

2018-07-31

Validação de um sistema para análise funcional de genes em *Phakopsora pachyrhizi* via silenciamento gênico mediado por aplicação ectópica de dsRNA

Costa, Roberta de Paula Saturnino

Universidade Estadual do Norte do Paraná

COSTA, Roberta de Paula Saturnino. Validação de um sistema para análise funcional de genes em *Phakopsora pachyrhizi* via silenciamento gênico mediado por aplicação ectópica de dsRNA. Orientadora: Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho. 2018. 48 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Campus Luiz Meneghel, Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes, 2018.

<https://repositorio.uenp.edu.br/handle/123456789/485>

Baixado de Repositório Institucional UENP



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ
CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ROBERTA DE PAULA SATURNINO COSTA

**Validação de um sistema para análise funcional de genes em
Phakopsora pachyrhizi via silenciamento gênico mediado por
aplicação ectópica de dsRNA**

BANDEIRANTES, PR, BRASIL
2018

ROBERTA DE PAULA SATURNINO COSTA

**Validação de um sistema para análise funcional de genes em
Phakopsora pachyrhizi via silenciamento gênico mediado por
aplicação ectópica de dsRNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em
Agronomia, da Universidade Estadual do Norte do Paraná,
Campus Luiz Meneghel.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mayra Costa da Cruz Gallo de
Carvalho

Coorientadora: Dr^a. Francismar Corrêia Marcelino
Guimarães

BANDEIRANTES, PR, BRASIL
2018

Ficha catalográfica elaborada pelo autor, através do Programa de de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UENP

C837v Costa, Roberta de Paula Saturnino
Validação de um sistema para análise funcional de genes em *P. pachyrhizi* via silenciamento gênico mediado por aplicação ectópica de dsRNA / Roberta de Paula Saturnino Costa; orientador Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho; co-orientador Francismar Corrêia Marcelino-Guimarães - Bandeirantes, 2018.
48 p.

Agronomia) - Universidade Estadual do Norte do Paraná, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Agronomia, 2018.

1. RNAi. 2. Ferrugem Asiática. 3. Soja. 4. Aplicação exógena. 5. dsRNA. I. de Carvalho, Mayra Costa da Cruz Gallo , orient. II. Marcelino Guimarães , Francismar Corrêia, co-orient. III. Título.

ROBERTA DE PAULA SATURNINO COSTA

**Validação de um sistema para análise funcional de genes em
Phakopsora pachyrhizi via silenciamento gênico mediado por
aplicação ectópica de dsRNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado
em Agronomia, da Universidade Estadual do Norte
do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel.

Aprovada em: 31/07/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof ^a . Dr ^a . Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho	UENP
Dr. João Pereira Torres	UENP
Dr ^a Kenia de Carvalho	EMBRAPA
Prof. Dr. Fábio Rodrigues Ferreira Seiva (suplente)	UENP
Prof. Dr. Sandremir de Carvalho (suplente)	UENP

Prof^a. Dr^a. Mayra C. C. G. de Carvalho
Orientadora
Universidade Estadual do Norte do Paraná
Campus Luiz Meneghel

À minha mãe, por ser o meu alicerce e pelo exemplo de educação, fé inabalável, luta, honestidade e amor que estão presentes em tudo em sua vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Virgem Maria pela benção da vida e por iluminar e abençoar sempre o nosso caminho.

Aos meus pais Geralda e Roberto pelo exemplo de honestidade, educação e caráter e por lutarem comigo e me apoiarem na realização dos meus objetivos.

À minha madrinha Myriam por sua presença em minha vida e por também lutar comigo por todos os meus sonhos.

À Professora Dr^a Mayra por toda orientação, paciência, dedicação à minha formação e por me apresentar uma nova área. Obrigada Professora Dr^a Mayra por acreditar em mim.

À Dr^a Francismar pela coorientação, pela oportunidade, por todo conhecimento transmitido e pelo exemplo de amor com que realiza seu trabalho, além do carinho com que me recebeu.

À Dr^a Kenia pela dedicação e paciência com que me acompanhou em toda jornada do mestrado e todo conhecimento compartilhado, sua presença como orientadora foi essencial para a condução deste trabalho além de sua amizade que foi um grande presente de Deus em minha vida.

As amigadas que fiz no laboratório da Embrapa, Fer, Valéria, Luana, Pati, André, Rafa, Suellen, Luciane, Gi, Igor, Ton e Alice, grata por todos os momentos compartilhados. Estarei sempre na torcida por vocês. Meu muito obrigada também à Dona Vera pelas orações e conselhos.

À Suellen pelo auxílio nos experimentos com microscopia

À todos os professores da UENP – *Campus* Luiz Meneghel que foram fundamentais na minha formação acadêmica e pessoal, em especial a prof. Dr^a Jael que me apresentou à pesquisa.

Aos companheiros de mestrado: Flávia, Adalberto, Léo, Lucas, Tatiane, Pedro, Hilário, Alex e Flávio. Que Deus ilumine a jornada de todos.

Aos amigos essenciais presentes na jornada da minha vida e no meu coração, Regiane, Fer, Carol, Thiara, Fernanda, Rafa, Thais, Myrian, Flávia, Cami, Vini.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Enfim, a todos que de alguma forma que estiveram presentes na realização deste trabalho.

O Meu MUITÍSSIMO Obrigada!

*“ Conheça todas as teorias,
domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana,
seja apenas outra alma humana.”*

(Carl G.)

COSTA, Roberta de Paula Saturnino. **Validação de um sistema para análise funcional de genes em *Phakopsora pachyrhizi* via aplicação ectópica de dsRNA**. 2018. Dissertação de Mestrado em Agronomia - Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2018.

RESUMO

O mecanismo de silenciamento gênico (RNAi) mediado pela aplicação direta de dsRNA vem se tornando uma estratégia promissora tanto para a análise funcional de genes quanto para o controle de pragas e patógenos. Embora ainda não se conheça a maquinaria de silenciamento de *Phakopsora pachyrhizi*, a possibilidade de uso desse sistema para um fungo biotrófico com alto poder destrutivo sobre a soja, uma das principais commodities mundiais, se torna especialmente atrativa. Nós realizamos a pulverização direta de GFP-dsRNA em folhas destacadas de soja e observamos que o dsRNA é absorvido pelas folhas e permanece sendo detectado nas mesmas ao longo de todo o ciclo de infecção do fungo, sendo ainda transmitido para a primeira geração de esporos. Foi possível observar ainda que os GFP-dsRNA são principalmente observados no tubo germinativo dos esporos. Posteriormente utilizamos como alvo um candidato a gene essencial para o desenvolvimento de *P. pachyrhizi* (*de_novo_4692*) e observamos um efeito de silenciamento dose dependente de 86,6%, sendo o máximo efeito detectado na menor dose utilizada (50 ng/μL). O ensaio de fenotipagem para a severidade da doença nas folhas destacadas silenciadas mostrou significativa redução nos sintomas da doença. Tais resultados indicam que a aplicação direta de dsRNA sobre as folhas é eficaz em induzir o silenciamento de genes alvo no fungo sugerindo portanto que essa estratégia possui potencial para ser utilizada em estudos funcionais e ainda possa representar uma alternativa potencial e inovadora com relação ao uso de fungicidas.

Palavras-chave: RNAi; Ferrugem Asiática; Soja; Aplicação exógena, dsRNA.

COSTA, Roberta de Paula Saturnino. **Validation of a system for functional analysis of genes in *Phakopsora pachyrhizi* through ectopic application of dsRNA**. 2018. Dissertação de Mestrado em Agronomia - Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2018.

ABSTRAT

The mechanism of gene silencing (RNAi) mediated by the direct application of dsRNA has become an interesting strategy for both, the functional analysis of genes and for the control of pests and pathogens. Although the silencing machinery of *Phakopsora pachyrhizi* is not yet known, the possibility of using this system for a obligated biotrophic fungus with high destructive power over soybeans, one of the main world commodities, becomes especially attractive. We performed the direct spray of GFP-dsRNA on soybean detached leaves and observed that the dsRNA is absorbed by the leaves and remains being detected in the same ones throughout the cycle of infection of the fungus, being still transmitted to the first generation of spores. It was also possible to observe that the GFP-dsRNA is mainly observed in the sperm germinal tube. We then targeted a gene predicted to be essential for the development of *P. pachyrhizi* (*de_novo_4692*) and observed a dose-dependent silencing effect of up to 86,6%, being the highest effect detected at the lower dose used (50 ng/ μ L). The phenotype assay for disease severity in the silenced detached leaves showed a significant reduction in the symptoms of the disease. These results indicate that the direct application of dsRNA on leaves is effective in inducing the silencing of target genes in the fungus, suggesting that this strategy can be used for functional studies and still represent a potential alternative to the use of fungicides.

Key words: RNAi; Asian Rust; Soybean; Exogenous application; dsRNA.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Soja	3
2.2	Ferrugem Asiática da Soja.....	4
2.3	Alternativas sustentáveis ao uso de fungicidas.....	6
2.4	Silenciamento gênico pós-transcricional por interferência de RNA (RNAi)	8
2.5	Silenciamento gênico em plantas.....	11
2.6	Silenciamento em fungos.....	15
2.7	Aplicações na agricultura	18
3	ARTIGO: validação de um sistema para análise funcional de genes em <i>Phakopsora pachyrhizi</i> via aplicação ectópica de dsRNA	22
3.1	Introdução	22
3.2	Material e Métodos	24
3.3	Resultados.....	27
3.4	Discussão	31
3.5	Conclusões	34
4	REFERÊNCIAS	35
5	APÊNDICE	48

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merr.) originária da Ásia é a principal oleaginosa cultivada no mundo, sendo os Estados Unidos, Brasil e Argentina responsáveis por 70% da produção mundial deste grão. Os outros quatro países que também se destacam são China, Índia, Paraguai e Canadá (CONAB, 2017). Devido ao seu alto valor nutritivo e adaptabilidade a diversas latitudes, tipos de solos e condições climáticas, a soja é cultivada em todo o mundo, e hoje é uma das principais plantas cultivadas (MEDICE et al., 2007).

As doenças estão entre os fatores mais importantes que limitam o rendimento e a produtividade da cultura (MEDICE et al., 2007). Existem mais de 100 doenças que atingem a soja sendo a ferrugem asiática de maior importância devido ao seu alto poder destrutivo (ANDRADE & ARARIPE-ANDRADE, 2002) e inexistência de variedades que sejam amplamente resistentes ao patógeno. O manejo da doença a campo é realizado por meio da observância do período de vazio sanitário, uso de cultivares menos suscetíveis e aplicações sucessivas de fungicidas.

Além de contaminar os alimentos, o uso de fungicidas contamina o solo e os sistemas hídricos, degradando o ambiente e resultando em prejuízos significativos nos ecossistemas. Ainda, a utilização inadequada dos agrotóxicos pode acarretar em prejuízos à saúde dos aplicadores, que estão em contato direto com o produto, e dos consumidores, causando intoxicações, mutações gênicas, câncer e morte (GONSALVES, 2001).

Assim, vem aumentando a busca por alternativas que causem menos danos ao homem e ao ambiente. Diante deste contexto, pode-se destacar as estratégias de melhoramento genético da resistência de plantas pelo método convencional ou engenharia genética. Na engenharia genética, uma técnica promissora é o emprego do silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi). O RNAi é desencadeado pela presença de moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) no citoplasma que ativam a maquinaria de silenciamento gênico pós transcricional. Tal mecanismo é amplamente conservado em eucariotos (FIRE et al., 1998; CARTHEW & SONTHEIMER, 2009). Esses dsRNAs, não codantes, acionam o mecanismo de silenciamento pelo pareamento de uma pequena sequência de RNA ao RNA mensageiro alvo e posterior degradação dessa sequência por enzimas pertencentes a esta maquinaria (JOGA, et al; 2016).

Essa tecnologia pode ser utilizada na agricultura em plantas geneticamente modificadas, que expressam o siRNA, ou por métodos não transgênicos, como produtos formulados utilizando dsRNA como ingrediente ativo em inseticidas, fungicidas e acaricidas.

Esta nova geração de "pesticidas de RNA" baseada em RNAi poderia contornar a limitação técnica da transformação de plantas, já que o desenvolvimento de plantas transgênicas exige muitos anos de pesquisa e um alto investimento. Além da preocupação e aceitação dos consumidores por organismos geneticamente modificados (OGM) (ZOTTI et al., 2018).

A aplicação exógena de dsRNA no controle de insetos pragas tem mostrado resultados eficazes e é uma alternativa promissora por escapar do método de transgenia (SAN MIGUEL & SCOTT, 2015). Poucos exemplos apresentam aplicação exógena de dsRNA no controle de fungos, mas a eficiência da técnica no silenciamento de um gene essencial de *Fusarium graminearum* foi confirmada por KOCH et al. (2016). WANG et al., (2016) mostraram que a aplicação de dsRNA na superfície de vários frutos, vegetais e flores foi eficiente para controlar doenças causadas pelo fungo *Botrytis cinerae*.

Atualmente não há na literatura relato sobre a aplicação exógena de dsRNA para silenciamento gênico em *Phakopsora pachyrhizi*, agente etiológico da ferrugem asiática da soja. Também como não se conhece os genes envolvidos na maquinaria de silenciamento a nível transcricional ou pós transcricional. A informação disponível limita-se a algumas sequências identificadas no transcriptoma de haustório, mas cujas funções moleculares não foram comprovadas (LINK et al., 2014). Por outro lado, como também não há um sistema de transformação estável para fungos biotróficos o uso da abordagem de aplicação exógena de dsRNA para estudos funcionais apresenta-se como uma estratégia para compreender a função de genes envolvidos na sua patogenicidade.

Assim esse trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do uso da abordagem de aplicação direta de dsRNA no silenciamento de genes de *P. pachyrhizi*, usando como alvo um gene potencialmente essencial ao desenvolvimento e sobrevivência do fungo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Soja

A soja cultivada [*Glycine max* (L.) Merrill], originada na China, pertence à classe Dicotyledoneae, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, gênero *Glycine*. É uma espécie herbácea, autógama, anual, ereta, de crescimento morfológico diversificado, variando de 0,3 a 2,0 metros de altura, muito ou pouco ramificada, com ciclo de 75 a 200 dias, dependendo da cultivar e das condições ambientais (SEDIYAMA et al., 2009).

A soja foi introduzida no Brasil em 1882 no estado da Bahia e após 10 anos chegou à cidade de Campinas, no Estado de São Paulo. No entanto, foi no Rio Grande do Sul que esta leguminosa começou a ser cultivada em grande escala, devido à suinocultura, onde servia como um alimento rico em proteínas, e da triticultura, com a utilização em sucessão ao trigo, o que permitiu duas safras no mesmo ano agrícola (BLACK, 2000). Em 1970 a cultura se estendeu para os Estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Bahia, Maranhão e demais Estados ao Norte e Nordeste (ROESSING & GUEDES, 1993).

Dentre os fatores que determinaram a grande importância dessa espécie cultivada e comercializada em todo mundo se destacam: a composição química de seus grãos que apresentam um alto teor de proteína, em torno de 40%, utilizada para a alimentação humana e principalmente animal; o alto teor de óleo, aproximadamente 20%, que pode ser usado como biocombustível ou também na alimentação; a uniformidade e padronização, por se tratar de uma commodity e a grande utilização de tecnologias de produção (HIRAKURI & LAZZAROTO, 2014). Cerca de 90% do consumo é destinado ao esmagamento, sendo 80% de farelo, produto de maior consumo utilizado para agroindústria como matéria prima para ração, visando o agronegócio da carne e 20% para produção de óleo (USDA, 2014).

A soja é a principal oleaginosa cultivada e consumida no mundo (LEMES & GAVASSONI, 2015). Os Estados Unidos é o maior produtor mundial de soja e o Brasil ocupa o segundo lugar. A produção de soja, no Brasil, avançou de 96.958,3 milhões de toneladas na safra 2015/2016 (CONAB, 2016) para 114.095,8 milhões de toneladas na safra 2016/2017 (CONAB, 2017) e a estimativa para safra 2017/2018 é uma produção de 118.048,1 milhões de toneladas (CONAB, 2018).

No Brasil, a soja responde por 46% do total de grãos produzidos no país. Em nível mundial a soja é cultivada em aproximadamente 118 milhões de hectares, com uma produção estimada em 315 milhões de toneladas (USDA, 2015). Os Estados brasileiros com as maiores produções de soja são Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás, os quais contribuem para mais de 70% do total produzido no país (CONAB, 2016).

Os principais fatores que limitam a produção nas lavouras de soja são as doenças, que ocasionam perdas de rendimento estimadas em torno de 15 a 20%, podendo chegar a 100% em caso de ausência de controle (EMBRAPA, 2010).

2.2 Ferrugem Asiática da Soja

Algumas doenças vêm se destacando por ocasionar danos nas principais regiões produtoras de soja do Brasil nas últimas safras, dentre elas estão a Ferrugem Asiática, Podridão Vermelha da Raiz, Mofo Branco, Mancha Alvo e Nematóides. Atualmente, a Ferrugem Asiática da Soja (FAS) é considerada a doença foliar com maior potencial destrutivo na cultura, causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd pertencente ao filo Basidiomycota, classe Urediniomycetes, ordem Uredinales, família Phakopsoraceae (GOELLNER et al., 2010).

