concentração do RNA a cada etapa modificada, de forma célere e de baixo custo.

As modificações implementadas resultaram em RNA com qualidade adequada para análise via RNA-seq. Esse avanço metodológico viabiliza análises transcritômicas célula-específicas de alta resolução e permite uma validação espaço-temporal mais precisa dos mecanismos moleculares que regulam a interação planta-nematoide, especialmente em etapas críticas para o sucesso da infecção.

Material vegetal e bioensaios

Sementes de *Arachis hypogaea* 'Runner' (amendoim) e *Solanum lycopersicum* 'Santa Clara' (tomate) foram esterilizadas e semeadas em copos de 500 mL contendo mistura estéril de solo e substrato (2:1, v/v). Os recipientes foram mantidos em bandejas com água, em casa de vegetação. Após seis semanas, as plantas de amendoim e tomate foram inoculadas com aproximadamente 5.000 juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne arenaria* e *M. incognita* raça 1, respectivamente. As raízes foram utilizadas como fonte de ovos aos 60 DAI.

Os ovos foram extraídos por peneiramento, conforme descrito por Godinez-Vidal et al. (2024), incubados em água destilada por sete dias para permitir a eclosão, e os J2 foram coletados a cada dois dias para utilização nos bioensaios.

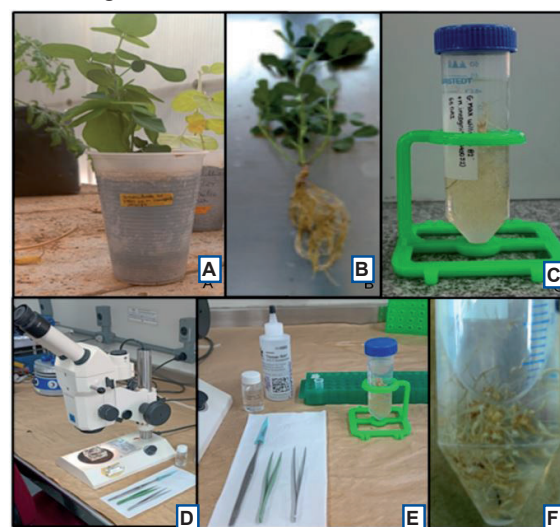
Novas sementes de amendoim e de *Glycine max* 'Williams 82' (soja) foram esterilizadas, semeadas e cultivadas em casa de vegetação por oito semanas. Em seguida, aproximadamente 5.000 J2 de *M. arenaria* e *M. incognita* foram inoculados no solo adjacente às raízes das plantas de amendoim e soja, respectivamente. As raízes

foram coletadas aos 10 DAI, quando a formação das CG já iniciou aos 20 DAI quando as CG estão diferenciadas e metabolicamente ativas, e aos 30 DAI para confirmar o sucesso da infecção por meio da observação de fêmeas e ovos. Fragmentos com indicativos de alteração morfológica na região do cilindro vascular também foram coletadas. Plantas controle foram inoculadas apenas com água e coletadas nos mesmos períodos.

Processamento de amostras

As plantas de amendoim e soja foram mantidas nos copos plásticos após a inoculação até os períodos de coleta (10, 20 e 30 DAI) (Figura 1A). As raízes foram lavadas em água corrente (Figura 1B) e imediatamente transferidas para tubos de 50 mL contendo solução fixadora recém-preparada (etanol absoluto: ácido acético glacial, 3:1, v/v) (Figura 1C), onde permaneceram a 4 °C por 12 h. Em seguida, a solução foi substituída por etanol 70% e armazenadas a 4 °C. As amostras foram então transferidas para placas de Petri contendo etanol 70% a 4 °C e observadas em estereomicroscópio Stemi SV6 (Zeiss, Alemanha) (Figura 1D). Porções oxidadas ou danificadas foram removidas com auxílio de pinças, bisturis e agulhas (Figura 1E). Aproximadamente 50 fragmentos de raízes contendo uma ou mais galhas, ou dilatações laterais típicas de galhas em formação, foram isolados e transferidos para novos tubos com etanol 70% (Figura 1F) e armazenados a 4 °C. Fragmentos de raízes de plantas não inoculadas (controle) foram também coletados e processados da mesma forma.

Figura 1: Soja inoculada com nematoides e raízes contendo galhas.



Fotos: Ana Claudia Guerra

Figura 1. A) Planta de soja com seis semanas de idade inoculada com J2 de *Meloidogyne incognita*; B) Raízes lavadas de planta coletada aos 10 DAI; C) Raiz de planta em solução fixadora; D e

E) Estereomicroscópio e itens de laboratório para o isolamento de fragmentos de raízes; F) Fragmentos de raízes em etanol 70%.

Para melhorar a infiltração do meio de inclusão na amostra, na etapa seguinte ao processamento, cerca de 20 fragmentos de raízes foram selecionados e seu tamanho foi reduzido para aproximadamente 1 cm de comprimento, tanto das amostras de raízes inoculadas como controle (Figuras 2A e B). Os fragmentos reduzidos foram transferidos para microtubos com etanol 100% e mantidos por 1 h a 4 °C (Figura 2C). O etanol foi substituído três vezes, em intervalos de 1 h.

Em seguida, aproximadamente metade do volume de etanol 100% foi removido e foi adicionado o meio de inclusão *Optimal Cutting Temperature* (O.C.T., Leica) (Figuras 2C e D), na proporção de 500:100 µL. Os tubos foram mantidos em câmara fria sob rotação (4 rpm/min) (Figura 2E) para homogeneização da solução e melhor infiltração do meio na amostra. Foram adicionados gradualmente, 100 µL de O.C.T. a cada 2 h (quatro adições). Posteriormente, o O.C.T. foi removido do tubo e foram acrescentados 600 µL de O.C.T. puro, permanecendo por 2 h a 4 °C sob rotação. Essa etapa foi repetida outras duas vezes.

A implementação da criopreparação da amostra foi essencial para a preservação da estrutura celular e do RNA, uma vez que o O.C.T. permite infiltração em baixa temperatura (Barcala et al., 2020), substituindo o Paraplast Plus®, que requer altas temperaturas para dissolução (42-56 °C).

Os fragmentos foram transferidos para moldes metálicos pequenos utilizados para histologia (Figura 3A), já contendo O.C.T. líquido na parte central (Figura 3B). Mais O.C.T. líquido foi acrescentado a forma, até cobrir as amostras. Com o O.C.T. ainda líquido, as amostras foram orientadas para obtenção de criosecções longitudinais, transversais ou agrupadas (3-4 fragmentos por bloco). Para polimerização, os moldes foram mantidos no criostato a -20 °C (Figura 3C) por aproximadamente 10 min, resultando em um bloco com várias amostras (Figura 3D). Os blocos foram armazenados a -80 °C, em condições livres de umidade e de RNases, até o uso.

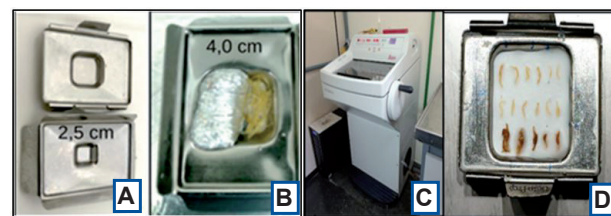
Figura 2: Isolamento e infiltração das amostras a baixa temperatura.



Fotos: Ana Claudia Guerra

Figura 2. A) fragmentos de raízes controle de amendoim sem galhas imersos em etanol 70%; B) fragmentos de raízes de amendoim coletadas aos 20 DAI (dias após inoculação) com J2 de *M. arenaria* mostrando galhas; C) meio de inclusão O.C.T.; D) microtubo com fragmentos de raízes (~1 cm) em etanol; E) rotador de microtubos. Barras: 1 cm

Figura 3. Montagem de amostras.



Fotos: Ana Claudia Guerra

Figura 3. A) moldes para inclusão de amostras com a região central mais profunda do que o entorno para comportar amostras mais volumosas; B) molde contendo aproximadamente 20 fragmentos de raízes em O.C.T. líquido; C) criostato Leica CM3050 S com tampo de vidro fechado; D) bloco de O.C.T. polimerizado a baixa temperatura com amostras orientadas longitudinalmente.

Amostras previamente armazenadas a -80 °C foram aclimatadas por 30 min a -20 °C na câmara do criostato, antes da montagem das amostras. Em seguida, as amostras no bloco polimerizado de O.C.T. foram individualizadas com auxílio de um bisturi, originando várias inclusões com um ou mais fragmentos radiculares.

Para a montagem de cada inclusão, aplicou-se uma fina camada de O.C.T. líquido, tanto na face da inclusão oposta à região da amostra, como na superfície estriada do suporte metálico redondo (peça móvel que vem junto do criostato). A inclusão

com a amostra individualizada foi então assentada sobre esse suporte, garantindo que o fragmento de raiz permanecesse voltado para a face oposta àquela de fixação da inclusão no suporte (Figuras 4 A–B). O conjunto suporte/inclusão foi mantido no criostato a -20°C até a polimerização completa do O.C.T. utilizado para fixação da inclusão, assegurando uma firme adesão da amostra à base metálica (Figura 4C). Visando otimizar o tempo, múltiplas inclusões provenientes de uma mesma raiz foram preparadas evitando a mistura de amostras distintas. Essa estratégia possibilitou, na etapa seguinte, obter várias criosecções sucessivas, de uma mesma raiz, mas em diferentes inclusões, em apenas uma única lâmina destinada à MDL.

O excesso de O.C.T. ao redor da amostra foi removido (trimado) com auxílio de uma lâmina de aço, deixando apenas uma borda estreita de O.C.T. em torno da amostra. Esse ajuste reduziu o atrito do bloco contra a navalha de aço de alto perfil durante o criosecionamento, o que favoreceu o avanço uniforme da amostra e maior agilidade nessa etapa. O suporte contendo a inclusão foi acoplado ao braço do criostato, de modo que a amostra permanecesse voltada para a lâmina de corte, e para o indivíduo que manipula o criostato. (Figura 4D).

Figura 4. Montagem dos blocos com amostras.

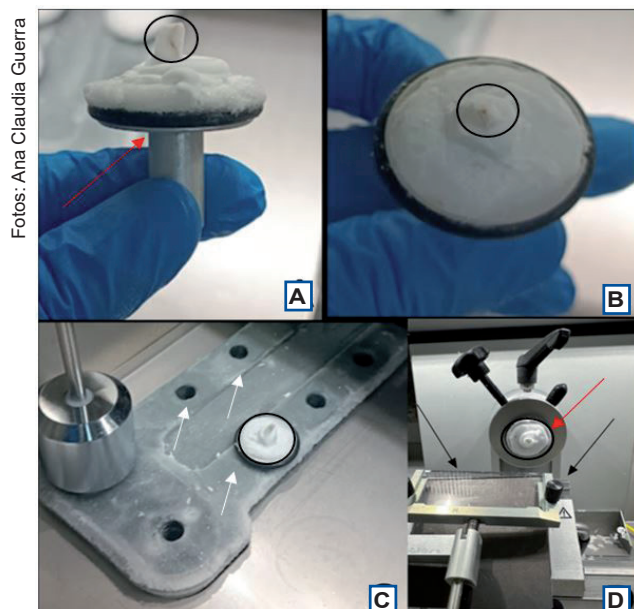


Figura 4. Montagem dos blocos com amostras. A) inclusão de O.C.T. contendo um fragmento de raiz (vista longitudinal - círculo preto) montado no suporte metálico redondo (seta vermelha), de forma que as criosecções obtidas serão transversais; B) mesma inclusão, mas já trimado (círculo preto) para reduzir o tamanho da área da criosecção; C) bandeja com orifícios para manutenção das inclusões a baixa temperatura na câmara do criostato (setas brancas); D) imagem da câmara do criostato mostrando a navalha de aço montada (setas pretas) e ponto de encaixe para o suporte/inclusão de amostra (seta vermelha).

Criosecionamento e tratamento das criosecções

As amostras foram criosecionadas em criostato Leica CM3050 a -20°C (Figura 3C) a -30°C , com auxílio de itens de laboratório para coleta de cada criosecção (Figura 5A). A espessura das criosecções foi ajustada no painel do equipamento, bem como o controle da temperatura da câmara do criostato, um relógio e a trava do movimento do braço para avanço da amostra em direção a lâmina de aço) (ex.: $10\text{ }\mu\text{m}$; Figuras 5B e C). A aproximação da inclusão com a amostra ocorreu gradualmente, até a observação das primeiras secções contendo amostras ainda na navalha. Quatro secções iniciais foram transferidas para lâmina histológica contendo gotas de água (Figura 5D) e avaliadas em microscopia de luz em campo claro (Figura 5E) ou contraste de fase em microscópio Axiophot (Zeiss, Alemanha). O criosecionamento prosseguiu apenas quando as secções apresentavam integridade estrutural e presença das células de interesse. Falhas ocasionais relacionadas à escolha da raiz, preparo dos fragmentos, fixação ou infiltração inviabilizam o uso da amostra. Por essa razão, a disponibilidade de múltiplas inclusões é estratégica para garantir a continuidade do processo rapidamente.

Confirmada a presença de CG, o criosecionamento foi conduzido de forma sistemática. As membranas PEN, que vêm montadas em lâminas de vidro ou em molduras metálicas foram previamente tratadas com UV, por 30 minutos, na semana da sua utilização. Esse tratamento visa a eliminação de RNases. Quando as membranas estavam montadas em lâmina de vidro, assegurou-se que as criosecções fossem depositadas sobre o lado da lâmina contendo a membrana (jamais depositadas diretamente no vidro). Cada criosecção foi cuidadosamente transferida para uma gota de etanol 70% ($20\text{--}30\text{ }\mu\text{L}$) sobre membrana PEN (polietileno naftalato, $2,0\text{ }\mu\text{m}$), em uma lâmina de vidro (Leica 11505158) ou em moldura metálica (Leica 11600289) (Figuras 5F e G, respectivamente). Cada membrana recebeu aproximadamente $30\text{--}40$ gotas distribuídas sobre sua superfície e entre $10\text{--}12$ secções foram transferidas para cada gota.