O prejuízo causado pela FAS foi parcialmente reduzido com o manejo integrado. No entanto, os danos causados pela ferrugem podem variar de 10 a 90% nas diversas regiões geográficas onde a doença é relatada (HARTMAN et al., 2015) e suas perdas anuais, no Brasil, podem atingir aproximadamente 2 bilhões de dólares por ano, considerando aplicações de fungicidas e as perdas de produtividade (GODOY et al, 2015).

A doença foi constatada pela primeira vez na América do Sul, no Paraguai em 2001 e no estado do Paraná em 2002 e após isso a FAS espalhou-se por todo o Brasil (YORINORI & LAZZAROTTO, 2004) sendo a doença mais devastadora de soja nas regiões tropicais e subtropicais. Seu principal dano é a desfolha precoce com perda de área fotossintética, impedindo a completa formação dos grãos, com consequente redução da produtividade. Os sintomas típicos da doença são lesões pequenas, de cor castanho dourada formadas principalmente na face inferior das folhas de soja. As lesões são associadas à clorose foliar e a alta densidade de lesão leva à desfolha prematura e maturidade precoce, resultando em perdas de rendimento significativas (HARTMAN et al., 2015).

O processo de infecção se inicia com a deposição do esporo assexual do fungo, denominado urediniósporo, sobre a superfície foliar. Em seguida, ocorre a germinação

do esporo e a emissão do tubo germinativo (1 a 2 horas), seguidas da formação do apressório (4 horas após a germinação) (BONDE et al., 1976). Posteriormente, há a formação de um cone apressorial (6 horas após a germinação) dentro do apressório com a formação da hifa de penetração. Após a penetração, as células da epiderme sofrem colapso e as hifas crescem através dessas células e preenchem o espaço intercelular, esse processo tem início cerca de 22 horas após a inoculação. Em torno de 24-48 horas são formados os haustórios, mais frequentemente em células do mesófilo, epiderme superior e células vasculares (BONDE et al., 1976). O haustório é a estrutura com papel fundamental na interação planta-patógeno, pois, ele penetra nos espaços intracelulares e permite a captação de nutrientes da planta e supressão das respostas de defesa.

A reprodução assexual é completada quando a massa de micélio dá origem à uredinia, 5 a 8 dias após a inoculação (dai). Essa estrutura globosa rompe do mesófilo para a epiderme abaxial da folha, dentro da qual os urediniosporos são diferenciados e, após a maturação, liberados para o ambiente, 8 a 10 dai, reiniciando o ciclo da doença (REIS et al., 2006). O processo de infecção causado por fungos de ferrugem, incluindo *P. pachyrhizi* pode ser observado no esquema ilustrado na Figura 2.1

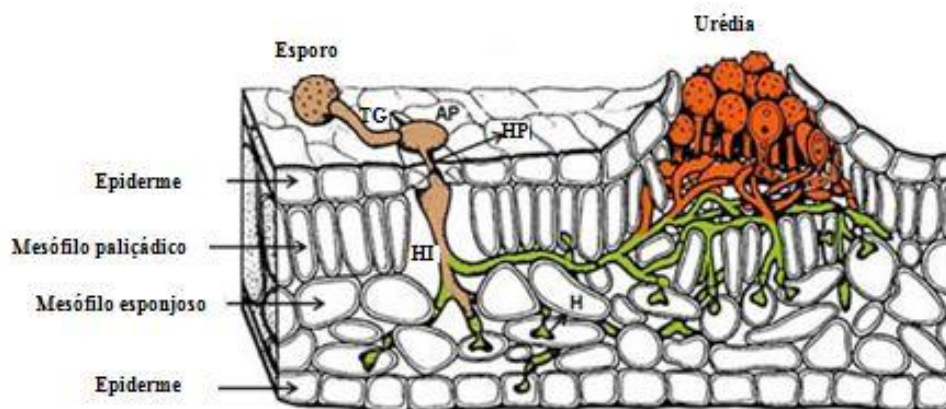


Figura 2.1. Esquema didático da estrutura interna de uma típica folha de dicotiledônea mostrando o processo de infecção causada por fungos de ferrugem. As estruturas de esporo, tubo germinativo (TG), apressório (AP), hifa de penetração (HP), hifa de infecção (HI); haustório (H) e a estrutura de esporulação (urédia) estão representadas na imagem. Esquema obtido a partir de Hahn (2000).

No Brasil as estratégias de manejo recomendadas para essa doença são: monitoramento da lavoura desde o início do ciclo da cultura; utilização de cultivares de ciclo precoce que por permanecerem menos tempo no campo reduz o tempo do fungo em causar redução de produtividade. Enquanto que os cultivares de ciclo tardio, por permanecerem expostos por mais tempo ao patógeno, apresentam maior intensidade da doença no início do

ciclo; semeaduras na época recomendada pela baixa presença de fonte de inóculo no ambiente devido ao vazio sanitário; utilização de fungicidas no aparecimento dos sintomas ou preventivamente; utilização de cultivares resistentes; eliminação de plantas de soja voluntárias; ausência de cultivo de soja na entressafra por meio do vazio sanitário (TECNOLOGIAS, 2013).

2.3 Alternativas sustentáveis ao uso de fungicidas

O controle químico é o principal método de controle da FAS. Até o ano 2016, mais de 100 fungicidas possuíam registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle dessa doença. No entanto, o modo de ação destes limita-se a poucos mecanismos de ação, sendo reportada resistência para todas as classes de fungicidas atualmente disponíveis. Devido à baixa eficiência de muitos destes fungicidas, 63 produtos utilizados no controle da FAS foram suspensos. A decisão foi publicada através do Ato 71 no Diário Oficial da União do dia 23 de dezembro de 2016 (MAPA, 2018).

Os fungicidas representam o principal método de controle da doença, no entanto, elevam os custos de produção, podem suprimir fungos benéficos presentes no ecossistema, são prejudiciais ao homem e ao ambiente e levam a seleção de raças resistentes do fungo. E em áreas tropicais de produção, onde o clima é favorável ao desenvolvimento do fungo, muitas aplicações de fungicidas são necessárias (GODOY, 2012). As alterações observadas no comportamento deste fungo junto à menor eficiência dos grupos químicos de fungicidas estimularam estudos e testes para outros métodos de controle nas últimas safras (GODOY, 2011; BARBOSA et al., 2013; REIS et al., 2015).

Alternativamente, o emprego da resistência genética presente na própria espécie para o desenvolvimento de cultivares resistentes é uma ferramenta útil e necessária. Fontes de resistência a FAS são conhecidas desde os anos 70, no entanto, não existe cultivares amplamente resistentes (LI et al. 2012). Há sete locos descritos em soja para resistência ao fungo *P. pachyrhizi*, denominados *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4* e *Rpp4-b*, *Rpp5*, *Rpp6* e *Rpp7* (BROMFIELD & HARTWIG, 1980; MCLEAN & BYTH, 1980; HARTWIG & BROMFIELD, 1983; HARTWIG, 1986; GARCIA et al., 2008; LI et al., 2012; KING et al., 2017). Devido à alta diversidade genética desse patógeno, a estabilidade dessa resistência é afetada, dificultando o desenvolvimento de cultivares que sejam efetivos por um longo período (HARTMAN et al., 2005).

A resistência a um único gene é bastante vulnerável para diversas populações do fungo, assim o desenvolvimento de formas mais duráveis de resistência pode ser obtido pela piramidação de gene raça-específicos em um único genótipo (SAGHAI et al., 2008). O uso de um único gene de resistência nas cultivares potencializa a recombinação ou mutação do fungo, em resposta a pressão de seleção determinada pelo genótipo, portanto a piramidação de genes torna a resistência mais difícil de ser superada (MATIELO et al., 1997).

O uso de plantas geneticamente modificadas auxilia na redução do uso de agrotóxicos, bem como nos custos de produção e aumento da produtividade da lavoura. No entanto, o custo para o desenvolvimento de plantas transformadas é alto, leva-se anos para desenvolver uma cultivar, além de não ter uma boa aceitação por grande parte da população (FERREIRA, 1998).

Uma alternativa para o desenvolvimento de plantas resistentes a FAS é o desenvolvimento de estratégias da engenharia genética, por exemplo, silenciando genes envolvidos na interação planta patógeno ou RNA de interferência (RNAi) (EL-SHESHENY et al., 2013; HAJERI et al., 2014; KILLINY et al., 2014).

O RNAi tem sido utilizado via transgenia para alcançar resistência a fungos biotróficos, tais como do *Erysiphe blumeria* em cevada e trigo (NOWARA et al., 2010), na qual utilizou-se HIGS para o gene efetor Avr10 causando uma redução acentuada na formação de haustório num hospedeiro susceptível. Em *Puccinia striiformis*, no trigo, utilizando um vetor para silenciar um gene altamente expresso em células do haustório, houve redução na quantidade de seus transcritos, porém sem redução nos sintomas da doença (YIN et al., 2011). Em *Puccinia triticina*, também no trigo, genes envolvidos nas vias de sinalização celular foram silenciados resultando em supressão da doença (PANWAR et al., 2013). *Fusarium oxysporum*, em banana, gene que codifica um regulador de transcrição putativo pertencente à família do zinco e um gene que auxilia no transporte de proteínas foram silenciados, o que acarretou em atraso nos sintomas da doença (GHAG et al., 2014). *Bremia lactucae* em alface, foi identificado crescimento muito reduzido e inibição de esporulação do fungo quando plantas foram transformadas para expressar siRNAs complementares ao gene celulose sintase que codifica uma proteína envolvida na biossíntese da parede celular (GOVINDARAJULU et al., 2015). E em *Uromyces appendiculatus*, em feijão, onde plantas infectadas por vírus, expressando fragmentos de genes para candidatos efetores apresentaram lesões menores e redução drástica da doença (COOPER & CAMPBELL, 2017).

A aplicação de RNA na agricultura pode incluir plantas transgênicas que expressam siRNAs homólogos a um gene alvo (*HIGS Host Induced Gene Silencing*) ou também produtos formulados usando dsRNA como ingrediente ativo para fungicidas, inseticidas e acaricidas. Produtos a base de RNAi podem fornecer uma estratégia única ou complementar para o controle de pragas e patógenos na agricultura.

Por proporcionar uma ação eficiente gene-espécie específico e pelo seu modo de ação dependente de sequência visando tipicamente um único gene, o RNAi será mais seguro do qualquer pesticida disponível no mercado. Com impacto reduzido se comparado com pesticidas de amplo espectro por preservar os inimigos naturais e a fauna benéfica na área de cultivo (JOGA et al., 2016).

A resistência de pragas e patógenos é uma preocupação quando novas tecnologias são introduzidas. No caso do RNAi estratégias para atrasar o desenvolvimento de resistência podem ser adotadas, como presença de áreas de refúgio, cujo objetivo é assegurar a presença e reprodução de pragas e patógenos suscetíveis, o que aumenta a probabilidade de acasalamento entre suscetível e resistente, garantindo que a geração seguinte seja suscetível e controlada pela tecnologia. Alterar as estratégias de controle e utilizar dsRNAs com mais de 200 nucleotídeos já que isto resulta em maior quantidade de diferentes siRNAs homólogos ao mRNA alvo o que aumentaria a resposta de RNAi e dificultaria a seleção de organismos resistentes como resultado da variação genética (ZOTTI et al., 2018).

2.4 Silenciamento gênico pós-transcricional por interferência de RNA (RNAi)

O silenciamento gênico por RNA consiste na introdução de moléculas de fitas duplas de RNA (dsRNA, do inglês *double stranded RNA*) similares a um gene endógeno alvo no interior das células ou organismos que se deseja silenciar. Além das moléculas dsRNA, formas aberrantes de RNA ou elevados níveis de expressão, como quando da superexpressão de genes, também são capazes de causar o RNAi. Essas moléculas ativam o mecanismo de RNAi promovendo a regulação da expressão de um ou mais genes por meio da supressão da transcrição (silenciamento gênico a nível transcricional [*Transcriptional Gene Silencing* - TGS]), via modificações epigenéticas na cromatina ou repressão da tradução (silenciamento gênico pós transcricional [*Post Transcriptional Gene Silencing* - PTGS]). O mecanismo PTGS leva a degradação de forma específica de um determinado mRNA, bloqueando a expressão do gene sem afetar a taxa de transcrição (BAULCOMBE, 2004).

O mecanismo de RNAi é natural e conservado nos eucariotos e acredita-se ter surgido inicialmente com a função de proteção do genoma contra invasões de vírus (ELBASHIR et al., 2001). A maioria dos vírus possui seu genoma na forma de fita dupla de RNA e a infecção ocorre pela introdução desta fita de RNA nos organismos. A maquinaria celular dos eucariotos para se defender provavelmente tenha desenvolvido um mecanismo contra o ataque viral o qual se baseia na degradação de dsRNA presente em suas células. Inicialmente acreditava-se que o mecanismo de RNAi atuava apenas na defesa contra ataque de vírus ou elementos de transposição. Atualmente sabe-se que tal mecanismo atua também diretamente na regulação da expressão de genes endógenos (VOINNET, 2002).

O Fenômeno RNAi foi observado pela primeira vez em 1990 quando dois pesquisadores, Napoli e Jorgensen, com o objetivo de intensificar a coloração em flores de petúnia produziram plantas transgênicas que super expressavam o gene responsável por codificar a proteína chalcona sintase envolvida na pigmentação púrpura das flores. O que se esperava eram flores com coloração mais intensa que a planta mãe, no entanto, a introdução desses genes extras resultou em linhagens transgênicas que apresentaram flores com diferentes padrões de coloração ou totalmente brancas. Os cientistas atribuíram tal resposta ao mecanismo de co-supressão, onde, a fita de RNA antisense do gene exógeno se liga a sua fita complementar do gene endógeno impedindo a sua tradução (NAPOLI et al., 1990).

Posteriormente em 1998, Fire e seus colaboradores ao estudar a expressão do gene *unc-22* no nematóide *Caenorhabditis elegans*, observaram efeitos fenotípicos após injeções de fitas simples e duplas de RNAs (RNA senso, RNA antisense e RNA fita dupla). *Unc-22* está presente em grande quantidade na musculatura do nematóide sendo responsável por sua mobilidade, no entanto, não é um gene essencial a sua sobrevivência. Os nematóides que receberam fitas simples apresentaram alguma mobilidade, ou seja, um efeito de silenciamento menos eficiente quando comparado a dupla fita. Além disso, as respostas nos nematóides puderam ser observadas em células que não receberam a injeção de dsRNA e o sinal parecia ser transmitido aos descendentes. Assim concluiu-se que o silenciamento do gene é resultado das fitas duplas de RNA e o sinal de silenciamento pode ser transmitido de uma célula para outra (FIRE et al., 1998).

A maquinaria de silenciamento é ativada pela presença de pequenas moléculas de RNA de dupla fita (*double stranded - dsRNA*), de origem endógena ou exógena, não codantes e geralmente originadas da clivagem de moléculas maiores de dsRNA, com sequências homólogas a genes endógenos de um organismo. Essas dsRNAs são reconhecidas pela enzima Dicer e clivados em fragmentos com 21 a 28 nucleotídeos. Essa enzima é uma

endonuclease que apresenta os domínios RNA helicase dependente de ATP, domínio PAZ, dois domínios RNase III em tandem e um domínio de ligação a molécula de dsRNA (BERNSTEIN et al., 2001).

Os RNAs gerados por Dicer se associam a um complexo de proteínas chamado complexo de silenciamento induzido por RNA, denominado RISC (do inglês, *RNA-induced silencing complex*). Todo complexo RISC é composto por uma proteína da família Argonata que possui como características marcantes um domínio de ligação ao RNA e um domínio de atividade nucleasa (CARMELL et al., 2002). Essa proteína tem função de desenrolar e separar a molécula de dsRNA, gerando duas moléculas de fita simples (*single-stranded RNAs - ssRNAs*) denominadas “guia” e “passageira”. A fita passageira é degradada enquanto a fita guia é incorporada a uma região complementar do mRNA alvo por complementaridade de bases (HUTVAGNER & ZAMORE, 2002). Normalmente, quando a complementaridade é total, ocorre degradação do mRNA e, quando parcial, ocorre repressão da tradução e posterior degradação do mRNA. O Esquema das vias que levam à interferência por microRNAs e siRNAs pode ser observado na figura 2.2.