Além de promover a melhor preservação das estruturas celulares e do RNA, a utilização do O.C.T. outra vantagem em relação à inclusão em parafina. A transparência do O.C.T. como meio de inclusão facilitou a visualização da amostra tanto durante a montagem, como no criosecionamento. A implementação da criomicrotomia foi fundamental

para obtenção de um RNA íntegro e em maior concentração.

Figura 5. Criosecccionamento.

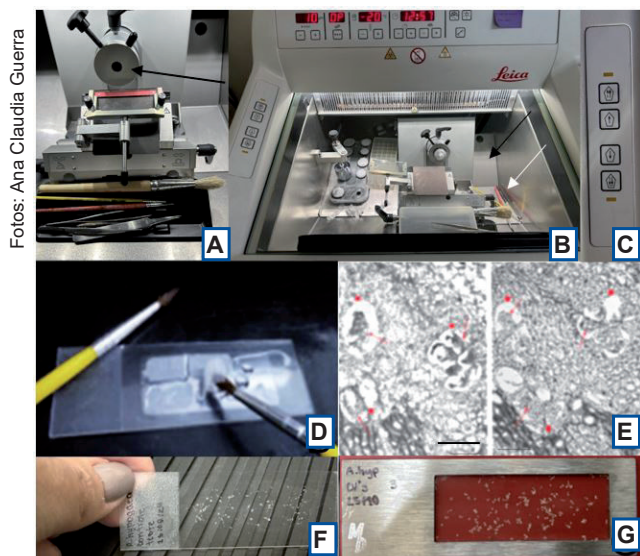


Figura 5. Crioecrescimento. A) braço do criostato mostrando local de encaixe para o suporte com a inclusão contendo a amostra (seta preta) e instrumentos laboratoriais necessários para o crioecceccionamento; B) câmara do criostato com a tampa aberta e o braço do criostato com a amostra já posicionada (seta preta). Detalhe da lâmina de aço de alto perfil (seta branca); C) detalhe do painel do equipamento para definição da espessura da crioecceção; D) quatro crioecceções com aproximadamente 10 µm de espessura, sobre ou dentro de gotas de água na lâmina histológica; E) duas micrografias de microscopia de luz de crioecceções transversais de raízes (sem coloração) evidenciando células gigantes (setas vermelhas); F e G) lâmina de vidro e moldura metálica, respectivamente, com crioecceções sobre a membrana PEN. Barra E: 25µm.

Após a colocação das crioecceções na membrana PEN (mínimo de 300 e máximo de 600 secções), duas ou três novas secções foram obtidas e montadas em lâmina de vidro para análises em microscópio Axiophot para verificar se a qualidade estrutural e a presença das células-alvo ainda eram presentes. Quando células de interesse não foram identificadas, outra inclusão já era imediatamente colocada no suporte e crioecceccionada, repetindo-se o procedimento até que aproximadamente 600 crioecceções fossem acumuladas sobre a membrana PEN (Figura 6A).

Concluído o crioecceccionamento, a lâmina com as crioecceções foi tratada com acetona absoluta, seguida de duas lavagens com etanol 70% e duas com etanol 100%. Cada lavagem teve duração de cerca de 10 s, com adição gradual do solvente por micropipeta de ponta fina, em volume suficiente apenas para cobrir as crioecceções. O líquido foi removido imediatamente após cada

etapa, evitando o deslocamento ou a dobra das crioecceções, bem como o contato da ponteira com a membrana. A introdução dessas etapas de pós-fixação e remoção do O.C.T das crioecceções resultou em maior agilidade para a microdissecção a laser, que por sua vez permitiu a microdissecção de um maior número de células em menor tempo de aquecimento pelo laser.

Em seguida, a lâmina com as crioecceções foi transferida para dessecador a vácuo contendo sílica gel, à temperatura ambiente, permanecendo por no mínimo 1 h e até 24 h (Figuras 6B–C). Esta etapa de secagem foi essencial para realizar com facilidade, a microdissecção a laser.

Embora o suporte para lâminas do MDL comporte até três lâminas (Figuras 6D, E e 7C, D), optou-se por montar apenas duas lâminas, para minimizar o risco de contaminação, mas ainda favorecendo um maior número de microdissecções. A seleção da lâmina destinada à microdissecção a laser foi realizada no painel do microscópio LMD7, acoplado ao MDL (Figura 6E). Para acelerar a duração da microdissecção, ou seja, aquecimento da amostra pelo laser, pelo menos 4 ou 5 lâminas para MDL eram preparadas até a secagem, e caso necessário eram microdissectadas para alcançar o número desejado.

Figura 6. Montagem de lâminas PEN para o MDL.

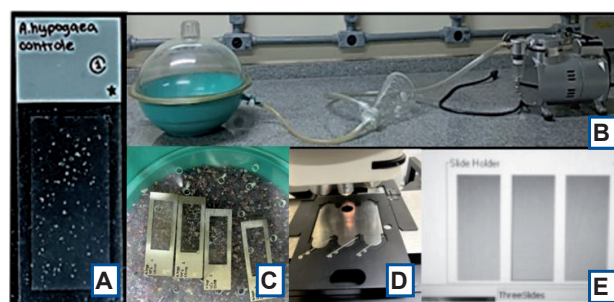


Figura 6. A) lâmina de vidro com aproximadamente 200 crioecceções sobre membrana PEN; B) dessecador com saída lateral para vácuo, acoplado a bomba e equipado com filtro de impurezas; C) dessecador de plástico contendo cristais azuis de sílica gel para absorção de umidade e placas de acrílico perfuradas posicionadas acima da sílica gel para suporte das lâminas com moldura metálica; D) suporte do microscópio com capacidade para três lâminas; E) painel do equipamento mostrando no computador, a opção de seleção da posição da lâmina destinada à microdissecção a laser.

Microscopia de Dissecção a Laser

O equipamento utilizado foi o Leica Microsystems LMD7000 (Figura 7A), equipado com laser de 349 nm, frequência de pulso entre

10 – 5000 Hz, duração < 4 ns e energia máxima de 120 μ J. O laser foi calibrado conforme as instruções do fabricante, via opção *Laser Control* no painel. Após a conexão do microscópio DM6000 do MDL ao computador e a ativação dos interruptores, os monitores exibiram simultaneamente a imagem da lâmina e os painéis para ajuste dos parâmetros de microdissecção a laser (Figura 7B).

Os limites da área útil da lâmina foram definidos com auxílio dos comandos *Options*, *Settings* e *Slide Holder*. Primeiramente, a borda superior esquerda da lâmina foi marcada com o comando *Set Rear Left Limit*; em seguida, a borda inferior direita foi delimitada com *Set Front Right Limit*. A função *Specimen Overview* gerou automaticamente o mapeamento da lâmina, facilitando a localização das criosecções de interesse.