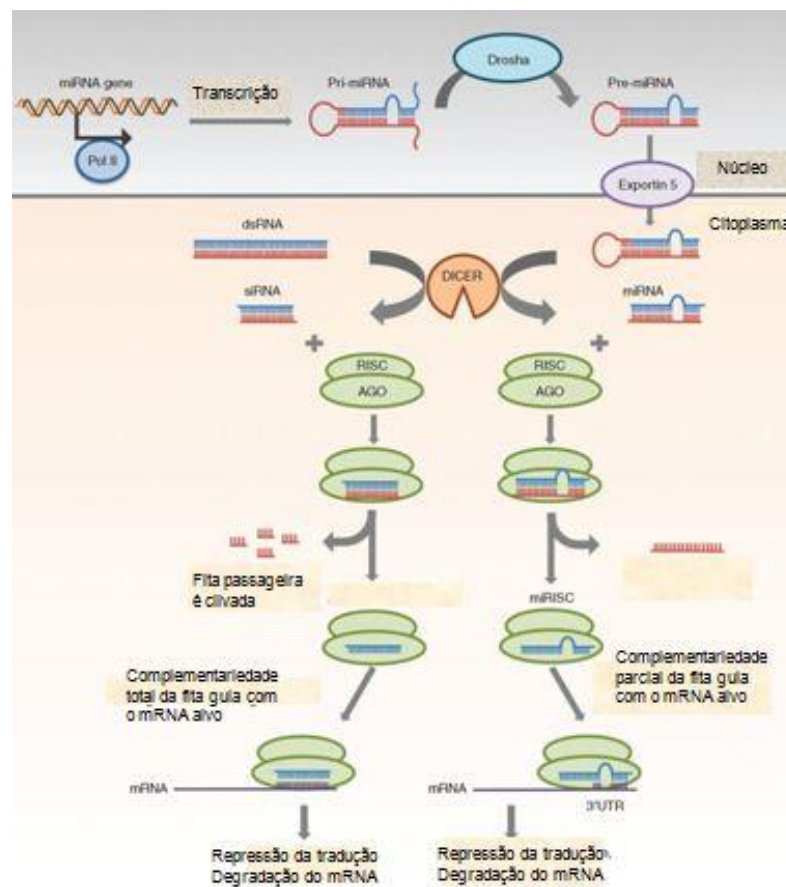


Figura 2.2 Esquema das vias que levam à interferência por microRNAs e siRNAs (LAM, J. K. W. et al., 2015)

Em alguns organismos como plantas, insetos e *C. elegans* ocorre um processo de amplificação do sinal de silenciamento pela ação da enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRP, do inglês “*RNA-dependent RNA polymerase*”). Essas enzimas polimerizam novas fitas de RNA complementares a sRNAs, a sRNAs guias e a fragmentos gerados das moléculas de mRNA que foram degradadas, gerando novas dsRNAs que serão novamente clivados pela Dicer. Novos siRNAs poderão ser gerados a partir dessa nova molécula de dsRNA, amplificando o sinal de silenciamento na célula (PARKER et al., 2006; LIU et al., 2003).

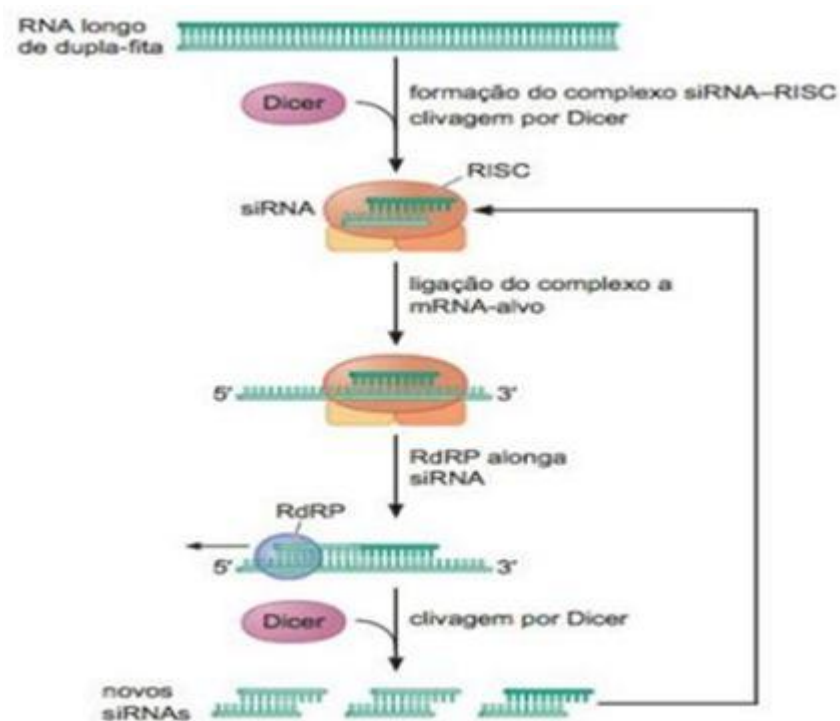


Figura 2.3 Via de geração de siRNA pela enzima RNA polimerase dependente de RNA (WATSON et al., 2015).

2.5 Silenciamento gênico em plantas

Diversas classes de pequenos RNAs já foram identificadas em plantas, no entanto de acordo com suas origens, estruturas, proteínas efetoras associadas e funções biológicas duas classes principais foram descritas: siRNA (do inglês short interfering RNA”) e miRNA (“micro RNA”). Ambas se associam a proteínas pertencentes a classe Argonauta e

também possuem como molécula precursora fitas duplas de RNA (CARTHEW & SONTHEIMER, 2009).

Inicialmente, foi caracterizada como molécula precursora de siRNA, as duplas fitas de RNAs lineares, longas, com complementariedade de bases perfeitas e que eram absorvidas do ambiente ou introduzidas diretamente no citoplasma das células (MELLO & CONTE JUNIOR, 2004). Posteriormente, elementos de transposição, centrômeros e sequências repetitivas também foram reconhecidas como fontes de siRNAs (LIPPMAN & MARTIENSSEN, 2004). Atualmente, outras fontes de siRNA endógenos foram identificadas como fontes naturais de moléculas senso e antisense (GOLDEN et al., 2008), podendo ter origem de transcritos de repetição invertida (*inverted repeat – IR*), sobreposição de transcrição convergente ou a partir da transformação de moléculas de sRNAs em novas moléculas de dsRNAs, pela ação das enzimas RdRP (PARENT et al., 2012), evidenciando que as fontes de siRNAs não apresentam apenas origem exógena (exo-siRNA).

Já os genes precursores dos miRNAs são transcritos, no núcleo, pela enzima RNA polII dando origem aos miRNAs primários chamados de pri-miRNA. Ainda no núcleo, o pri-miRNA é clivado por um complexo protéico do qual faz parte uma RNase III resultando no micro-RNA precursor (pré-miRNA), com aproximadamente 70 pares de bases, contendo um trecho de fita dupla e uma alça de fita simples, formando uma estrutura denominada hairpin. O pré-miRNA é exportado para o citoplasma através da proteína HASTY em plantas, ortóloga a proteína ‘Exportina 5’ em animais (BARTEL, 2004). No citoplasma a enzima Dicer cliva o pré-miRNA gerando um miRNA maduro com cerca de 22 nucleotídeos.

Os micro-RNA,s de um modo geral, nas plantas atuam na regulação de genes endógenos relacionados ao desenvolvimento tais como: divisão meristemática, separação de órgãos, forma da folha, alongamento da raiz secundária e tempo de floração (VOINNET, 2009). Também participam do controle de suas próprias vias, regulando a expressão dos genes *DCLI* e *AGO1*, essenciais para sua produção e atividade, o que revela a complexa relação existente entre essas moléculas e os mecanismos de regulação gênica existentes em plantas (PARENT et al., 2012). Já os siRNAs atuam como defensores da integridade do genoma em resposta a ácidos nucléicos estranhos ou invasivos, tais como vírus e elementos de transposição.

Foram identificados em plantas de *Arabidopsis thaliana* a produção 4 tipos de enzimas Dicer e 10 proteínas Argonauta. Como regra geral, organismos com múltiplas Dicers exibem especialização entre eles. Moléculas de miRNAs são produzidas pela ação das

enzimas DCL1 e DCL4, enquanto que os siRNAs são gerados pela ação das enzimas DCL2, DCL3 e/ou DCL4. Os miRNA com 21 nucleotídeos são gerados pelas enzimas DCL1 e DCL4 associadas a proteínas Argonautas AGO1, AGO2, AGO7 ou AGO10, enquanto os siRNAs com 21 nucleotídeos são produzidos por ação da enzima DCL4 associadas as proteínas Argonautas AGO1, AGO2, AGO7 ou AGO10. Os siRNA e microRNAs com 21 nucleotídeos atuam no processo de silenciamento por degradação ou inibição do mRNA através do silenciamento gênico pós transcricional (BAUMBERGER & BAULCOMBE, 2005; BRODERSEN et al., 2008). Já moléculas de siRNA de 24 nucleotídeos, classe mais abundante em plantas, originadas da clivagem pela enzima DCL3 associada a proteína AGO4, AGO6 ou AGO9 atuam no silenciamento gênico a nível transcricional (BROSNAN & VOINET, 2011). Elas são responsáveis pelo controle de elementos de transposição que podem alterar o genoma já que levam a inserções e deleções nos cromossomos. DCL1 nas plantas é necessária para a viabilidade da planta durante a reprodução e / ou nos estágios iniciais de desenvolvimento e DCL2 apresentam funções associadas à defesa antiviral (SCHAUER et al., 2002).

Estudos funcionais em plantas de *Arabidopsis* levaram a identificação de siRNAs de ação trans-endógena, os ta-siRNAs (*trans acting siRNAs*). Os siRNAs endógenos reprimem a expressão de genes que são os mesmos ou muito semelhantes aos loci de onde derivam. Já os ta-siRNAs atuam na repressão da expressão de genes que tem pouca semelhança com os genes dos quais os siRNAs derivam (VAZQUEZ et al., 2004).

Os siRNAs anti-senso naturais (natsiRNAs) são uma outra classe de pequenos RNAs encontrados nas plantas que regulam a expressão de genes endógenos. Essas moléculas tem aproximadamente 21-24 nt de comprimento e são originadas por complementariedade de bases entre transcritos de gene constitutivo e indutivo. Uma característica dessa classe é a regulação inversa dos genes envolvidos (a expressão de um aumenta, enquanto o outro diminui). Ao ocorrer um rápido aumento de um transcrito constitutivo, normalmente de baixa expressão, isso resulta em aumento do pareamento com o gene indutivo formando as dsRNAs que quando atingem um limiar passam a ser reconhecidos e clivados pela enzima Dicer. Após o processamento, ocorre degradação mRNA constitutivo, levando a diminuição de seus de transcritos (PYOTT & MOLNAR, 2015). Os natsiRNAs têm sido frequentemente associados a respostas de estresse biótico e abiótico (BORSANI et al., 2005; KATIYAR-AGARWAL et al., 2006; MOLDOVAN et al., 2010). A formação de natsiRNAs não é completamente compreendida e pode envolver diferentes proteínas Dicer (DCL1 ou DCL2) e RNA polimerases dependentes de RNA.

Já os piRNAs pertencem a uma classe de moléculas de RNAi cuja função está associada em assegurar a estabilidade de células germinativas ao atuar no silenciamento de transposons (GHILDIYAL & ZAMORE, 2009). Foram observados primeiramente em *Drosophila*, atuando no silenciamento de sequências repetitivas (ARAVIN et al., 2001). Esta classe foi inicialmente chamada de siRNAs associados a sequências repetitivas (ra-siRNA, do inglês “*repeat associated siRNA*”). Posteriormente, com a descoberta de uma classe destes sRNAs não associados com sequências repetitivas, foi renomeada para piRNA (GHILDIYAL & ZAMORE, 2009). Os piRNAs, diferentemente dos siRNAs e miRNAs, possuem um RNA fita simples como precursor e não requerem a ação da proteína Dicer para sua biossíntese. Podem atingir até 30 pares de base, e se associam com uma subfamília dentro das Argonautas chamada de *Piwi* (VAGIN et al., 2006).

Moléculas exógenas de dsRNA provenientes de transgenes ou infecções virais também podem ativar a maquinaria de silenciamento em plantas em um processo chamado de silenciamento gênico induzido por vírus (*Virus-Induced Gene Silencing – VIGS*). A inserção no genoma viral de um fragmento de um gene semelhante a um gene endógeno da planta pode ser utilizada com ferramenta para estudos funcional de um gene específico, onde a planta ao ser infectada pelo vírus produz siRNAs específicos para o gene alvo endógeno que ativa a maquinaria de silenciamento levando a degradação do gene correspondente na planta (VOINNET & BAULCOMBE, 1998). A resposta da planta as infecções virais é amplificada pela ação da enzima RdRP6 acompanhando assim as altas taxas de replicação dos vírus (BRODERSEN & VOINNET, 2006).

Um exemplo das principais vias de silenciamento em plantas pode ser observado na figura 2.4.

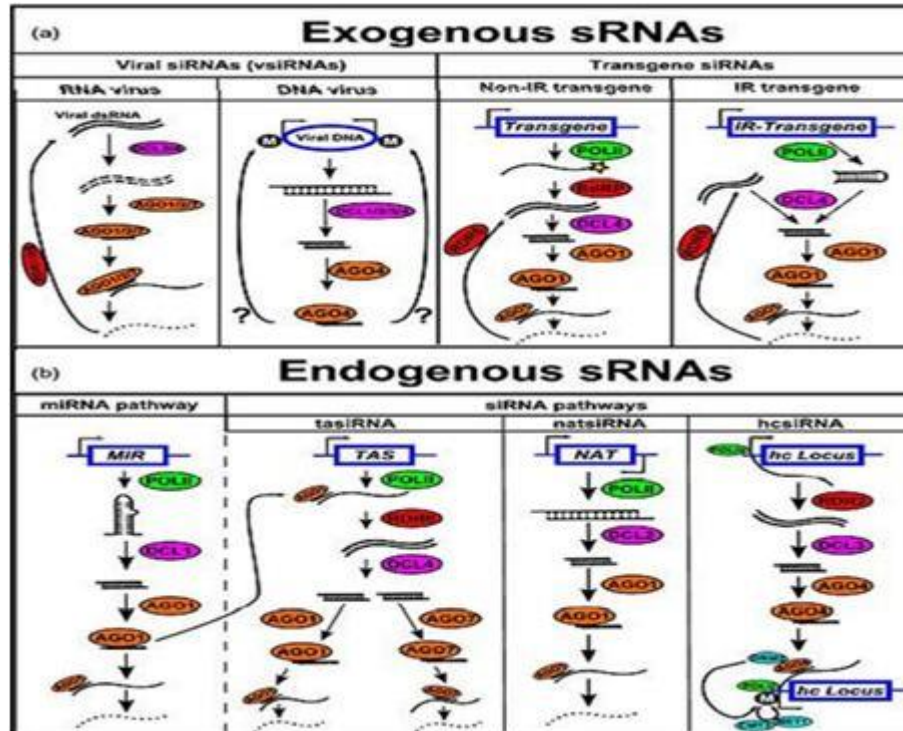


Figura 2.4 Resumo das principais vias de silenciamento em plantas com a ação das enzimas dicer (DCL), argonauta (AGO) e RNA dependente de RNA polimerase (RDR). (a) Vias de silenciamento iniciadas por DNA ou RNA exógeno. (b) Vias de silenciamento iniciadas a partir de loci endógenos. O DNA/RNA é representado por linhas azuis/pretas, respectivamente; A estrela amarela representa aberrância estrutural; O M em branco indica metilação de citosina. As linhas tracejadas indicam a geração de RNAs por clivagem de dsRNA; as linhas pontilhadas representam a degradação do mRNA (PYOTT & MOLNAR, 2015).

2.6 Silenciamento em fungos

A maquinaria de RNAi nos fungos apresenta os três componentes utilizados pelos eucariotos: Dicer, Argonauta e RNA polimerase dependente de RNA apresentando frequentemente mais de um gene para cada uma dessas enzimas e com diferentes funções (CHOI et al., 2014).

O RNAi em fungos foi inicialmente descrito e caracterizado no fungo *Neurospora crassa*. Com base nos estudos deste fungo, três principais mecanismos de silenciamento gênico foram descritos: quelling, mutação pontual induzida por repetição (*repeat-induced point mutation - RIP*) e silenciamento meiótico de DNA não pareado (*meiotic silencing by unpaired DNA - MSUD*) (CHANG et al., 2012).

O fenômeno quelling foi observado pela primeira vez no fungo *N. crassa* ao serem introduzidas neste fungo cópias extras do gene *al-1* que está envolvido na produção

de carotenóides, e em reposta foram obtidas estirpes albinas, ao invés de coloração alaranjada como se esperava (ROMANO & MACINO, 1992). Neste processo duas enzimas do tipo Dicer foram identificadas (DCL-1 e DCL-2) apresentando funções redundantes e sendo responsáveis por clivar dsRNA em moléculas com 25 nucleotídeos (CATALANOTTO et al., 2004). As outras duas enzimas reconhecidas nesse processo foram denominadas de QDE-1 e QDE-2 que codificam as enzimas RdRP e Argonauta, respectivamente.

O silenciamento por queeling é ativado pela introdução de sequências repetitivas de elementos de transposição na fase assexual de *N. crassa*. Essas sequências ao serem reconhecidas por QDE-1 sintetizam dsRNAs. Os dsRNAs gerados são então clivados pela enzima DCL produzindo siRNA de 25 nucleotídeos que serão transportados por QDE-2 para o sistema RISC. QDE-2 interage com uma proteína com função de exonuclease chamada QIP (MOAZED, 2009). Primeiro dsRNA ligado a QDE-2 são separados formando duas fitas simples, a guia e a passageira. Posteriormente QIP reconhece e degrada a fita passageira e todos os genes similares a estas sequências (DANG et al., 2011).

Danos no DNA também resultam em ativação da proteína (RdRP) QDE-1 formando uma nova classe de pequenos RNAs chamados qiRNAs (LEE et al., 2009). Os qiRNAs apresentam tamanho de 21 nucleotídeos requerem os mesmos componentes utilizados em quelling (QDE-1, QDE-2, DCL-1 e DCL-2), indicando que as duas vias são relacionadas (LEE et al., 2009; LEE et al., 2010). Quelling e QI são ativadas pela presença de sequências repetitivas de DNA, no entanto em quelling essas moléculas são de origem de elementos de transposição ou vírus, enquanto que para qiRNAs as moléculas são originadas de sequências de DNA repetitivo (BILLMYRE et al., 2013).

No fungo *Mucor circinelloides* a maquinaria RNAi também tem sido estudada quanto aos processos de crescimento, morfologia, reprodução e respostas a stress (FE et al., 2015). As vias do mecanismo são semelhantes ao quelling em *N. crassa*, no entanto em *M. circinelloides* duas enzimas RdRP-1 e RdRP-2, estão envolvidas neste mecanismo porém com diferentes funções. A RdRP-1 sintetiza dsRNA a partir das sequências repetitivas presentes no genoma, função semelhante a QDE-1 em *N. crassa*. Por outro lado, RdRP-2 participa apenas da amplificação do sinal de silenciamento. Assim, fungos transformados para não expressar RdRP2 mostraram baixa frequência de silenciamento (CALO et al., 2012). As duas enzimas Dicer encontradas em *M. circinelloides*, DCL-1 e DCL-2, apresentam funções distintas e somente DCL-2 é necessária para um mecanismo de RNAi funcional (HARO et al., 2009).

M. circinelloides quando transformados para não expressar o gene de DCL-1 mostraram um mecanismo de RNAi funcional, indicando que este gene não é essencial para induzir o silenciamento. No entanto, esses mutantes apresentaram um fenótipo com crescimento reduzido. Estas foram as primeiras evidências envolvendo o mecanismo de RNAi fúngico na regulação de genes endógenos em processos celulares (FE et al., 2007).

O outro tipo de silenciamento descrito em *N. crassa* é o silenciamento de DNAs não pareados, ou MSUD que ocorre na fase de prófase da meiose I e é ativado na presença de uma região do DNA não pareada entre os dois cromossomos homólogos (PRATT et al., 2004; SHIU et al., 2001; SHIU et al., 2002). O MSUD ocorre somente em ascomicetos, porque proteínas homólogas a alguns membros da via MSUD estão ausentes em fungos Basidiomycota e Mucoromycotina (HU et al., 2013; GARRE et al., 2014).

O mecanismo para detecção de regiões não pareadas é mal caracterizado embora duas enzimas essenciais para MSUD SAD-1 e SAD-2 podem estar envolvidas neste processo. SAD-1 (*suppressor of ascus dominance*) codifica uma RdRP e SAD-2 é responsável pela localização adequada de SAD-1, recrutando essa proteína da região perinuclear (SHIU et al., 2001; SHIU et al., 2006). A Dicer é comum entre as vias MSUD e RNAi tradicional e Argonauta é codificada pelo gene SMS-2 (*suppressor of meiotic silencing 2*).

O MSUD é ativado quando uma região não pareada é reconhecida e usada como molde para síntese de dsRNA pela enzima SAD-1. Então, as dsRNAs serão clivadas pela Dicer em pequenos RNAs (masiRNAs) (HAMMOND et al., 2013) que estão ligados a SMS-2, onde a fita passageira é degradada pela exonuclease QIP (LEE et al., 2003). Posteriormente, são degradadas todas as sequências homólogas ao DNA não pareado presente no genoma durante todo ciclo sexual. MSUD atua também na proteção do genoma contra qualquer fator que possa resultar em segmentos de DNA não pareados, como vírus e transposons (NICOLÁS & RUIZ-VÁZQUEZ, 2013). Os masiRNAs gerados são semelhantes aos siRNAs gerados no quelling, no entanto apresentam tamanho de 25nt (HAMMOND et al., 2013).

O silenciamento por DNA não pareado durante a meiose também foi observado em outras espécies de animais, como o nematóide *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* e camundongos, indicando ser um fenômeno altamente conservado (NOLAN et al., 2005; DUAN et al., 2013).

O silenciamento tipo RIP ocorre durante o ciclo sexual na fase de pré-meiose quando os dois núcleos das células parentais se encontram no mesmo citoplasma da

célula (SELKER, 1990). Ao ser detectada presença de sequências repetitivas no genoma haplóide ocorrem mutações pontuais, normalmente trocando as bases GC por AT (CAMBARERI et al., 1989) resultando em um silenciamento gênico ou inativação parcial do gene (SELKER, 1990). O mecanismo de RIP atua principalmente na defesa de fungos contra elementos de transposição, tornando-os inativos.

A presença da maquinaria de RNAi foi confirmada em diversas espécies de fungos e as descobertas dos diferentes processos destacam a grande diversidade desse mecanismo.

Em *P. pachyrhizi* foram descritos apenas três contigs semelhantes à sequências de proteínas Argonautas (LINK et al., 2014). Como o genoma de *P. pachyrhizi* ainda não foi sequenciado suas informações moleculares são provenientes de estudos que envolvem o sequenciamento do transcriptoma do patógeno associados a análises de bioinformática. Assim estudos relatam sequências de genes candidatos expressos em urediniósporos germinados, apressório e haustórios (POSADA-BUITRAGO & FREDERICK, 2005; TREMBLAY et al., 2009; TREMBLAY et al., 2012; TREMBLAY et al., 2013; STONE et al., 2012; LINK et al., 2014; CARVALHO et al., 2016).

Para identificar a presença de transcritos envolvidos na maquinaria de silenciamento em *P. pachyrhizi*, sequências de Dicer e Argonauta de *Puccinia striiformis* e RdRP de *Puccinia graminis* foram obtidas do NCBI (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia) e alinhadas com o transcriptoma de *P. pachyrhizi* (disponível em <http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/phakopsora/>) previamente obtido da lesão de *P. pachyrhizi* em folhas de soja, combinando captura por microdissecção a laser e RNA-Seq (CARVALHO et al., 2016), para procurar sequências semelhantes. Apenas um transcrito semelhante à sequência de Argonautas (de_novo_939) foi encontrado usando esta estratégia. Já uma pesquisa utilizando as anotações obtidas no banco de dados do NCBI permitiu identificar oito contigs com anotação de Argonauta, três contigs com anotação Dicer e quatro contigs com anotações RdRP. De forma geral, os resultados obtidos sugerem presença de contigs com domínios semelhantes às principais enzimas da maquinaria de silenciamento (RINCÃO, 2017).

2.7 Aplicações na agricultura

O mecanismo de RNAi é uma ferramenta eficaz, cada vez mais utilizada no estudo funcional de genes e no controle de pragas e patógenos na agricultura. Os primeiros

trabalhos voltados para o controle de pragas na agricultura utilizando a técnica de RNAi usaram microinjeções para introduzir dsRNA em insetos. Tal descoberta possibilitou a utilização dessa técnica em uma escala mais ampla quanto a entrega de dsRNA (KOCH & KOGEL, 2014). Dentre elas, a via de alimentação com dsRNA (BAUM et al., 2007), plantas transgênicas expressando dsRNA (WILL & VILCINSKAS, 2013) e pulverização de dsRNA sintético em plantas (HUNTER et al., 2012; SAN MIGUEL & SCOTT, 2015; LI et al., 2015).

O método biotecnológico no qual o silenciamento gênico é induzido pelo hospedeiro (HIGS), ou seja, uma planta transgênica que expressa o dsRNA, foi a primeira demonstração de que essa alternativa seria promissora na proteção de plantas, por combinar uma alta seletividade para o organismo alvo e baixo prejuízo ao ambiente se comparado com os produtos químicos, por ser uma molécula biológica, por exemplo (KOCH & KOGEL, 2014).

Nessa metodologia as plantas são transformadas para expressar um siRNA homólogo a um gene alvo do patógeno. O gene selecionado tem funções relacionadas à sobrevivência ou desenvolvimento do patógeno ou praga, que ao se alimentar da planta transgênica adquire os pequenos RNAs que ativam sua maquinaria de silenciamento, bloqueando a expressão de todos os transcritos com a sequência semelhante a do gene alvo (BAULCOMBE, 2015).

A estratégia HIGS foi demonstrada pela primeira vez nos trabalhos de BAUM et al. (2007) e MAO et al. (2007). BAUM et al. (2007) testaram a sensibilidade das larvas do coleóptero *Diabrotica virgifera*, uma praga da cultura do milho, a ingestão de dsRNAs homólogos a genes do inseto. O ensaio foi realizado com a alimentação das lagartas em uma dieta artificial por 12 dias com o objetivo de identificar genes essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência do inseto. Dos 295 genes testados, 125 resultaram em um retardo no desenvolvimento ou morte das larvas. Posteriormente, esses pesquisadores selecionaram o gene que codifica a subunidade A da ATPase vacuolar e transformaram plantas de milho expressando dsRNAs homólogos a este gene. As plantas de milho transformadas quando submetidas ao ataque da praga apresentaram níveis significativos de proteção quando comparadas com a planta controle. Em outro ensaio, os mesmos dsRNAs utilizados em *D. virgifera* foram testados em outras duas espécies de insetos, como resultado a mortalidade desses insetos foi reduzida significativamente, mostrando assim a alta especificidade do silenciamento.

Já MAO et al. (2007) ao invés de um gene essencial selecionaram uma proteína presente na lagarta *Helicoverpa armigera* que oferecia a este inseto resistência ao

gossipol, um terpenóide tóxico presente nas plantas de algodoeiro. A tolerância das larvas ao gossipol é devida à atividade do citocromo P450 monooxigenase, que possui a capacidade de detoxificar xantotoxinas, como o gossipol. Plantas de tabaco e *Arabidopsis* foram transformadas para expressar dsRNA homólogo ao gene P450 e em seguida as larvas foram alimentadas com essas plantas. Foi observada uma redução na expressão do gene para essa proteína e quando essas larvas foram alimentadas com uma dieta contendo gossipol ocorreu retardo no seu crescimento. Esses pesquisadores, posteriormente, produziram plantas transgênicas de algodão expressando o dsRNA do gene P450, e estas plantas apresentaram uma maior resistência ao ataque da lagarta *H. armigera*, provando novamente a eficiência da técnica (MAO et al., 2011).

Plantas de tabaco foram transformadas expressando siRNA para silenciar a expressão do gene codificador da subunidade ATPase A no controle de mosca branca. O nível deste transcrito nos insetos foi reduzido em até 62% após a alimentação. E apenas 10 a 15% da população inicial sobreviveram na linhagem transgênica, enquanto nas plantas controle o nível de infestação permaneceu alto. A infestação de moscas brancas nas plantas controle causou uma perda significativa do teor de açúcar, o que levou à queda das folhas, fato que não ocorreu nas plantas transgênicas (THAKUR et al., 2014).

Quando pulgões foram alimentados com cevada transgênica expressando uma dsRNA para o gene que codifica a enzima shn, gene que forma a bainha que envolve o estilete e auxilia na sucção da seiva, eles produziram níveis significativamente menores de mRNA em comparação com pulgões que se alimentaram de plantas selvagens. Análises microscópicas mostraram que a formação de bainhas foi amplamente reduzida. A expressão de shp não foi apenas inibida na geração parental, mas permaneceu significativamente reduzida nas seis gerações subsequentes que se alimentaram posteriormente apenas de plantas silvestres (ABDELLATEF et al., 2015).

Mais recentemente o milho transgênico SmartStax Pro®, que expressa dsRNA do gene *Snf7*, proteína vacuolar essencial que atua no transporte de nutrientes no interior das células, foi lançado no mercado norte-americano pela empresa Monsanto, em 2017. Esta cultivar apresenta resistência a larvas do besouro *D. virgifera* que ataca raiz de milho levando a perdas drásticas na produtividade. Esse foi o primeiro exemplo de uma planta resistente comercial que utiliza a técnica de RNAi para o controle de uma praga agrícola (ZHANG et al., 2017).

A maquinaria de silenciamento também constitui uma poderosa ferramenta para a regulação da expressão de genes, não apenas em insetos pragas, mas também em

fungos fitopatogênicos. Plantas de tabaco foram transformadas para expressar um gene repórter (GUS). Essas mesmas plantas foram novamente transformadas para produzir uma dsRNA correspondente ao gene GUS. Esse mesmo gene também foi previamente inserido no genoma do fungo *Fusarium verticillioides*, causador da podridão de orelha observada em grãos de milho. O fungo transformado foi inoculado em meio de cultura com folhas de tabaco transformadas, na qual houve a manifestação do gene GUS e também nas folhas novamente transformadas, nas quais não houve a expressão do gene, indicando uma possível transferência dos siRNAs similares ao mRNA GUS da planta para o fungo. Os resultados deste trabalho mostraram, pela primeira vez, que uma planta expressando dsRNA poderia gerar uma supressão no gene alvo correspondente em células fúngicas (TINOCO et al. 2010).

Uma outra abordagem, para o controle de fitopatógenos, seria a aplicação direta de dsRNA sintético em plantas similares aos genes destes parasitas, conhecida também como aplicação ectópica de dsRNA.

WANG et al. (2016) observaram que o fitopatógeno *Botrytis cinerae*, causador da doença mofo cinzento, introduz na planta hospedeira siRNAs que são capazes de suprimir genes de defesa natural da planta e assim obtém sucesso na infecção. Esses siRNAs do patógeno representam uma nova classe de efetores que atuam no reconhecimento do patógeno pela planta (WEIBERG & JIN, 2015; WEIBERG et al., 2014). No mesmo trabalho, flores, frutos e vegetais foram pulverizados com concentração de 20 ng/μL de siRNAs ou dsRNAs similares aos genes de DCL1 e DCL2 do fungo e posteriormente esses tecidos foram infectados com *B. cinerea*. Como resposta houve redução significativa nos sintomas da doença, demonstrando a eficácia da pulverização de moléculas dsRNAs similares genes envolvidos na patogenicidade do fungo para o controle deste parasita.

O RNAi foi também utilizado com sucesso no silenciamento do gene CYP3 de *Fusarium graminearum*. Foram produzidos dsRNA complementares a 3 sequências de mRNA do fungo os quais, com concentração de 20 ng/μL, foram aplicados de forma direta sobre folhas de cevada inoculadas com o parasita. Como resultado os autores observaram redução de até 50% da expressão do gene CYP3 e lesões muito menores no tratamento com dsCYP3 se comparadas com o tratamento controle (KOCH et al., 2016).

A aplicação exógena de dsRNA no controle de pragas e patógenos é uma opção para contornar a limitação da técnica de transformação genética existente para algumas culturas ou para escapar da transgenia e das questões de biossegurança a ela associadas.

3 ARTIGO: validação de um sistema para análise funcional de genes em *Phakopsora pachyrhizi* via aplicação ectópica de dsRNA

3.1 Introdução

Phakopsora pachyrhizi é um fungo biotrófico, agente causal da ferrugem asiática da soja (FAS), doença que no Brasil tem levado a perdas anuais de aproximadamente 2 bilhões de dólares, considerando aplicações de fungicidas e as perdas de produtividade (GODOY et al., 2015). Os fungicidas representam o principal método de controle da FAS, no entanto, elevam os custos de produção e levam a seleção de raças resistentes do fungo. No Brasil, atualmente 63 dos 100 fungicidas indicados para uso pelo MAPA (Ministério da Agricultura e Pecuária) já não são mais eficientes no controle da doença.

Desde a descoberta, em 1998, que o RNA de cadeia dupla desencadeia a supressão da atividade de genes homólogos, identificando esses pequenos RNAs como uma nova classe de moléculas reguladoras da expressão gênica através da interferência de RNA (RNAi) (FIRE et al., 1998) a compreensão da função celular no silenciamento gênico aumentou consideravelmente (CASTEL & MARTIENSSEN, 2013).

A maquinaria de RNAi é ativada pela presença de pequenas moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) com sequências complementares a um determinado mRNA no organismo alvo, tais sequências podem ser produzidas pelo hospedeiro e absorvidas pelo patógeno, em uma estratégia denominada HIGS (*Host Induced Gene Silencing*), ou podem ser diretamente aplicadas tanto no patógeno quanto no hospedeiro e ainda assim induzir o silenciamento no patógeno, em uma estratégia denominada aplicação direta ou ectópica de dsRNA (KOCH et al., 2016; WANG et al., 2016; MCLOUGHLIN et al., 2018). As moléculas de dsRNA são reconhecidas e clivadas em fragmentos menores ou siRNAs (*small interfering RNAs*) pela enzima Dicer (BERNSTEIN et al., 2001) e os pequenos RNAs gerados se associam ao complexo RISC (do inglês, *RNA-induced silencing complex*). Todo complexo RISC é composto por uma proteína da família Argonauta, que degrada uma das fitas do siRNA e induz o silenciamento do mRNA alvo por complementaridade de bases (HUTVAGNER & ZAMORE, 2002).

A maquinaria de silenciamento em insetos é conservada, assim os estudos no controle de insetos praga aumentam constantemente, já em fungos existem poucos trabalhos abordando esta estratégia, pois, apesar da técnica de RNAi já ter sido caracterizada em fungos a maquinaria de RNAi varia nas diferentes espécies (CHEN et al., 2015).