No sistema Leica LMD7000, a coleta ocorre por gravidade, diferentemente do sistema de catapulta presente em outros equipamentos. Os tubos coletores foram posicionados abaixo do suporte de lâminas (Figura 7D). Como o laser incide pela parte superior do microscópio, as lâminas de vidro foram inseridas invertidas para garantir que o material microdissectado caísse diretamente na tampa do tubo coletor. Para membranas PEN emolduradas em metal, a orientação da inserção foi indiferente.

Figura 7. Microscópio de dissecação a laser.

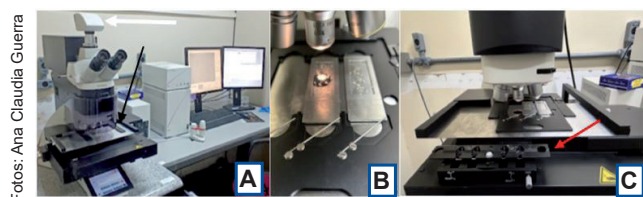


Figura 7. A) microscópio de dissecação a laser Leica Microsystems LMD7000, acoplado a um microscópio Leica DM6000 B automatizado (seta preta) e câmera Leica DFC310 FX (seta branca) e programa Leica LMD V8.2 para captura de imagens digitais; B) suporte com duas lâminas PEN mostrando a posição de inserção das lâminas no suporte, com a borda maior voltada para fora. No caso dessas lâminas com moldura metálica, tanto faz se a lâmina for colocada para cima ou invertida (o que não acontece com a lâmina de vidro, pois a membrana obrigatoriamente deve estar voltada para baixo); C) suporte para quatro tubos coletores de microdissecções (seta vermelha).

A lâmina foi inicialmente inspecionada em campo claro, com objetiva de 6,3 $\times$ ou 10 $\times$ para localizar as criosecções e delimitar as regiões de interesse, tanto no microscópio quanto no monitor do MDL. Dois microtubos coletores (até quatro microtubos) foram posicionados abertos na placa de suporte, com a tampa voltada para cima (Figura

8A). Em cada tampa foram adicionados 50 μ L de solução de extração, acrescida de 2 μ L de RNase Away (mencionar marca), 1 μ L de β -mercaptoetanol (β ME) e 1 μ L de DTT. A placa foi então inserida no microscópio e o tubo ativo foi selecionado no painel *Collector Device – Tube Caps* (Figura 8B).

O alinhamento da lâmina foi realizado de modo que a região de interesse ficasse posicionada diretamente sobre a tampa do tubo coletor e sob o feixe do laser (Figura 8C). O ajuste para essa posição dos tubos nos eixos X e Y foi realizado por meio dos parafusos de regulagem amarelos (não mostrado), sendo a correção confirmada alternando-se o foco entre a lâmina e a tampa do tubo (Figura 8D).

As microdissecções foram conduzidas de acordo com os parâmetros descritos na Tabela 1. A objetiva selecionada possibilitou identificar as células-alvo, contornar seus limites e isolar individualmente, cada célula alvo (Figura 8E), que foi isolada pelo laser e por gravidade, direcionada para a tampa do tubo coletor montado abaixo. Após a microdissecação, as criosecções apresentavam orifícios na região onde a célula alvo foi isolada (Figura 8E).

Tabela 1. Parâmetros utilizados para a microdissecção a laser utilizando a lente objetiva 10X.

PARÂMETROS (com objetiva 10X)	
Power (μ J)	38 - 42
Aperture	6
Speed (mm/s)	3
Specimen Balance	25
Line Spacing for Draw and Scan	12
Head Current	100%
Pulse Frequency (Hz)	120

O tratamento prévio das criosecções viabilizou o isolamento rápido e individualizado das células de interesse (Figura 8F), permitindo a coleta de 600 ou mais microdissecções em um único tubo coletor (Figura 8G), ao longo de 30-50 minutos.

A confirmação da coleta das microdissecções era constantemente realizada focalizando a tampa do tubo coletor e confirmando a presença de pedaços com formas definidas na superfície do líquido protetor de RNA (Figura 8H). Em alguns casos, observou-se dispersão parcial do material devido à energia estática; entretanto, a manutenção da umidade relativa do ambiente entre 40 e 50%, associada ao uso de sílica gel ao redor do microscópio, lâminas

e tubos, minimizou verdadeiramente as perdas, que foram consideradas desprezíveis.

Figura 8. MDL, laser, criosecções e microdissecções.

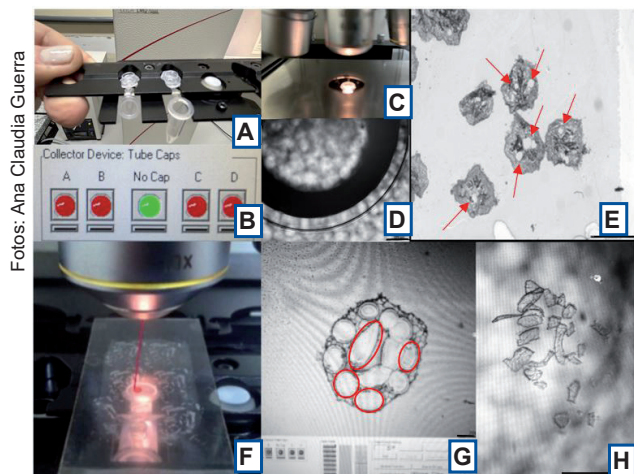


Figura 8. A) placa de suporte para microtubos coletores, com tubos montados e tampas abertas; B) monitor exibindo o painel para seleção da posição do tubo coletor a ser utilizado; C) alinhamento da tampa do microtubo aberta com o orifício da platina e a luz incidente da objetiva, coincidente com a trajetória do laser; D) foco alternado para a tampa do tubo; E) criosecções em membrana PEN visualizadas no monitor, apresentando orifícios correspondentes às regiões de CG isoladas (setas vermelhas) circundadas pelas demais células radiculares; F) laser ativo sobre a criosecção; G) visualização de uma criosecção no monitor após a microdissecção de várias células (p.ex.: cada região branca circundada por vermelho corresponde a uma célula microdissectada); H) visualização das microdissecções na tampa do tubo coletor. Barras: D e H: 320 µm; E: 2000 µm; G: 200 µm.

Isolamento e avaliação do RNA

Após a microdissecção a laser, o microtubo coletor contendo as células-alvo (mínimo de 500 para obter no máximo 2 ng de RNA total) foi removido do microscópio pelo comando *Unload* no painel, fechado imediatamente de ponta-cabeça, uma vez que as microdissecções estavam depositadas na tampa, e imerso em nitrogênio líquido (N_2).

A extração do RNA total foi realizada com o kit Arcturus™ PicoPure™ RNA Isolation (KIT0204, Thermo Fisher Scientific, EUA), conforme instruções do fabricante. Para isso, o tubo foi retirado do N_2 e incubado por 30 min a 42 °C, ainda invertido sobre a plataforma aquecida. Em seguida, adicionou-se cuidadosamente gotas de etanol 70% em volume equivalente sobre a tampa do tubo, conduzindo as amostras ao fundo. A mistura foi homogeneizada por inversão, sem uso de vórtex. Quando não foi possível prosseguir com as etapas subsequentes, as amostras foram armazenadas a -80 °C, também invertidas. Para retomada do processo, os tubos foram centrifugados a 800g por 2 min, para concentrar o material no fundo.