Em ferrugens a estratégia de RNAi (HIGS) foi usada com sucesso em *Puccinia triticina* (PAWVAR et al., 2018) e *Puccinia striiformis* (YIN et al., 2011; ZHANG et al., 2012), fungos patogênicos que causam ferrugem no trigo. Não há, entretanto estudos demonstrando o potencial de uso do mecanismo de RNAi no silenciamento de genes de *P. pachyrhizi*.

Como o genoma de *P. pachyrhizi* ainda não foi sequenciado, as informações disponíveis nos bancos de dados remontam a análises de genes expressos em urediniósporos germinados, apressórios, haustórios e lesões (POSADA-BUITRAGO & FREDERICK, 2005; TREMBLAY et al., 2013; STONE et al., 2012; LINK et al., 2014; CARVALHO et al., 2016). Entretanto, uma pesquisa recente utilizando as anotações obtidas no banco de dados do NCBI permitiu identificar transcritos para Argonata, Dicer e RdRP (*RNA dependent RNA polymerase*) sugerindo, portanto, conservação dos principais elementos do sistema em *P. pachyrhizi* (RINCÃO, 2017).

O controle de insetos praga usando inseticidas moleculares via estratégia de RNA de interferência estão em teste a nível de laboratório (SAN MIGUEL & SCOTT, 2015) e no ano de 2017, a primeira planta transgênica que utiliza o mecanismo de RNAi para silenciamento gênico no alvo foi aprovada para uso no campo, no mercado norte americano (ZHANG et al., 2017). Por outro lado, o uso do sistema de RNAi via aplicação direta foi recentemente reconhecido pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) como uma estratégia livre de transgenia representando assim uma alternativa para uso comercial relevante diante dos questionamentos sobre segurança associados aos organismos geneticamente modificados (OGMs). Além disso, a aplicação direta de dsRNA tem se mostrado uma alternativa para o estudo funcional de genes em organismos para os quais a transformação genética não é possível (MCLOUGHLIN et al., 2018), como é o caso do fungo *P. pachyrhizi*.

No presente trabalho nós utilizamos a aplicação direta de dsRNA em folhas destacadas de soja para avaliar o potencial de uso dessa estratégia no silenciamento de genes alvo em *P. pachyrhizi* e para avaliar o efeito do silenciamento do candidato a gene essencial de_novo_4692, no desenvolvimento da doença. Este gene apresenta domínio similar a proteínas G α cuja função está relacionada a sinalização de vias metabólicas, sendo essencial para que o patógeno reconheça o hospedeiro e para a integração de vários estímulos essenciais ao estabelecimento da biotrofia (BOLKER, 1998; DEISING et al., 2000; VIEIRA et al., 2011). As proteínas G controlam crescimento, fixação de conídio, formação do apressório, reprodução e patogenicidade em fungos patogênicos (MITCHELL & DEAN, 1995; XU &

HAMER, 1996) sendo esperado que o seu silenciamento em *P. pachyrhizi* possa interferir no desenvolvimento do fungo e conseqüentemente reduzir os sintomas da FAS.

A partir da aplicação tópica *in vitro* de GFP-dsRNA em folhas destacadas de soja nós observamos que o dsRNA é absorvido pelas folhas e permanece sendo detectado nas mesmas pelo menos até 192 hai (horas após inoculação) sendo ainda transmitido para a próxima geração de esporos. Quando a pulverização direta do 4692-dsRNA foi realizada sobre as folhas de soja inoculadas com *P. pachyrhizi* o silenciamento do gene alvo mostrou-se importante na redução dos sintomas da doença, corroborando com sua possível atuação no desenvolvimento do fungo. Embora outros trabalhos ainda devam ser realizados para testar a eficiência do processo, este é o primeiro a demonstrar que a aplicação exógena de dsRNA sobre folhas de soja possibilita a absorção dos mesmos pelos esporos de *P. pachyrhizi* podendo causar elevadas taxas de silenciamento gênico cujo sinal pode ser transmitido pelo menos para uma geração seguinte de esporos. A partir desses resultados espera-se que não só a caracterização funcional de genes em *P. pachyrhizi* seja facilitada como também o controle da doença a campo possa ser inovado com o uso de fungicidas de RNA.

3.2 Material e Métodos

Material biológico

As folhas de soja (cultivar CD 219 RR susceptível a FAS) foram destacadas no estágio V3, imediatamente colocadas em água destilada e posteriormente foram lavadas em água corrente e mantidas em repouso em uma bandeja com água por 1 hora até a utilização.

Ensaio de otimização da concentração de dsRNA e avaliação de sua permanência em folhas de soja

As moléculas de GFP-dsRNAs (*Green fluorescent protein-dsRNA*) foram desenhadas com um tamanho de 502 pb (pares de base) (Tabela Suplementar S1), sem similaridade com soja ou com as seqüências expressas de *P. pachyrhizi* e sintetizadas pela empresa agroRNA (Seul, Coréia do Sul). Tais moléculas foram usadas em um ensaio em folhas destacadas de soja mantidas em placas de petri objetivando avaliar se o dsRNA aplicado diretamente sobre as folhas é absorvido pelo tecido foliar, o tempo de permanência do dsRNA nas folhas e se o efeito de silenciamento é sensível a concentração utilizada. As folhas foram pulverizadas com atomizador manual com solução de GFP-dsRNA nas

concentrações de 50 e 100 ng/ μ L com quatro folhas por repetição e três repetições. No controle negativo, as folhas foram pulverizadas apenas com água. Posteriormente, as folhas foram armazenadas em placas de petri em meio água-ágar a 1% e mantidas em câmara climatizada com temperatura de 24°C e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas no escuro.

Com o objetivo de observar se o GFP-dsRNA é absorvido pelo tecido foliar, ao término do ensaio as folhas destacadas de soja foram submetidas a quatro lavagens com água destilada para remover qualquer GFP-dsRNA adsorvido à superfície, posteriormente secas com papel toalha, maceradas em nitrogênio líquido e então utilizadas para extração de RNA e PCR. O RNA total foi extraído usando o kit RNeasy Plant Mini (Qiagen) e as reações de PCR para detecção do GFP-dsRNA foram realizadas utilizando os primers GFP-F (5'-TCAGTGGAGAGGGTGAAGGT-3') e GFP-R (5' GGTCCTCTCCTGCACGTATC-3') e a ciclagem de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos, 72° por 30 segundos e uma etapa de 72° por 7 minutos. Em seguida as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Em cada etapa de lavagem das folhas foi ainda coletado 1 mL da água residual para avaliar a presença do GFP-dsRNA o que poderia indicar a adsorção do mesmo sobre a superfície das folhas.

O tempo de permanência do GFP-dsRNA foi avaliado nas folhas 48 horas após aplicação, quando, observa-se a formação massiva dos haustórios, e 192 horas ou oito dias após a aplicação ao final do primeiro ciclo de infecção.

Para testar se o GFP-dsRNA poderia ser transmitido para a primeira geração de esporos a partir da inoculação, folhas destacadas de soja foram pulverizadas com uma solução de esporos de *P. pachyrhizi* ($1,3 \times 10^5$ esporos/mL) contendo GFP-dsRNA nas duas concentrações (50 e 100 ng/ μ L) e aos 14 dias após a inoculação, quando o primeiro ciclo de esporulação se completou, os esporos das lesões foram coletados com um coletor manual para extração de RNA e PCR conforme descrito anteriormente. Um total de 3 repetições sendo cada uma formada por 5 folhas de cada planta de soja foi utilizado nesse ensaio utilizando como controle negativo, as folhas pulverizadas com a solução de esporos, no entanto, sem a presença do GFP-dsRNA.

Determinação da capacidade de absorção das moléculas de dsRNA diretamente pelos esporos de *P. pachyrhizi*

Para confirmar se o dsRNA pode ser absorvido pelos esporos do fungo e não permanecer apenas aderido à superfície da parede, moléculas de GFP-dsRNA marcadas covalentemente com o fluorocromo Cy3 (0,1 mg/mL), em uma concentração de 5000 ng/ μ L

foram incubados em uma solução de $1,3 \times 10^5$ de esporos frescos para um volume final de 40 μL e mantidas no escuro. Como controle negativo foi utilizado apenas solução de esporos sem a presença de GFP-dsRNA. Para retirar o excesso de corante foi realizada uma lavagem com KCl 0,6 M. Em seguida, em parte das amostras foi realizado um tratamento com a enzima Micrococcal nuclease (Mnase) a qual degrada ácidos nucleicos, conforme as instruções do fabricante. Após 4 horas de incubação o sinal de fluorescência das amostras tratadas e não tratadas com Mnase foi analisado usando microscópio ótico de fluorescência sob filtro específico.

Verificação da indução de silenciamento em *P.pachyrhizi* via aplicação direta de dsRNA

Com o objetivo de analisar a eficiência da aplicação direta de dsRNA sobre folhas de soja no silenciamento de genes em *P.pachyrhizi* utilizou-se como alvo o gene candidato de_novo_4692. O 4692-dsRNA foi sintetizado com um tamanho de 888 pb sem similaridade na soja (Tabela Suplementar S1) e seu efeito foi avaliado em folhas destacadas em placa de petri seguindo as condições de cultivo e inoculação anteriormente descritas. O experimento foi conduzido com 3 tratamentos (50 e 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de 4692-dsRNA e controle negativo constituído de GFP-dsRNA) e 3 repetições, sendo cada repetição constituída de 5 folhas de soja destacadas. Os níveis de expressão do gene alvo foram avaliados nas folhas de soja nos tempos de 6 e 12 hai, intervalo que corresponde a fase de germinação dos esporos e formação dos apressórios (BONDE et al., 1976).

A extração do RNA total de cada amostra foi realizada conforme descrito anteriormente e as amostras de RNA foram tratadas com a enzima Desoxirribonuclease I (Invitrogen - DNase I), conforme descrição do fabricante, com o objetivo de eliminar qualquer molécula de DNA presente na amostra. As amostras de cDNA foram sintetizadas utilizando o kit SuperScript III (Invitrogen) seguindo informações do fabricante. Posteriormente, as análises de expressão do gene candidato (de_novo_4692) foram realizadas por RT-qPCR em equipamento Real Time System (Applied Biosystems) utilizando o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Invitrogen) usando como controle endógeno o gene para tubulina (MACIEL et al., 2010). Os primers usados na amplificação do transcrito 4692-GFP foram GP α F (5'-GTACGAATCAGCGGCAAAG-3') e GP α R (5'-TTGAGAGTCAGTGGCACAGG -3'), e do normalizador tubulina foram TubF (5'-CCAAGGCTTCTTCGTGTTTCA-3') e TubR (5'-AGAGAAGAGCGCAAACC-3'). Os parâmetros de ciclagem para as reações de amplificação foram: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os níveis de expressão foram

determinados pela equação $2^{-\Delta Ct}$, em que 2 é a soma dos primers alvo e endógenos e a eficiência $\Delta Ct = (Ct \text{ alvo} - Ct \text{ endógeno})$.

Avaliação fenotípica do silenciamento do alvo 4692 (Gp α)

Objetivando avaliar os efeitos fenotípicos do silenciamento do transcrito de_novo_4692 quatro folhas de cada repetição do ensaio de verificação da indução do silenciamento (item anterior) foram conduzidas até o primeiro ciclo de esporulação do fungo (14 dias após a inoculação). Em seguida, foram avaliadas 10 lesões por folha quanto aos seguintes parâmetros: nível de esporulação (NE), número de urédias por lesão (NU), número de urédias abertas (NUA), frequência de lesão (FL) e severidade. Os parâmetros NE, NU, NUA e FL foram avaliados de acordo com Yamanaka et al. (2010). Para o parâmetro frequência de lesão (FL) foram contadas as lesões totais presentes em 1 cm² de cada lado da folha e a severidade (S) foi determinada pela porcentagem de lesões na área foliar total usando os softwares Photoshop Cs6 e ImageJ e a escala de severidade (GODOY et al.,2006). Os parâmetros foram analisados considerando o nível de significância ($P > 0,05\%$), pelo teste de Tukey-Kramer (KRAMER, 1956) pelo software SAS.

3.3 Resultados

Ensaio de otimização da concentração de dsRNA e avaliação de sua permanência em folhas de soja

A aplicação exógena de GFP-dsRNA nas concentrações de 50 e 100 ng/ μ L demonstrou que ambas as doses foram detectadas nos tecidos foliares às 48 e 192 horas após aplicação. O GFP-dsRNA pulverizado sobre as folhas destacadas de soja foi absorvido pelo tecido foliar já que não foi possível detectar sua presença nas águas residuais de lavagens ao passo que nas folhas o mesmo foi detectado pela PCR (Figura 3.1 A).

Em ambas as concentrações utilizadas, 50 e 100 ng/ μ L, o GFP-dsRNA foi detectado por PCR nas folhas nos dois momentos de coleta: 48 e 192 horas. O GFP-dsRNA também foi detectado por PCR a partir dos esporos coletados, na primeira geração, para ambas as doses testadas (Figura 3.1 B).

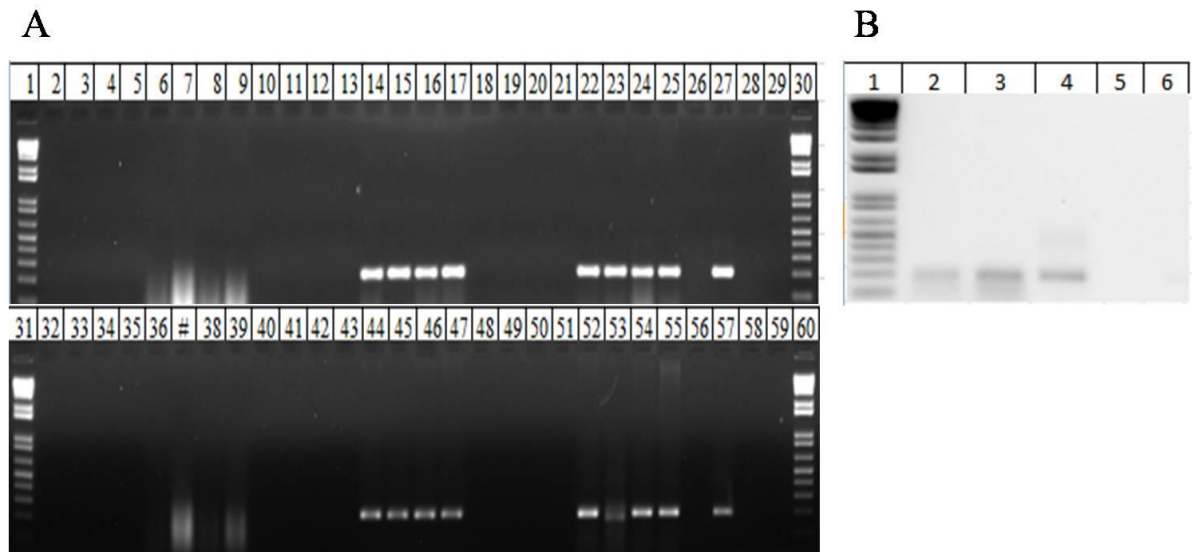


Figura 3.1 Diagnóstico por PCR da presença de GFP-dsRNA. A. PCR do GFP-dsRNA nos tecidos foliares e águas de lavagem das folhas de soja as 48 e 192 horas após inoculação (hai). 1, 30, 31 e 60: Ladder 1 Kb; 2,3,4,5 e 32,33,34,35: amostras de águas de lavagens do controle negativo 48 e 192 hai respectivamente; 6,7,8,9 e 36,37,38,39: amostras de RNA do tecido foliar do controle negativo 48 e 192 hai; 10,11,12,13 e 40,41,42,43: amostras de águas de lavagem do tratamento GFP-dsRNA na concentração de 50 ng/μL 48 e 192 hai respectivamente; 14,15,16,17 e 44,45,46,47: amostras de RNA do tecido foliar do tratamento GFP-dsRNA na concentração de 50 ng/μL 48 e 192 hai respectivamente; 18,19,20,21 e 48,49,50,51: amostras de águas de lavagem do tratamento GFP-dsRNA na concentração de 100 ng/μL 48 e 192 hai respectivamente; 22,23,24,25 e 52,53,54,55: amostras de RNA do tecido foliar do tratamento GFP-dsRNA na concentração de 100 ng/μL 48 e 192 hpi respectivamente; 27 e 57: controle positivo; 29 e 59: branco; **B.** PCR do GFP-dsRNA em esporos de *P. pachyrhizi* após o primeiro ciclo de esporulação do fungo (Amplicon de 206 pb). 1: Marcador de peso molecular 1Kb plus; 2: amostra de RNA de esporos tratados com GFP-dsRNA na concentração 50 ng/μL; 3: amostra de RNA de esporos tratados com GFP-dsRNA na concentração 100 ng/μL, 4: Controle negativo; 5: controle positivo; 6 branco.

Determinação da capacidade de absorção das moléculas de dsRNA diretamente pelos esporos de *P. pachyrhizi*

Após 4 horas de incubação dos esporos com Cy3/GFP-dsRNA os sinais de fluorescência foram detectados tanto na ausência de tratamento com a enzima Mnase, quanto após o tratamento com Mnase. No entanto, foi possível observar que a entrada do dsRNA nos esporos ocorre com a formação do tubo germinativo uma vez que os sinais de fluorescência concentraram-se nas regiões de tubo germinativo (Figura 3.2).