A purificação do RNA foi realizada em coluna acoplada a microtubo de 0,5 mL. Inicialmente, a coluna foi condicionada com 250 µL de Tampão de Condicionamento (EB), incubada por 5 min à temperatura ambiente e centrifugada a 16.000 × g por 1 min. Em seguida, foram feitas lavagens sequenciais: 100 µL de Tampão de Lavagem 1, seguido de duas lavagens com 100 µL de Tampão de Lavagem 2 (a primeira centrifugada a 8.000 × g por 1 min; a segunda, a 16.000 × g por 2 min). Após as lavagens, a coluna foi transferida para novo tubo de 0,5 mL, mantida por 1 min à temperatura ambiente e centrifugada a 100 × g por 2 min, seguida de 16.000 × g por 30 s. A eluição do RNA foi realizada com 11 µL de Tampão de Eluição (TE), incubado por 1 min, seguido de centrifugação a 1.000 × g por 1 min e 16.000 × g por mais 1 min. O volume final foi ajustado para 20 µL com água ultrapura e o RNA foi armazenado a -80 °C.

Para efeito de comparação, também foi utilizado outro kit de extração de RNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen, EUA). Nesse caso, as microdissecções foram coletadas em 50 µL de tampão de extração, acrescido de 5 µL de DNase Carrier e β-mercaptoetanol (βME). O material foi conduzido ao fundo do tubo pela adição gradual de 100 µL de Tampão de Lise em gotas, seguida da adição de 200 µL adicionais do mesmo tampão, totalizando 350 µL. O conteúdo foi transferido para tubo de 1,5 mL e homogeneizado em vórtex. Em seguida, adicionaram-se 350 µL de etanol 70%, totalizando 700 µL de amostra. Esse volume foi transferido para a coluna de purificação e centrifugado a 12.000 × g por 1 min à temperatura ambiente, procedimento repetido quatro vezes.

A coluna foi então submetida a uma lavagem com 600 µL de Tampão de Lavagem I e centrifugação a 12.000 × g por 30 s e duas lavagens com 500 µL de Tampão de Lavagem II e centrifugação a 2.000 × g por 15 s cada. Finalmente, a coluna foi transferida para novo microtubo e submetida à eluição com 12 µL de água ultrapura. Após 1 min de incubação, o tubo foi centrifugado a 12.000 × g por 1 min. Do volume total, 9 µL foram reservados para análise de qualidade e quantificação, e o restante armazenado a -80 °C.

A integridade do RNA isolado analisada com 7 µL do material em gel de agarose a 1,3%, corado com 2% de SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, EUA). As amostras foram submetidas à eletroforese por 30 min a 80 V em tampão TAE 1X. A integridade foi confirmada pela visualização de bandas de RNA ribossomais

(RNAr) próximas aos marcadores de kit de extração de RNA, RNAr 28S e 18S; aos RNAr 25S e 18S oriundo do isolamento do RNA de raízes recém coletadas, inteiras de amendoim ou soja (Figura 9A).

A concentração foi estimada visualmente tanto pela intensidade relativa das bandas no gel de agarose em comparação com marcadores de peso molecular, quanto por espectrofotometria de microvolume, utilizando o NanoDrop® 2000 ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) com 2 µL de cada amostra. Foram empregados diferentes marcadores no gel: peso molecular 1 KB DNA ladder (DPLUS-1K, Merck); marcador de peso molecular 1 KB DNA ladder, Ready-To-Use (Sinapse Biotecnologia); marcador de RNAr 28S e 18S (18S + 28S RNA Ribosomal From Calf Liver, Sigma R0889) e RNAr 25S e 18S do RNA isolado de uma raiz de amendoim utilizando o kit Pico Pure ou RNA isolado de uma raiz de soja (Fig.9A).

A necessidade de se estabelecer um protocolo veio das extrações iniciais de RNA de CG e CV de soja e amendoim conduzidas de acordo com metodologias recomendadas na literatura e em manuais técnicos que resultaram em concentrações extremamente baixas, que inviabilizaram sua detecção (eletroforese em gel de agarose ou espectrofotometria). Para se confirmar se havia RNA, as amostras foram amplificadas com o kit Arcturus® RiboAmp® PLUS Frozen RNA Amplification, o que gerou RNA em concentração suficiente para ser observado em gel de agarose. Entretanto, o perfil em gel de eletroforese desses RNA amplificados mostraram consistentemente, RNA fragmentado, com predomínio de moléculas de baixo peso molecular (dados não mostrados).

Assim, para o estabelecimento de um novo protocolo visando um RNA de células específico, sem fragmentação e em maior concentração, foram realizadas análises do perfil dos RNA isolados em gel de eletroforese a cada etapa do processamento das amostras, seccionamento e isolamento do RNA.

Foram analisados os RNA desde raízes recém-coletadas e lavadas; de raízes fixadas; raízes fixadas e desidratadas; raízes fixadas, desidratadas e infiltradas em Paraplast®; de secções obtidas em micrótomo rotatório a temperatura ambiente; de células-alvo microdissectadas a laser; de RNA recém-isolado no MDL e RNA armazenado a -20 °C ou -80 °C por até duas semanas após a microdissecção.

As análises mostraram que até a etapa de fixação, não havia degradação evidente do RNA, e portanto, dispensava ajustes (dados não mostrados). Já o RNA isolado de amostras fixadas, desidratadas, infiltradas e incluídas em Paraplast®, e daquelas seccionadas em temperatura ambiente mostraram um perfil degradado do RNA, além de baixíssima concentração. O RNA oriundo de microdissecções de células-alvo recém isolado ou daquele armazenado também era fracionado.

Novos procedimentos foram incorporados na preparação das amostras, seccionamento e microdissecção a laser, coleta das microdissecções e avaliação do RNA de baixa concentração. Os RNA isolados de CV de amendoim com o kit PicoPure™ mostraram um RNA mais inteiro e em maior concentração quando comparado com a extração com o kit Qiagen (Fig. 9B), possivelmente devido a uma maior sensibilidade do primeiro kit ao tipo celular em estudo e, a metodologia de preparação das amostras.

Já os RNA isolados de CV de amendoim de: 1) amostras infiltradas em O.C.T. foi comparado com aquele de amostras em Paraplast (Fig. 9C); 2) aqueles de criosecções foi comparado com aquele de secções obtidas a temperatura ambiente (dados não mostrados); 4) de criosecções submetidas à secagem a vácuo e aquelas secas no ambiente (dados não mostrados); 5) de criosecções de CG de amendoim e soja (Figs. 9D e E); 6) de diferentes quantidades de microdissecções de CV de amendoim (Fig. 9F); 7) de criosecções de CV de amendoim tratadas com acetona, etanol ou ambos, comparados com os de laminas não tratadas (dados não mostrados) e 8) de microdissecções de CV de amendoim coletadas em tubos com ou sem agentes protetores de RNA também foram avaliados em gel de eletroforese (dados não mostrados).

Também foram analisados RNA isolado de 200 microdissecções de CV de amendoim, correspondendo a ~4.843.661 µm² e de 498 microdissecções ~6.407.844 µm² de amostra similar que geraram um RNA ainda em baixíssima concentração, embora sinais fracos pudessem ser visualizados em imagens com exposição extra de luz (dados não mostrados). Já com 514 microdissecções de CV de amendoim (~8.027.234 µm²), o RNA pode ser detectado no gel de agarose, 1,3% e corado com SyBR™ Gold (Fig. 9 G).

O RNA obtido após o processamento de amostras a baixa temperaturas, utilizando a

criomicrotomia, com a fixação e remoção do meio de inclusão das criosecções, executando rapidamente a microdissecação a laser, protegendo o RNA das microdisseções no tubo coletor, e procedendo o isolamento imediato do RNA gerou RNA de alta qualidade, conforme análises em géis de eletroforese. Além disso, comparações entre perfis de RNA isolado de microdisseções de CV e CG de amendoim e soja revelaram diferenças entre as espécies. Perfis de soja exibiram uma maior concentração de RNA em relação ao de amendoim. Além disso, as CG de soja também apresentaram maior concentração do que as de amendoim, mesmo com um número de microdisseções bastante próximos. Considerando a padronização do material e do protocolo, tais diferenças provavelmente refletem características intrínsecas das espécies.

Considerando essa magnitude de análises de eletroforese em gel de agarose, o uso do SYBR™ Gold mostrou-se bastante estratégico, permitindo a avaliação rápida e parcimoniosa da integridade do RNA célula específico em baixa concentração, postergando o uso de equipamentos específicos e dispendiosos, como por exemplo, o Agilent 2100 Bioanalyzer, para quando houver amostras de qualidade.

Figura 9: Géis de agarose corados com Syber Gold mostrando perfis de RNA isolados de diferentes amostras.

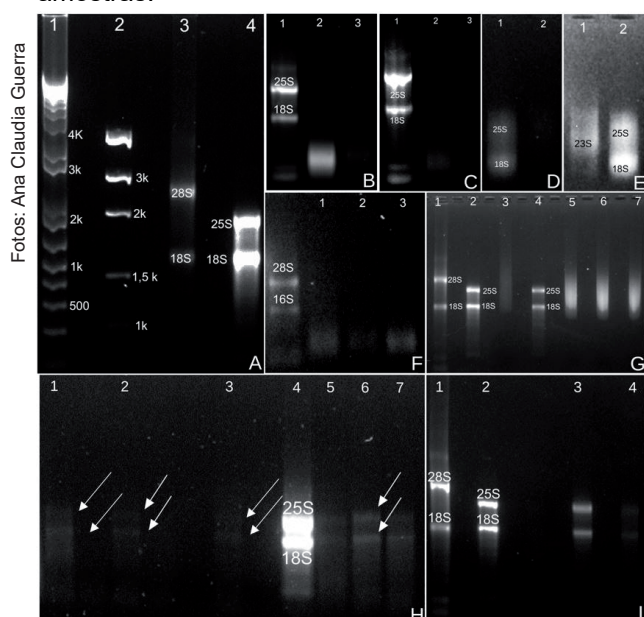


Figura 9. RNA isolados a partir de diferentes amostras. A) Coluna 1: marcador de peso molecular 1 KB DNA ladder (DPLUS-1K, Merck); coluna 2: marcador de peso molecular 1 KB DNA ladder, Ready-To-Use (Sinapse Biotecnologia); coluna 3: marcador de RNAr 28S e 18S (18S + 28S RNA Ribosomal From Calf Liver, Sigma R0889); D) coluna 4: RNAr 25S e 18S do RNA isolado de uma raiz recém coletada de amendoim utilizando o kit Pico Pure. B) Coluna 1: RNAr 25S e 18S; coluna

2: RNA isolado com o kit Pico Pure de microdisseções de CV de raiz de amendoim com uma banda de baixo peso molecular indicando a degradação do RNA; coluna 3: RNA isolado com o kit RNeasy Mini de microdisseções de raiz de amendoim isolado com o kit e que não se detecta RNA. C) Coluna 1: RNA de raiz de amendoim fixada e infiltrada em O.C.T. mostrando as bandas fracas, respectivas aos RNAr 25S e 18S; coluna 2: RNA de raiz de amendoim fixada e infiltrada em Paraplast degradado (seta branca). D) Coluna 1: RNA isolado (Pico Pure) de microdisseções de CG de soja mostrando bandas de RNAr 25S e 18S; coluna 2: RNA isolado (Pico Pure) de microdisseções de CG de amendoim não detectado. E) Coluna 1: RNA isolado (Pico Pure) de microdisseções de CG de amendoim, mostrando uma banda 23S e outras moléculas de maior e menor peso molecular; coluna 2: RNA isolado (Pico Pure) de microdisseções de CG de soja mostrando bandas RNAr 25S e 18S. F) Coluna 1: RNAr 28S e 18S; colunas 2 – 4: diferentes RNAs isolados a partir de mais de 300 microdisseções de CV de amendoim (PicoPure) mostrando degradação e perda da concentração do RNA. G) Coluna 1: RNAr 28S e 18S; coluna 2: RNAr 25S e 18S; coluna 3: RNA isolado (Pico Pure) de microdisseções de CV de amendoim não tão degradado, apresentando algumas moléculas de alto peso molecular; coluna 4: RNAr 25S e 18S do RNA isolado de uma raiz de soja utilizando o kit Pico Pure; colunas 5 – 7: diferentes RNA isolados (Pico Pure) de microdisseções de CV de soja degradados mas com moléculas de alto peso molecular, e em maior concentração do que o RNA isolado de microdisseções de CV de amendoim (coluna 3). H) Colunas 1, 3 e 5: RNA isolado (Pico Pure) de microdisseções de CG de amendoim mostrando bandas bastante fracas mas ainda detectáveis, de alto peso molecular (18S e 25S, setas brancas) indicando que apesar da grande perda de RNA durante o procedimento (setas brancas), ainda houve RNA isolado de CG; coluna 4: RNAr 25S e 18S de soja; colunas 5 - 7: RNA isolado (Pico Pure) de microdisseções de CG de soja, mostrando bandas 25S e 18S indicando a integridade do RNA e concentração facilmente detectável em gel de agarose 1,3% corado com SybBR™ Gold. I) Coluna 1: RNAr 18S e 28S; coluna 2: RNAr 18S e 25S; colunas 3 e 4: RNA de microdisseções de CV de soja e amendoim, respectivamente, armazenado em tubos GenTegra® para transporte de RNA à temperatura ambiente.

Considerações finais

Devido aos desafios técnicos para se obter um RNA de qualidade a partir de células específicas via MDL, diferentes grupos de pesquisa têm se dedicado ao estabelecimento de novos protocolos, mais rápidos e eficientes, para a realização de análises de transcritomas mais completas e precisas (Mei et al., 2024; Dominguez-Figueroa et al., 2024).