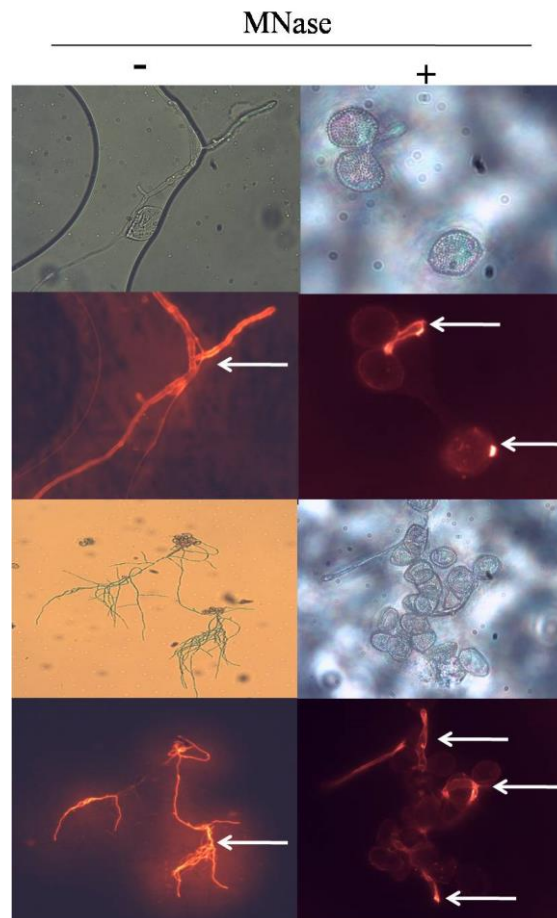


Figura 3.2 Microscopia de fluorescência de esporos e esporos germinando de *P. pachyrhizi* em solução de GFP-dsRNA (5000 ng/ μ L) marcados covalentemente com o fluorocromo Cy3 após 4 horas de incubação, sem e com tratamento pela enzima Mnase. Com filtro e sem filtro respectivamente. As flechas indicam o tubo germinativo.

Verificação da indução de silenciamento em *P.pachyrhizi* via aplicação direta de dsRNA

Os dados das análises de expressão do gene alvo do fungo, de_novo_4692 (Gpa), 6 e 12 hai da solução de esporos de *P. pachyrhizi* com o 4692-dsRNA revelaram que houve redução significativa no acúmulo dos transcritos alvo em relação ao grupo controle, exceto na concentração de 100 ng/ μ L de 4692-dsRNA às 6 hai. A maior redução na expressão, e conseqüentemente, maior nível de silenciamento foram observados no tratamento com concentração de 50 ng/ μ L de 4692-dsRNA, atingindo 86,6% de silenciamento às 6 hai, já 12 hai a taxa de silenciamento caiu para 59,2%. Para a concentração de 100 ng/ μ L de 4692-dsRNA não houve redução na expressão do gene alvo às 6 hai, no entanto, às 12 hai foi identificada uma taxa de silenciamento de 75,5% (Figura 3.3 B).

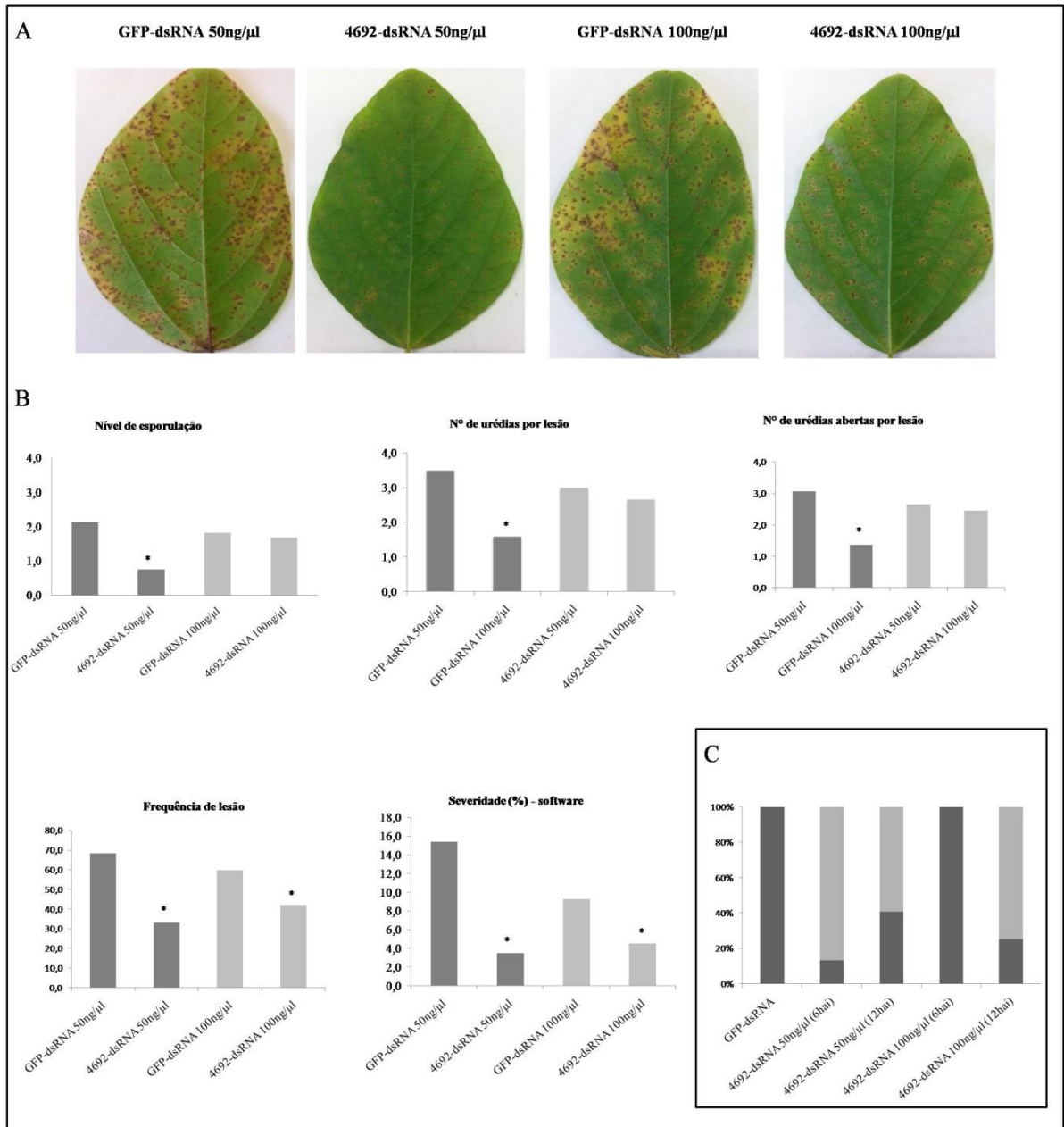


Figura 3.3 Avaliação fenotípica da aplicação direta do 4692-dsRNA em folhas destacadas de soja. **A.** Severidade da doença FAS em folhas de soja para os tratamentos: aplicação direta de 4692-dsRNA nas concentrações 50 e 100 ng/μL e controle (GFP-dsRNA nas mesmas concentrações). Fotos representativas de cada tratamento. **B.** Parâmetros fenotípicos avaliados 14 dias após a inoculação do fungo *P. pachyrhizi*: nível de esporulação; número de urédias por lesão; número de urédias abertas por lesão, frequência de lesão e severidade da doença. Médias seguidas de * diferem a $p < 0,05$ (teste Tukey-Kramer). **C.** Valores de porcentagem (%) de silenciamento resultantes da análise de expressão relativa do gene de *novo_4692* por RT-qPCR após 6 e 12 hai nas concentrações de 50 e 100 ng/μL.

Para avaliar o efeito do silenciamento do candidato de *novo_4692* ($G\alpha$) os sintomas da ferrugem na soja foram avaliados 14 dias após a inoculação. Os resultados

mostraram redução significativa para todos os parâmetros no tratamento em que a concentração de 50 ng/ μ L de 4692-dsRNA foi utilizada. Já para o tratamento com concentração de 100 ng/ μ L de 4692-dsRNA foram observadas reduções significativas apenas para a severidade da doença e frequência de lesão (Figura 3.3 A).

3.4 Discussão

A absorção de dsRNA pelas folhas de soja sugere que o sinal para o silenciamento gênico promovido em *P. pachyrhizi* possa ter sido adquirido a partir do desenvolvimento do fungo inoculado nas folhas em placa de petri. Não é possível saber a partir dos ensaios conduzidos se de fato a absorção do dsRNA pelo fungo se deu a partir da invasão do tecido foliar ou se os esporos em germinação poderiam ter absorvido o dsRNA diretamente a partir da superfície foliar ou ainda se ambos processos ocorrem simultaneamente. Em um ensaio semelhante em folhas destacadas de cevada, KOCH et al. (2016) pulverizaram dsRNA somente sobre uma região das folhas e nessas mesmas folhas mantiveram regiões não pulverizadas e foi possível detectar a presença dos dsRNA em ambas as regiões sugerindo, portanto, que o sinal de silenciamento tenha sido translocado pelo tecido foliar para as demais regiões.

Por outro lado, os esporos de *P. pachyrhizi* incubados em solução com o GFP-dsRNA mostraram um sinal forte de fluorescência limitado às regiões do tubo germinativo tanto no tratamento com Mnase quanto na ausência do tratamento o que sugere que a absorção do sinal de silenciamento em *P. pachyrhizi* possa ocorrer durante o processo natural de germinação dos esporos sobre as folhas de soja embora estudos mais detalhadas devam ser conduzidos para verificar se realmente não há absorção previamente a germinação. Em *Fusarium graminearum* o dsRNA marcado com fluorescência foi detectável dentro de conídios fúngicos, tubos germinativos e micélio (KOCH et al., 2016).

Uma vez aplicado sobre as folhas de soja, o GFP-dsRNA poderia ter sido rapidamente degradado e possivelmente a ausência de similaridade com os mRNA da soja teria impossibilitado a amplificação e permanência do sinal de silenciamento no tecido foliar. No entanto, o GFP-dsRNA foi observado nas folhas de soja até 192 hai, ou seja, o dsRNA pode permanecer no tecido foliar sem sofrer danos por tempo suficiente para que ao menos um ciclo do desenvolvimento de *P. pachyrhizi* ocorra. Em um trabalho onde avaliou-se a eficiência da aplicação foliar de dsRNA para o gene actina no controle de *Leptinotarsa decemlineata* em plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.), foi observado que o dsRNA foi

eficaz no controle das larvas até 28 dias após o tratamento das folhas, ou seja, o dsRNA aplicado permaneceu ativo até 28 dias (SAN MIGUEL et al., 2015). Corroborando com nosso resultado, de que a molécula de dsRNA pode ser absorvida pelo tecido foliar quando aplicada de forma exógena, dsRNA responsável pela biossíntese de ergosterol em *Fusarium graminearum*, quando pulverizado em folhas de cevada foi demonstrado que a molécula de dsRNA chegou no apoplasto, incluindo xilema, e posteriormente foi translocada para o simplasto, por algum mecanismo ainda desconhecido. Neste caso, o controle ocorreu quando a aplicação de dsRNA foi realizada no local da infecção, mas também de modo sistêmico, quando a aplicação ocorreu em outras partes da planta (KOCH et al., 2016).

Essa informação é importante porque sugere ser possível que o dsRNA pulverizado sobre as folhas possa ser absorvido pelos esporos que caem sobre as mesmas, diretamente, e que ainda possa ser absorvido durante as diferentes etapas do seu desenvolvimento como por exemplo durante o desenvolvimento dos haustórios que ocorre cerca de 48 h e da formação das urédias de esporulação de 7-10 dias após inoculação.

Um resultado muito importante sem dúvida foi a detecção por PCR do GFP-dsRNA não homólogo nos esporos de *P. pachyrhizi* produzidos a partir da inoculação, ou seja, na primeira geração de esporos após a inoculação. Esse resultado é especialmente importante para uma doença policíclica como é o caso da ferrugem asiática da soja e aumenta o potencial de uso da tecnologia de aplicação direta de dsRNA no controle da doença. A transferência do sinal de silenciamento para gerações seguintes à da aplicação foi pela primeira vez observada em *C. elegans* no qual o sinal de silenciamento foi transmitido, através de células germinativas por várias gerações (GRISHOK et al., 2000). Em insetos, a sinalização do RNAi foi demonstrada em algumas espécies, como *Hyalophora cecropia* e *Bombyx mori*, na qual a injeção de dsRNA em pupas resultaram em efeitos fenotípicos no desenvolvimento embrionário da geração seguinte (WANG et al., 2011). No entanto, nesses casos, a amplificação do sinal de silenciamento proporcionada pelo reconhecimento do mRNA alvo e ação das enzimas RdRP deva ter proporcionado a transferência do sinal ao longo de várias gerações o que certamente não ocorreu com o GFP-dsRNA nas folhas de soja.

Embora não se conheça a maquinaria de silenciamento gênico via RNAi em *P. pachyrhizi* não há dúvida de que a aplicação ectópica de dsRNA sobre as folhas de soja inoculadas com o fungo é capaz de induzir o silenciamento do gene alvo no patógeno. Nos ensaios com GFP-dsRNA foi demonstrado que em 4 horas de inoculação com o dsRNA já era possível observar a absorção do ds pelo tubo germinativo do fungo o que indica que nesse curto espaço de tempo já seria possível a ativação da maquinaria de silenciamento gênico no

alvo. Corroborando com esse resultado, as maiores taxas de silenciamento do transcrito 4692 (Gp α) ocorreram nos momentos iniciais de infecção, as 6 hai. Esse resultado somado a detecção do sinal de fluorescência nos tubos germinativos em solução sugerem que a absorção do 4692-dsRNA tenha ocorrido já no desenvolvimento dos tubos germinativos.

Ainda, foi muito interessante observar a diferença no tempo de indução de silenciamento entre as duas doses de 4692-dsRNA utilizadas. Enquanto na concentração de 50 ng/ μ L a maior indução ocorreu em 6 hai, para a concentração de 100 ng/ μ L a indução ocorreu somente em 12 hai.

A ORF do transcrito de_novo_4692 tem 95% de identidade com a proteína Gp α de *Puccinia graminis* e 87% de identidade com Gp α 1 de *Melampsora larici-populina*. Em *P. graminis* o gene Gp α apresenta pico de expressão no momento inicial de infecção (DUPLESSIS et al., 2011). Um gene de *Hemileia vastatrix* com domínio Gp α embora tenha apresentado baixa similaridade com sequências de outras ferrugens também mostrou pico de expressão durante a germinação dos esporos do fungo e nos momentos iniciais de infecção (VIEIRA et al., 2012). O domínio Gp α presente no transcrito de_novo_4692 está relacionado a formação defeituosa de apressório, assim como perda de virulência em fungos fitopatogênicos como *Magnaporthe grisea* e *Cochliobolus heterostrophus* (BOLKER, 1998). A deleção de uma região da proteína Gp α de *Magnaporthe grisea*, causador de brusone em plantas de arroz, reduziu em até 95% a formação de apressórios pelo fungo (LIU & DEAN, 1997). Já no fungo *Cochliobolus heterostrophus* que ataca folhas de milho a deleção de uma subunidade G levou ao crescimento alterado e a perda quase total da capacidade de formar apressório (GANEN et al., 2004).

Em *P. pachyrizi* foi possível relacionar a ocorrência das melhores respostas de redução nos sintomas da ferrugem justamente nas folhas onde a indução do silenciamento do transcrito de_novo_4692 ocorreu em 6 hai. Dessa forma sugere-se que quando a indução do silenciamento ocorreu já em 6 hai a formação dos apressórios de *P. pachyrizi* possa ter sido afetada reduzindo a capacidade do fungo em causar a doença e como consequência todos os parâmetros relacionados à doença, inclusive a severidade foi significativamente reduzida. Já quando o silenciamento foi observado somente às 12 hai possivelmente mais apressórios foram formados elevando a severidade da doença. Embora a comprovação dessa hipótese requeira o estudo microscópico do desenvolvimento de *P. pachyrizi*, esses resultados indicam que a concentração de dsRNA utilizada em ensaios de aplicação direta exerça relevante influência sobre os resultados alcançados tornando essencial o estabelecimento da concentração ideal de aplicação. Resultados semelhantes que indicam haver diferença no

efeito de silenciamento entre doses de forma variável para cada alvo já foram reportados em *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea* (MCLOUGHLIN et al., 2018)

Por fim, embora nas duas doses testadas os GFP-dsRNA tenham sido detectados nas folhas de soja e transferidos a geração seguinte de esporos, a menor concentração utilizada neste experimento apresentou melhor eficiência no silenciamento do gene alvo já que com ela obteve-se a maior indução de silenciamento no momento apropriado, ou seja, no momento em que o transcrito alvo seria requerido para desencadear o desenvolvimento do apressório. Em altas doses de dsRNA, muitos siRNA são produzidos o que pode levar a supersaturação do sistema de silenciamento resultando em baixa resposta de RNAi ou resposta inespecífica. Os componentes celulares e as proteínas que atuam na absorção e no processamento do dsRNA são finitos portanto a competição por esses componentes ocorrem em algum nível podendo inibir o efeito de silenciamento (MILLER et al.; 2012; MEYERING-VOS & MÜLLER, 2007; MCLOUGHLIN e al., 2018).