Visando trazer, um avanço evidente para nossa linha de pesquisa sobre os genes envolvidos na interação nematoide-plantas e sua regulação, estabelecemos esse novo protocolo de MDL visando a obtenção de RNA de alta qualidade para o

Este documento descreve detalhadamente um novo protocolo - desde a preparação do material biológico até a avaliação preliminar do RNA isolado de CG e CV do córtex radicular de soja e amendoim.

As principais questões aqui discutidas são:

- a alta labilidade do RNA das CV e das CG de sequenciamento e obtenção do transcriptoma de amendoim e soja após a infecção por *Meloidogyne* é evidente e que as principais causas de degradação e perda de RNA incluem a alta temperatura e umidade durante a obtenção das amostras. Portanto, foi essencial a condução das etapas de processamento a baixa temperatura e redução da umidade nas lâminas com criosecções por meio do uso do meio de inclusão O.C.T. e secagem das lâminas à vácuo.

- considerando o grande número de avaliações de RNA isolados, o uso de gel de agarose corado com SyBR™ Gold foi mais rápida e de menor custo e assim facilitou o avanço do estabelecimento do protocolo.

- com a pós-fixação e remoção do meio de inclusão das criosecções, a microdissecção a laser foi mais rápida, o que trouxe um menor dano causado pelo aquecimento do laser a amostra e permitiu um maior número de microdissecções em cada tubo coletor, melhorando assim a concentração e qualidade do RNA.

- a extração logo após a microdissecção é fortemente indicada apesar dos agentes protetores presentes no tubo de coleta. E ainda se recomenda o uso kit Pico Pure para extração de RNA célula-específico.

- ocorre uma variação na concentração estimada dos RNA, sendo que a de CV é sempre inferior à de CG, e entre os mesmos tipos celulares (CV de soja apresentou maior concentração de RNA do que CV de amendoim, bem como a CG de soja em relação a CG de amendoim).

- apesar da opção feita pelo sequenciamento NovaSeq 6000/ Low RNA input, que requer ≥ 10 nanogramas/microlitro de RNA, ainda se faz necessária uma grande quantidade de criosecções para obter a concentração mínima necessária para análises no Bioanalyser, triplicas para o sequenciamento e *backups* na empresa e no laboratório.

- estima-se como número mínimo oito lâminas com 500 criosecções ou mais para se obter RNA em quantidade necessária.

- com o acúmulo adequado de RNA de qualidade já em andamento, o sequenciamento será realizado e os primeiros transcriptomas células-específicos obtidos.

Esse novo protocolo poderá ser aplicado a qualquer amostra e posteriormente, novos ajustes deverão ser implementados de acordo com a célula em estudo.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio da FAP-DF e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

Referências

ABD-ELGAWAD, M. M.; ASKARY, T. H. Impact of phytonematodes on agriculture economy. In: ASKARY, T. H.; MARTINELLI, P. R. P. **Biocontrol agents of phytonematodes**. Wallingford, UK: CABI. 2015. p. 3-49. DOI: 10.1079/9781780643755.0003.

AFZAL, A.; MUKHTAR, T. Revolutionizing nematode management to achieve global food security goals: an overview. **Heliyon**, v. 10, e25325, 2024. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e25325.

ANJAM, M. S.; SIDDIQUE, S.; MARHAVY, P. RNA isolation from nematode-induced feeding sites in *Arabidopsis* roots using laser capture microdissection. In: DUQUE, P.; SZAKONYI, D. (Ed.). **Environmental responses in plants**. New York: Humana, 2022. p. 313-324. (Methods in Molecular Biology, 2494).

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. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2002.01431.x.

AYALA-DOÑAS, A.; CARA-GARCÍA, M. D.; TALAVERA-RUBIA, M.; VERDEJO-LUCAS, S. Management of soil-borne fungi and root-knot nematodes in cucurbits through breeding for resistance and grafting. **Agronomy**, v. 10, n. 1641, 2020. DOI: 10.3390/agronomy10111641.

BARCALA, M.; FENOLL, C.; ESCOBAR, C. Laser microdissection of cells and isolation of high-quality RNA after cryosectioning. In: JIN, H.; KALOSHIAN, I. (Ed). **RNA abundance analysis**. New York: Humana, 2020. p. 241-257. (Methods in Molecular Biology, 2170).

- BARMUKH, R.; GARG, V.; LIU, H.; CHITIKINENI, A.; XIN, L.; HENRY, R.; VARSHNEY, R. K. Spatial omics for accelerating plant research and crop improvement. **Trends in Biotechnology**, v. 43, n. 8, p. 1904-1920, 2025.
- BLEVE-ZACHEO, T.; MELILLO, M. T. The biology of giant cells. In: FENOLL, C.; GRUNDLER, F. M.; OHL, S. A. (Ed). **Cellular and molecular aspects of plant–nematode interactions**. Dordrecht: Springer, 1997. p. 65-79. (Developments in Plant Pathology, 10).
- BONNER, R. F.; EMMERT-BUCK, M.; COLE, K.; POHIDA, T.; CHUAQUI, R.; GOLDSTEIN, S.; LIOTTA, L. A. Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. **Science**, v. 278, n. 5342, p. 1481-1483, 1997.
- COLL, N. S.; MORENO-RISUENO, M.; STRADER, L. C.; GOODNIGHT, A. V.; SOZZANI, R. Advancing our understanding of root development: technologies and insights from diverse studies. **Plant Physiology**, v. 197, n. 2, kiae605, 2025. DOI: 10.1093/plphys/kiae605.
- DATTA, S.; MALHOTRA, L.; DICKERSON, R.; CHAFFEE, S.; SEN, C. K.; ROY, S. Laser capture microdissection: big data from small samples. **Histology and histopathology**, v. 30, n. 11, p. 1255, 2015.
- DOMÍNGUEZ-FIGUEROA, J.; GÓMEZ-ROJAS, A.; ESCOBAR, C. Functional studies of plant transcription factors and their relevance in the plant root-knot nematode interaction. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, 1370532, 2024. DOI: 10.3389/fpls.2024.1370532.
- ESCOBAR, C.; BARCALA, M.; CABRERA, J.; FENOLL, C. Overview of root-knot nematodes and giant cells. In: ESCOBAR, C.; FENOLL, C. (Ed). **Plant nematode interactions: a view on compatible interrelationships**. Cambridge: Academic, 2015. p. 1-32. (Advances in Botanical Research, 73).
- EMMERT-BUCK, M. R.; BONNER, R. F.; SMITH, P. D.; CHUAQUI, R. F.; ZHUANG, Z.; GOLDSTEIN, S. R.; WEISS, R. A.; LIOTTA, L. A. Laser capture microdissection. **Science**, v. 274, n. 5289, p. 998-1001, 1996.
- 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. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2008.00526.x.
- GODINEZ-VIDAL, D.; EDWARDS, S. M.; GROEN, S. C. Root-knot nematode egg extraction. **Protocols**, 2024. DOI: 10.17504/protocols.io.eq2lyj5nqlx9.
- HAN, Y.; WANG, Y.; DONG, X.; SUN, D.; LIU, Z.; YUE, J.; WANG, H.; LI, T.; WANG, C. TISCH2: expanded datasets and new tools for single-cell transcriptome analyses of the tumor microenvironment. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. database issue, p. D1425–D1431, 2023.
- ITHAL, N.; RECKNOR, J.; NETTLETON, D.; MAIER, T.; BAUM, T. J.; MITCHUM, M. G. Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 5, p. 510-525, 2007.
- JOVIC, D.; LIANG, X.; ZENG, H.; LIN, L.; XU, F.; LUO, Y. Single-cell RNA sequencing technologies and applications: a brief overview. **Clinical and Translational Medicine**, v. 12, e694, 2022. DOI: 10.1002/ctm2.694.
- 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 glycine*). **Planta**, v. 226, p. 1389-1409, 2007.
- LANCTOT, A. On the cutting edge of development: laser-assisted microdissection of the *Arabidopsis* gynoecium reveals tissue-specific gene expression patterns. **Plant Physiology**, v. 195, n. 1, p. 256-258, 2024.
- MEI, X.; ZHU, K.; YAN, D.; JIA, H.; LUO, W.; YE, J.; DENG, X. Developing a simple and rapid method for cell-specific transcriptome analysis through laser microdissection: insights from citrus rind with broader implications. **Plant Methods**, v. 20, 113, 2024.
- PELLETIER, J. M.; CHEN, M.; LIN, J. Y.; LE, B.; KIRKBRIDE, R. C.; HUR, J.; WANG, T.; CHANG, S.-H.; OLSON, A.; NIKOLOV, L.; GOLDBERG, B.; HARADA, J. J. Dissecting the cellular architecture and genetic circuitry of the soybean seed. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 122, n. 1, e2416987121, 2025. DOI: 10.1073/pnas.2416987121.
- PEREIRA, W. J.; CONDE, D.; PERRON, N.; SCHMIDT, H. W.; DERVINIS, C.; VENADO, R. E.; ANÉ, J.-M.; KIRST, M. Investigating biological nitrogen fixation via single-cell transcriptomics. **Journal of Experimental Botany**, v. 76, n. 4, p. 931-949, 2025.