3.5 Conclusões

Dos resultados alcançados conclui-se que a aplicação direta de dsRNA foi uma via eficaz para o silenciamento de genes alvo em *Phakopsora pachyrhizi* sendo possível a transmissão do sinal de silenciamento em pelo menos uma geração após a aplicação. A eficiência de silenciamento foi dose dependente sendo a melhor taxa de silenciamento (86,6%) alcançada com a menor concentração de dsRNA, ou seja, é possível que em concentrações ainda menores taxas maiores de silenciamento possam ser obtidas. É importante notar que o dsRNA penetra a estrutura celular do fungo muito provavelmente durante a formação do tubo germinativo. Ainda, é possível afirmar que o silenciamento do transcrito de_novo_4692 influencia no estabelecimento da doença, reduzindo sua severidade.

4 REFERÊNCIAS

ABDELLATEF, E.; WILL, T.; KOCH, A.; IMANI, J.; VILCINSKAS, A.; KOGEL, K. Silencing the expression of the salivary sheath protein causes transgenerational feeding suppression in the aphid *Sitobion avenae*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 6, p. 849–857, 2015.

ANDRADE, P. J. M.; ARARIPE-ANDRADE, D. F. A. **Ferrugem asiática: uma ameaça a soja cultura brasileira**. Brasília, DF: Embrapa Agropecuária Oeste, 11 p. (Circular técnica, 11), 2002.

ARAVIN, A.A.; NAUMOVA, N.M.; TULIN, A.V.; VAGIN, V.V.; ROZOVSKY, Y.M.; GVOZDEV, V.A. Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. **Current Biology**, v. 11, n. 13, p. 1017–1027, 2001.

BARBOSA, G. F.; DA CRUZ CENTURION M. A. P.; MARIN, B. T. ; BARBOSA, G.F. Effect of reduced fungicide doses on control of soybean Asian rust and bean yield. **Interciencia**, v.38, n. 5, p. 347-352, 2013.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.

BAULCOMBE, D. RNA silencing in plants. **Nature**, v. 431, p. 356-363, 2004.

BAULCOMBE, D.C. VIGS, HIGS and FIGS: small RNA silencing in the interactions of viruses or filamentous organisms with their plant hosts. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 26, p. 141-146, 2015.

BAUM, J.A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G.R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK; G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1322-1326, 2007.

BAUMBERGER, N.; BAULCOMBE, D.C. Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 33, p.11928 -11933, 2005.

BERNSTEIN, E.; CAUDY, A. A.; HAMMOND, S. M.; HANNON, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, n. 6818, p.363-366, 2001.

BILLMYRE, R.B.; CALO, S.; FERETZAKI, M.; WANG, X.; HEITMAN, J. RNAi function, diversity, and loss in the fungal kingdom. **Chromosome Research**, v. 21, n. 6-7, p. 561-572, 2013.

BLACK, R. J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectivas. In: CÂMARA, G. M. S. **Soja: tecnologia da produção II**. Piracicaba: ESALQ, LPV, cap. 1, p. 1-18, 2000.

BOLKER M. Sex and crime: heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 25, n. 3, p. 143-156, 1998.

BONDE, M. R.; MELCHING, J. S.; BROMFIELD, K. R. Histology of the susceptpathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi*, the cause of soybean rust. **Phytopathology**, v. 66, p. 1290-1294, 1976.

BORSANI, O.; ZHU, J.H.; VERSLUES, P.E.; SUNKAR, R.; ZHU, J.K. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural *cis*-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. **Cell**, v.123, n.7, p.1279-1291, 2005.

BRODERSEN, P.; VOINNET, O. The diversity of RNA silencing pathways in plants. **Trends in Genetics** v. 22, n.5, p. 268–280, 2006.

BRODERSEN, P.; SAKVARELIDZE-ACHARD, L.; BRUUN-RASMUSSEN, M.; DUNOYER, P.; YAMAMOTO, Y.Y.; SIEBURTH, L.; VOINNET, O. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. **Science**, v. 320, n. 5880, p. 1185-1190, 2008.

BROMFIELD, K.R.; HARTWIG, E.E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, v. 20, n. 2, p. 254–255, 1980.

BROSNAN, C.A.; VOINNET, O. Cell-to-cell and long-distance siRNA movement in plants: mechanisms and biological implications. **Current Opinion Plant Biology**, v. 14, n.5, p. 580-587, 2011.

CALO, S.; NICOLÁS, FE.; VILA, A.; TORRES-MARTÍNEZ, S.; RUIZ-VÁZQUEZ, R. M. Two distinct RNA-dependent RNA polymerases are required for initiation and amplification of RNA silencing in the basal fungus *Mucor circinelloides*. **Molecular Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 379-394, 2012.

CAMBARERI, E. B.; JENSEN, B.C.; SCHABTACH, E.; SELKER, E.U. Repeat-induced G-C to A-T mutations in *Neurospora*. **Science**, v. 244, n. 4912, p. 1571-1575, 1989.

CARMELL, M.A.; XUAN, Z.; ZHANG, M.Q.; HANNON, G.J. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. **Genes and Development**, v. 16, n. 21, p. 2733-2742, 2002.

CARTHEW, R.W.; SONTHEIMER, E.J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642–655, 2009.

DE CARVALHO, M.C.C.G.; COSTA, L.N.; DARBEN, L.M.; POLIZEL-PODANOSQUI, A.M.; LOPES-CAITAR, V.S.; QI, M.; ROCHA, C.S.; CARAZZOLLE, M.F.; KUWAHARA, M.K.; PEREIRA, G.A.; ABDELNOOR, R.V.; WHITHAM, S.A.; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C. Prediction of the *in planta* *P. pachyrhizi* secretome and potential effector families. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 3, p. 363-377, 2016.

CASTEL, S. E.; MARTIENSSEN R. A. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 2, p. 100–112, 2013.

CATALANOTTO, C.; PALLOTTA, M.; REFALO, P.; SACHS, M. S.; VAYSSIE, L.; MACINO, G.; COGONI, C. Redundancy of the two dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 6, p. 2536-2545, 2004.

CHANG, S.S.; ZHANG, Z.; LIU, Y. RNA Interference Pathways in Fungi: Mechanisms and Functions. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, p. 305-323, 2012.

CHEN, Y.; ZHOU, X.; ZHANG, Z. J.; DRIBNENKI, P.; SINGH, S.; GREEN, A. Development of high oleic oil crop platform in flax through RNAi-mediated multiple FAD2 gene silencing. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 4, p. 643–653, 2015.

CHOI, J.; KIM, K.T.; JEON, J.; WU, J.; SONG, H.; ASIEGBU, F.O.; LEE, Y.H. funRNA: a fungi-centered genomics platform for genes encoding key components of RNAi. **BMC Genomics**, v. 15, n. 9, 2014.

CONAB, – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira – Grãos**, v4 – Safra 2016/2017, n.12 – Décimo Segundo Levantamento. Conab, 2016.

CONAB, – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira – Grãos**, v4 – Safra 2016/2017, n.12 – Décimo Segundo Levantamento. Brasília: Conab, 2017.

CONAB, – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira – Grãos**, v9 – Safra 2017/2018, n.9 – Nono Levantamento. Brasília: Conab, 2018.

COOPER, B.; CAMPBELL, K.B. Protection against common bean rust conferred by a gene silencing method. **Phytopathology**, v. 107, n. 8, p. 920-927, 2017.

DANG, Y.; YANG, Q.; XUE, Z.; LIU, Y. RNA Interference in fungi: pathways, functions, and applications. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 9, p. 1148-1155, 2011.

DEISING, H. B.; WERNER, S.; WERNITZ, M. The role of fungal appressoria in plant infection. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 13, p.1631–1641, 2000.

DUAN, G.; SAINT, R. B.; HELLIWELL, C. A.; BEHM, C. A.; WANG, M. B.; WATERHOUSE, P. M.; GORDON, K. H. C. elegans RNA-dependent RNA polymerases rrf-1 and ego-1 silence Drosophila transgenes by differing mechanisms. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.70, n. 8, p. 1469–1481, 2013.

DUPLESSIS, S.; CUOMO, C.A.; LIN, Y.C.; AERTS, A.; TISSERANT, E.; et al. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 22, p. 9166–9171, 2011.

ELBASHIR, S. M.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W.; YALCIN, A.; WEBER, K.; TUSCHL, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 411, n. 6836, p. 494-498, 2001.

EL-SHESHENY, I.; HAJERI, S.; EL-HAWARY, I.; GOWDA, S.; KILLINY, N. Silencing abnormal wing disc gene of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* disrupts adult wing development and increases nymph mortality. **Plos One**, v.8, n. 5, p. 365-392, 2013.

EMBRAPA. Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de produção de soja Região Central do Brasil 2011**. Londrina-PR: Embrapa Soja, 2010.

FE, N.; HARO, J. P.; TORRES-MARTÍNEZ, S.; RUIZ-VÁZQUEZ, R. M. Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dicer-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, n. 6, p. 504–516, 2007.

FE, N.; VILA, A.; MOXON, S.; CASCALES, M.D.; TORRES-MARTÍNEZ S.; RUIZ VÁZQUEZ, R.M.; GARRE, V. The RNAi machinery controls distinct responses to environmental signals in the basal fungus *Mucor circinelloides*. **BMC Genomics**, v.16, n. 1, 2015.

FERREIRA, M.N. **Desafios da política agrícola**. 2.ed. São Paulo: Gazeta Mercantil, 1998.

FIRE, A.; XU, S.Q.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, London, v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

GANEM, S., LU, S.-W., LEE, B.-N., CHOU, D. Y.-T., HADAR, R., TURGEON, B. G., HORWITZ, B. A. G-Protein β Subunit of *Cochliobolus heterostrophus* involved in virulence, asexual and sexual reproductive ability, and morphogenesis. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 6, p.1653–1663, 2004

GARCIA, A.; CALVO, E.S.; SOUZA KIIHL, R.A.; HARADA, A.; HIROMOTO, D.M.; VIEIRA, L.G. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 4, p. 545–553, 2008.

GARRE, V.; FE, N.; TORRES-MARTÍNEZ, S.; RUIZ-VÁZQUEZ, R. M. The RNAi machinery in Mucorales: the emerging role of endogenous small RNAs. **Fungal RNA Biology**, p. 291–313, 2014.

GHAG, S.B.; SHEKHAWAT, U.K.; GANAPATHI, T.R. Host-induced posttranscriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against *Fusarium* wilt in banana. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 5, p. 541–553, 2014.

GHILDIYAL, M.; ZAMORE, F.D. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nature Reviews: Genetics**, London, v. 10, n. 2, p. 94-108, 2009.

GODOY, C.V.; KOGA, L.J.; CANTERI, M.G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 63-68, 2006.

GODOY, C. V. Risk and management of fungicide resistance in the Asian soybean rust fungus *Phakopsora pachyrhizi*. **Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and management**, p. 87-95, 2011.

GODOY, C. V. Risk and management of fungicide resistance in the Asian soybean rust fungus *Phakopsora pachyrhizi*. **Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk Management**, p. 87-95, 2012.

GODOY, C. V.; BUENO, A. D. F.; GAZZIERO, D. L. P. Brazilian Soybean Pest Management and Threats to its Sustainability. **Outlooks on Pest Management**, v. 26, p. 113-117, 2015.

GOELLNER, K.; LOEHRER, M.; LANGENBACH, C.; CONRATH, U.; KOCH, E.; SCHAFFRATH, U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology**, v.11, n.2, p.169-177, 2010.

GOLDEN, D. E.; GERBASI, V. E.; SONTHEIMER, E. J. An inside job for siRNAs. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 31, n. 3, p. 309-312, Ago. 2008.

GONSALVES, P. E. **Maus hábitos alimentares**. São Paulo:Agora, 2001.

GOVINDARAJULU, M.; EPSTEIN, L.; WROBLEWSKI, T.; MICHELMORE, R. W. Host induced gene silencing inhibits the biotrophic pathogen causing downy mildew of lettuce. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 7, p. 875-883, 2015.

GRISHOK, A.; TABARA, H.; MELLO, C. C. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. **Molecular biology**, v. 287, n. 5462, 2000.

HAHN, M. The rust fungi: cytology, physiology and molecular biology of infection. In: KRONSTADT, J. (Ed.). **Fungal Pathology**, Netherlands, p. 267–306. 2000.

HAJERI, S.; KILLINY, N.; EL-MOHTAR, C.; DAESON, W. O.; GOWDA, S. Citrus tristeza virus-based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease (Huanglongbing). **Journal of Biotechnology**, v. 176, p. 42–49, 2014.

HAMMOND, T. M.; XIAO, H.; BOONE, E. C.; DECKER, L. M.; LEE, S. A.; PERDUE, T. D.; PUKKILA, P. J.; SHIU, P. K. Novel proteins required for meiotic silencing by unpaired DNA and siRNA generation in *Neurospora crassa*. **Genetics**, v. 194, n. 1, p.91–100, 2013.

HARO, J.P.; CALO, S.; CERVANTES, M.; NICOLÁS, F.E.; TORRES-MARTÍNEZ, S.; RUIZ-VÁZQUEZ, R. M. A single dicer gene is required for efficient gene silencing associated with two classes of small antisense RNAs in *Mucor circinelloides*. **Eukaryot Cell**, v. 8, n.10, p. 1486–1497. 2009.

HARTMAN, G.L.; MILES, M.R.; FREDERICK, R.D. Breeding for Resistance to Soybean Rust. **Plant Disease**, v. 89, n. 6, p. 664-666, 2005.

HARTMAN, G. L.; SIKORA, E. J.; RUPE, J. C. Rust. In: HARTMAN, G.L.; RUPE, J.C.; SIKORA, E.J.; DOMIER, L.L.; DAVIS, J.A.; STEFFEY, K.L. Compendium of soybean diseases and pests. **American Phytopathological Society**, n. 5, p.56-58, 2015.

HARTWIG, E. E.; BROMFIELD, K. R. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. **Crop Science**, v. 23, n. 2, p. 237–239, 1983.

HARTWIG, E. E. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. **Crop Science**, v. 26, n. 6, p. 1135–1136, 1986.

HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro**. Documentos 349. Embrapa Soja, Londrina, Paraná. 30 p, 2014.

HU, Y.; STENLID, J.; ELFSTRAND, M.; OLSON, A. Evolution of RNA interference proteins dicer and argonaute in Basidiomycota. **Mycologia**, v. 105, n. 5, p. 1489–1498, 2013.

HUNTER, W. B.; GLICK, E.; PALDI, N.; BEXTINE, B. R. Advances in RNA interference: dsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest suppression. **Southwestern Entomologist**, v. 37, n.1, p. 85-87, 2012.

HUTVAGNER, G.; ZAMORE, P. D. RNAi: Nature abhors a double-strand. **Current Opinion in Genetics Development**, v. 12, n.2, p. 225–232, 2002.

JOGA, M. R.; ZOTTI, M. J.; SMAGGHE, G.; CHRISTIAENS, O. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. 553, 2016.

KATIYAR-AGARWAL, S.; MORGAN, R.; DAHLBECK, D.; BORSANI, O.; VILLEGAS, A.; ZHU, J. K.; STASKAWICZ, B.; JIN, H. A Pathogen-Inducible endogenous siRNA in plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 103, n. 47, p. 18002–18007, 2006.

KING, Z. R.; CHILDS, S. P.; HARRIS, D. K.; PEDLEY, K. F.; BUCK, J. W.; BOERMA, H. R.; LI, Z. A new soybean rust resistance allele from PI 423972 at the *Rpp4* locus. **Molecular Breeding**, v. 37, n.5, 2017.

KILLINY, N.; HAJERI, S.; TIWARIL, S.; GOWDA, S.; STELINSKI, L. L. Double-stranded RNA uptake through topical application, mediates silencing of five CYP4 genes and suppresses insecticide resistance in *Diaphorina citri*. **Plos One**, v. 9, n. 10, p. 1–8, 2014.

KOCH, A.; KOGEL, K. H. New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediate gene silencing. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 7, p. 821-831, 2014.

KOCH, A.; BEIDENKOPF, D.; FURCH, A.; WEBER, L.; ROSSBACH, O.; ABDELLATEF, E. An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. **Plos Pathogens**, v.12, n.10, 2016.

KRAMER, C. Y. Extension of Multiple Range Tests to Group Means with Unequal Numbers of Replications. **Biometrics**, v. 12, n. 3, p. 307-310, 1956.

LAM, J. K. W.; CHOW, M. Y. T.; ZHANG, Y.; LEUNG, S. W. S. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. **Molecular Therapy**, v. 9, n.10, 2015.

LEE, D. W.; PRATT, R. J.; MCLAUGHLIN, M.; ARAMAYO, R. An argonautelike protein is required for meiotic silencing. **Genetics**, v. 164, n.2, p. 821–828, 2003.

LEE, H. C.; CHANG, S. S.; CHOUDHARY, S.; AALTO, A. P.; MAITI, M.; BAMFORD, D. H.; LIU, Y. qiRNA is a new type of small interfering RNA induced by DNA damage. **Nature**, v. 459, n. 7244, p. 274-277, 2009.