- PEREZ, R. K.; GORDON, M. G.; SUBRAMANIAM, M.; KIM, M. C.; HARTOULAROS, G. C.; TARG, S.; SUN, Y.; OGORODNIKOV, A.; BUENO, R.; LU, A.; MATHOUBIAN, M.; MALISKOVA, L.; KWEK, S.; LI, T.; SLYPER, M.; WALDMAN, J.; DIONNE, D.; ROZENBLATT-ROSEN, O.; FONG, L.; DALL'ERA, M.; BALLIU, B.; REGEV, A.; YAZDANY, J.; CRISWELL, L. A.; ZAITLEN, N.; YE, C. J. Single-cell RNA-seq reveals cell type-specific molecular and genetic associations to lupus. **Science**, v. 376, n. 6589, eabf1970, 2022. DOI: 10.1126/science.abf1970.
- POVEDA, J.; ABRIL-URIAS, P.; ESCOBAR, C. Biological control of plant-parasitic nematodes by filamentous fungi inducers of resistance: Trichoderma, mycorrhizal and endophytic fungi. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 992, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00992.
- RAMSEY, 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.
- REN, L.; ZHANG, D.; CHEN, G. Q.; REED, B. M.; SHEN, X. H.; CHEN, H. Y. Transcriptomic profiling revealed the regulatory mechanism of *Arabidopsis* seedling's response to oxidative stress from cryopreservation. **Plant Cell Reports**, v. 34, p. 2161-2178, 2015.
- SATTERLEE, J. W.; STRABLE, J.; SCANLON, M. J. Plant stem-cell organization and differentiation at single-cell resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, p. 33689-33699, 2020. DOI: 10.1073/pnas.2018788117.
- SCHMIDT, A. Laser-assisted microdissection for cell- and tissue type-specific transcriptome and RNA-Seq analysis. In: RADOEVA, T.; DIJK, P. J. van (Ed.). **Apomixis**. New York: Springer, 2025. p. 87-104. (Methods in Molecular Biology, 2987). DOI: 10.1007/978-1-0716-5001-1_7.
- TADEO, F. R.; AGUSTÍ, J.; MERELO, P.; TALÓN, M. Laser microdissection: a high-precision approach to isolate specific cell types from any plant species for downstream molecular analyses. In: COUÉE, I. (Ed.). **Plant abiotic stress signaling**. New York: Humana, 2023. p.141-159. (Methods in Molecular Biology, 2642).
- 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.
- WU, H.; SCANLON, M. J. Single-cell and spatial transcriptomic analysis of maize embryo development. **Cold Spring Harbor Protocols**, 2025.
- ZHANG, X.; CHEN, B.; SONG, X.; WANG, Y.; ZHENG, C.; GONG, Z. Laser microdissection and fluorescence in situ hybridization reveal the tissue-specific gene expression in the ovules of *P. tabulaeformis* Carr. **Journal of Plant Physiology**, v. 309, 154500, 2025.
- ZHOU, Y.; SOMMER, M. L.; MEYER, A.; WANG, D.; KLAUS, A.; STÖCKER, T.; MARCON, C.; SCHOOF, H.; HABERER, G.; SCHON, C.-C.; HOCHHOLDINGER, F. Cold mediates maize root hair developmental plasticity via epidermis-specific transcriptomic responses. **Plant Physiology**, v. 196, n. 3, p. 2105-2120, 2024.
- ZHU, M.; HSU, C.-W.; OGOREK, L. L. P.; TAYLOR, I. W.; LA CAVERA, S.; OLIVEIRA, D. M.; VERMA, L.; MEHRA, P.; MIJAR, M.; SADANANDOM, A.; PEREZ-COTA, F.; BOERJAN, W.; NOLAN, T. M.; BENNETT, M. J.; BENFEY, P. N.; PANDEY, B. K. Single-cell transcriptomics reveal how root tissues adapt to soil stress. **Nature**, v. 642, p. 721-729, 2025.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica, PqEB Av. W5 Norte (final)
www.embrapa.br/recursos-geneticos-e-biotecnologia
www.embrapa.br/fale-conosco/sac
Comitê Local de Publicações

Presidente: João Henrique Moreira Viana

Secretário-executivo: Ana Flávia do Nascimento Dias

Membros: Andrielle Camara Amaral Lopes, Bruno Machado Teles Walter,
Carolina Vianna Morgante, Débora Pires Paula, Marcos Aparecido Gimenes,
Naiara Milagres Augusto da Silva, Solange Carvalho Barrios Roveri Jose e Sueli
Correa Marques de Mello

Circular Técnica 100

ISSN 2966-3083
Dezembro, 2025

Edição executiva: Ana Flávia do Nascimento Dias

Normalização bibliográfica: Rosamires Rocha
Galvão (CRB-1/2122)

Projeto gráfico: Leandro Sousa Fazio

Diagramação: Adilson Werneck

Publicação digital: PDF



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA E
PECUÁRIA

Todos os direitos reservados à Embrapa.