LEE, H. C.; AALTO, A. P.; YANG, Q.; CHANG, S. S.; HUANG, G.; FISHER, D.; CHA, J.; PORANEN, M. M.; BAMFORD, D. H.; LIU, Y. The DNA/RNA-dependent RNA polymerase QDE-1 generates aberrant RNA and dsRNA for RNAi in a process requiring replication protein A and a DNA helicase. **Plos Biology**, v. 8, n. 10, 2010.

LEMES, E.; GAVASSONI, W. L. Ferrugem asiática da soja. In: **Doenças da soja: melhoramento genético e técnica de manejo**. Campinas, SP: Millennium Editora, 2015.

LI, X.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology**, v. 52, n.1, p. 231-253, 2007.

LI, S.; SMITH, J. R.; RAY, J. D.; FREDERICK, R. D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI567102B. **Theoretical Applied Genetics**, v. 125, n.1, p. 133-142, 2012.

LI, H.; GUAN, R.; GUO, H.; MIAO, X. New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. **Plant, Cell e Environment**, v. 38, n.11, p. 2277-2285, 2015.

LINK, T.I.; LANG, P.; SCHEFFLER, B. E.; DUKE, M. V.; GRAHAM, M. A.; COOPER, B.; TUCKER, M. L.; VAN DE MORTEL, M.; VOEGELE, R. T.; MENDGEN, K.; BAUM, T. J.; WHITHAM, S. A. The haustorial transcriptomes of *Uromyces appendiculatus* and *Phakopsora pachyrhizi* and their candidate effector families. **Molecular Plant Pathology**, v. 15, n. 4, p. 379–393, 2014.

LIPPMAN, Z.; MARTIENSSEN, R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. **Nature**, London, v. 431, n. 7006, p. 364–370, 2004.

LIU, S.; DEAN, R. A. G protein alpha subunit genes controgrowth, development, and pathogenicity of Magnaporthe grisea. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 10, n. 9, p. 1075–1086, 1997.

LIU, Q.; RAND, T.; KALIDAS, S.; DU, F.; KIM, H.; SMITH, D.; WANG, X. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. **Science**, v. 301, n. 5641, p. 1921–1925, 2003.

MACIEL, T. E. F.; FREIRE, M. C. M.; ALMEIDA, A. M. R.; OLIVEIRA, L. O. Molecular characterization of beta-tubulin from *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of asian soybean rust. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 2 p. 354-358, 2010.

MAO, Y. B., CAI, W. J.; WANG, J. W.; HONG, G. J.; TAO, X. Y.; WANG, L. J.; HUANG, Y. P.; CHEN, X. Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-

mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1307-1313, 2007.

MAO, Y. B.; TAO, X. Y.; XUE, X. Y.; WANG, L. J.; CHEN, X. Y. Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 20, n. 3, p. 665-673, 2011.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: Acesso em: 10 mai. 2018.

MATIELO, R.R.; BARBIERI, R.L.; CARVALHO, F.I.F. Resistência das plantas a moléstias fúngicas. **Ciência Rural**, v. 27, n.1, p. 161-168, 1997.

MCLEAN, R. J.; BYTH, D. E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 31, n. 5, p. 951–956, 1980.

MCLOUGHLIN, A. G.; WYTINCK, N.; WALKER, P. L.; GIRARD, I. J.; RASHID, K. Y.; KIEVIT, T.; FERNANDO, W. G. D.; WHYARD, S.; BELMONTE, M. F. Identification and application of exogenous dsRNA confers plant protection against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

MEYERING-VOS, M.; MÜLLER, A. Structure of the sulfakinin cDNA and gene expression from the Mediterranean field cricket *Gryllus bimaculatus*. **Insect Molecular Biology**, v.16, n.4, p.445-454, 2007.

MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R. T.; MAGNO JUNIOR, R. G.; LEITE, E. A. G. L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 83-90, 2007.

MELLO, C.C.; CONTE JUNIOR, D. Revealing the world of RNA interference. **Nature**, London, v. 431, n. 7006, p. 338-342, 2004.

MILLER, S. C.; MIYATA, K.; BROWN, S. J.; TOMOYASU, Y. Dissecting systemic RNA interference in the red flour beetle *Tribolium castaneum*: parameters affecting the efficiency of RNAi. **Plos One**, v. 7, n.10, 2012.

MITCHELL, T. K.; DEAN, R. A. The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **The Plant Cell**, v. 7, n.11, p. 1869-1878, 1995.

MOAZED, D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 413–420, 2009.

MOLDOVAN, D.; SPRIGGS, A.; DENNIS, E. S.; WILSON, I. W. The hunt for hypoxia responsive natural antisense short interfering RNAs. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 3, p. 247–251, 2010.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **Plant Cell**, v. 2, n. 4, p. 279–289, 1990.

NICOLÁS, F. E.; RUIZ-VÁZQUEZ, R. M. Functional diversity of RNAi-associated sRNAs in fungi. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, n. 8, p. 15348-15360, 2013.

NOLAN, T.; BRACCINI, L.; AZZALIN, G.; DE TONI, A.; MACINO, G.; COGONI, C. The post-transcriptional gene silencing machinery functions independently of DNA methylation to repress a LINE1-like retrotransposon in *Neurospora crassa*. **Nucleic Acids Research** v. 33, n. 5, p. 1564-1573, 2005.

NOWARA, D.; GAY, A.; LACOMME, C.; SHAW, J.; RIDOUT, C.; DOUCHKOV, D.; HENSEL, G.; KUMLEHN, J.; SCHWEIZERA, P. HIGS: Host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. **The Plant Cell**, v. 22, n. 9, p. 3130-3141, 2010.

PANWAR, V.; MCCALLUM, B.; BAKKEREN, G. Host-induced gene silencing of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* pathogenicity genes mediated by the *Barley stripe mosaic virus*. **Plant Molecular Biology**, v. 81, n. 6, p. 595–608, 2013.

PANWAR, V.; JORDAN, M.; MCCALLUM, B.; BAKKEREN, G. Host-induced silencing of essential genes in *Puccinia triticina* through transgenic expression of RNAi sequences reduces severity of leaf rust infection in wheat. **Plant Biotechnology Journal**, v.16, n. 5, p.1013–1023, 2018.

PARENT, J. S.; ALBA, A. E. M.; VAUCHERET, H. The origin and effect of small RNA signaling in plants. **Frontiers in Plant Pathology**, v. 3, 2012.

PARKER, G.; ECKERT, D.; BASS, B. RDE-4 preferentially binds long dsRNA and its dimerization is necessary for cleavage of dsRNA to siRNA. **RNA**, v. 12, n. 5, p. 807–818, 2006.

POSADA-BUITRAGO, M. L. FREDERICK, R. D. Expressed sequence tag analysis of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 12, p. 949–962, 2005.

PRATT, R. J.; LEE, D. W.; ARAMAYO, R. DNA methylation affects meiotic trans sensing, not meiotic silencing, in *Neurospora*. **Genetics**, v.168, n. 4, p. 1925–1935, 2004.

PYOTT, D.E.; MOLNAR, A. Going mobile: Non-cell-autonomous small RNAs shape the genetic landscape of plants. **Plant Biotechnology Journal**, v.13, n. 3, p. 306-318, 2015.

RINCÃO, M. P. **Transcriptoma in planta de *Phakopsora pachyrhizi* e caracterização funcional de genes envolvidos em mecanismos basais de sobrevivência e patogenicidade**. 200 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

REIS, E. M.; BRESOLIN, A. C. R.; CARMONA, M. **Doenças da soja I: Ferrugem asiática**. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2006.

REIS, E. M.; DEUNER, E.; ZANATTA, M. In vivo sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* to DMI and QoI fungicides. **Summa Phytopathologica**, v.41, n. 1, p.21-24, 2015.

ROESSING, A. C.; GUEDES, L. C. Cultura da soja nos cerrados. In: ARANTES, N. E.; SOUZA, P. T. M. **Aspectos econômicos do complexo soja: sua participação na economia brasileira e evolução na região do Brasil Central**. 1. Ed. Piracicaba: Potafós, 1993. cap. 1, p.1-69.

ROMANO, N.; MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 22, p. 3343–3353, 1992.

SAGHAI MAROOF, M. A.; JEONG, S. C.; GUNDUZ, I.; TUCKER, D. M.; BUSS, G.R.; TOLIN, S. A. Pyramiding of soybean mosaic virus resistance genes by marker-assisted selection. **Crop Science**, v. 48, n. 2, p. 517-526, 2008.

SAN MIGUEL, K.; SCOTT, J. G. The next generation of insecticides: dsRNA is stable as a foliar applied insecticide. **Pest Management Science**, v. 72, n. 4, p. 801-809, 2015.

SCHAUER, S.; JACOBSEN, S.; MEINKE, D.; RAY, A. DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. **Trends Plant Science**, v.7, n. 11, p. 487-491, 2002.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. de C.; BARROS, H. B. Tecnologias de produção e usos da soja. In: SEDIYAMA, T. **Origem, evolução e importância econômica**. 1 ed. Londrina: Mecenas, 2009. cap. 1.

SELKER, E. Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. **Annual Review of Genetics**, v. 24, n. 1, p. 579-613, 1990.

SHIU, P. K.; RAJU, N. B.; ZICKLER, D.; METZENBERG, R. L. Meiotic silencing by unpaired DNA. **Cell**, v. 107, n. 7, p. 905–916, 2001.

SHIU, P. K.; METZENBERG, R. L. Meiotic silencing by unpaired DNA: properties, regulation and suppression, **Genetics**, v.161, n. 4, p. 1483–1495, 2002.

SHIU, P. K.; ZICKLER, D.; RAJU, N. B.; RUPRICH-ROBERT, G. METZENBERG, R. L. SAD-2 is required for meiotic silencing by unpaired DNA and perinuclear localization of SAD-1 RNA-directed RNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 7, p. 2243-2248, 2006.

STONE, C. L.; MCMAHON, M. B.; FORTIS, L. L.; NUÑEZ, A.; SMYTHERS, G. W.; LUSTER, D. G.; FREDERICK, R. D. Gene expression and proteomic analysis of the formation of *Phakopsora pachyrhizi* appressoria. **BMC Genomics**, v. 13, n.1, p. 269-290, 2012.

Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil, anos 2012 e 2013. **Sistemas de Produção**. Londrina: Embrapa Soja, p.261, 2013.

TINOCO, M. L.; DIAS, B. B.; DALL'ASTTA, R. C.; PAMPHILE, J. A.; ARAGÃO, F. J. *In vivo* trans-specific gene silencing in fungal cells by in planta expression of a doublestranded RNA. **BMC Biology**, v. 8, n. 1, p. 27, 2010.

THAKUR, N.; UPADHYAY, S. K.; VERMA, P. C.; CHANDRASHEKAR, K.; TULI, R.; SINGH, P. K. Enhanced whitefly resistance in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of v-ATPase A gene. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. 87235, 2014.

TREMBLAY, A.; LI, S.; SCHEFFLE, B. E.; MATTHEWS, B. F. Laser capture microdissection and expressed sequence tag analysis of uredinia formed by *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 73, n. 6, p. 163-174, 2009.

TREMBLAY, A.; HOSSEINI, P.; LI, S.; ALKHAROUF, N. W.; MATTHEWS, B. F. Identification of genes expressed by *Phakopsora pachyrhizi*, the pathogen causing soybean rust, at a late stage of infection of susceptible soybean leaves. **Plant Pathology**, v. 61, n. 4, p. 773–786, 2012.

TREMBLAY, A.; HOSSEINI, P.; LI, S.; ALKHAROUF, N. W.; MATTHEWS, B. F. Analysis of *Phakopsora pachyrhizi* transcript abundance in critical pathways at four time-points during infection of a susceptible soybean cultivar using deep sequencing. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 614, 2013.

USDA. United States Department of Agriculture. **Market and trade data**. 2014. Disponível em:<[HTTPS://www.fas.usda.gov/psdonline/psd-Query.aspx](https://www.fas.usda.gov/psdonline/psd-Query.aspx)> Acesso em: 12 abr. 2018.

USDA. United States Department of Agriculture. **Market and trade data**. 2015. Disponível em:<[HTTPS://www.fas.usda.gov/psdonline/psd-Query.aspx](https://www.fas.usda.gov/psdonline/psd-Query.aspx)> Acesso em: 12 abr. 2018.

VAGIN, V.V.; SIGOVA, A.; LI, C.; SEITZ, H.; GVOZDEV, V.; ZAMORE1, P. D. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. **Science**, v. 313, n. 5785, p. 320-324, 2006.

VAZQUEZ, F.; VAUCHERET, H.; RAJAGOPALAN, R.; LEPERS, C.; GASCIOLLI, V.; MALLORY, A.C.; HILBERT, J. L.; BARTEL, D. P.; CRETE, P. Endogenous transacting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. **Molecular Cell**, v.16, n. 1, p.69-79, 2004.

VIEIRA, A.; TALHINHAS, P.; LOUREIRO, A.; THÜRICH, J.; DUPLESSIS, S.; FERNANDEZ, D.; SILVA, M. C.; PAULO, O. S.; AZINHEIRA, H. G. Expression profiling of genes involved in the biotrophic colonisation of *Coffea arabica* leaves by *Hemileia vastatrix*. **European Journal Plant Pathology**, v. 133, n. 1, p. 261-277, 2012.

VOINNET O. RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, n.5, p. 444-451, 2002.

VOINNET, O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. **Cell**, v. 136, n.4, p. 669-687, 2009.

VOINNET O.; BAULCOMBE D. C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. **Plant Cell**. v. 10, n.6, p. 937-946, 1998.

WANG Y.; ZHANG H.; LI H.; MIAO, X. Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. **Plos One**, v. 6, n. 4, 2011.

WANG, M.; WEIBERG A.; LIN, F. M.; THOMMA, B. P. H. J.; HUANG, H. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. **Nature Plants**. v. 2, n. 10, 2016.

WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S. P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICKE, R. **Biologia molecular do gene**. Artmed Editora, 2015.

WEIBERG, A.; WANG, M.; BELLINGER, M.; JIN, H. Small RNAs: a new paradigm in plant-microbe interactions. **Annual Review Phytopathology**, v.52, n. 1, p. 495-516, 2014.

WEIBERG, A.; JIN, H. L. Small RNAs – the secret agents in the plant-pathogen interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v.26, p. 87-94, 2015.

WILL, T.; VILCINSKAS, A. Aphid-proof plants: biotechnology-based approaches for aphid control. **Advances Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 136, p. 179-203, 2013.

XU, J. R.; HAMER, J. E. MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Genes & Development** v. 10, n. 21, p. 2696-2706, 1996.

YAMANAKA, N.; YAMAOKA, Y.; KATO, M.; LEMOS, N. G.; PASSIANOTTO, A. L. L.; DOS SANTOS, J. V. M.; BENITEZ, E. R.; ABDELNOOR, R. V.; SOARES, R. M.; SUENAGA, K. Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust populations. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 3, p. 153-162, 2010.

YIN, C. T.; JURGENSON, J. E.; HULBERT, S. H. Development of a host-induced RNAi system in the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, v. 24, n. 5, p. 554-561, 2011.

YORINORI, J. T.; LAZZAROTTO, J. J. **Situação atual da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul**. Londrina, Embrapa Soja, 2004. 30p. (Documentos, 326)

ZHANG, H.; GUO, J.; VOEGELE, R. T.; ZHANG, J.; DUAN, Y.; LUO, H.; KANG, Z. Functional characterization of calcineurin homologs PsCNA1/PsCNB1 in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* using a host-induced RNAi system. **Plos One**, v.7, n. 11, 2012.

ZHANG, J.; KHAN, S. A.; HECKEL, D. G.; BOCK, R. Next-generation insect-resistant plants: RNAi-mediated crop protection. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 871-882, 2017.

ZOTTI, M.; SANTOS, E. A.; CAGLIARI, D.; CHRISTIAENS, O.; TANING, C. N. T.; SMAGGHE, G. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. **Pest Management Science**, v. 74, n. 6, p. 1239-1250, 2018.

5 APÊNDICE

Tabela S1: Sequências das moléculas de dsRNA utilizadas.

Identificação	Sequencia	Tamanho (pb)
De_novo_4692	GATATTGTTTCGATCAAGGGTTAAATCTACTGGAA TATCAGAGAGTAGATTCAACGTCGGTCAACTTAT TTGGAAAGTCTTTGATGTCGGAGGTCAACGATCG GAACGCAAGAAGTGGATTTCATTGTTTTGAAAATG TAAACGTTTTGATCTTTTTTTGTGGCTATCAATGAG TATGATCAGGTGCTATACGAGGATGAGAGTGTGA ATCGAATGGCTGAAGCAGCAACCCTTTTTGACTC GATCTGCAACTCTCAGTGGTTTCGTCAAACCTCAA ATGATACTATTTTTTAACAAGATTGATCTCTTCAA AGTCAAACCTGAGCACATCTCCGCTCTCTAAGAGG TTTCCAGACTACACTGGTGATAACTCGTACGAAT CAGCGGCAAAGTTTATTCATCGAAACTTTTTGCA GCTCTGTAGAGATCCCAATAAGGATATCATCACT CACTTCACCTGTGCCACTGACTCTCAACAAATAT CTGTTGTA CTGGTGTACAAGAATCTATTCTA CGGAAAAACTTAGCTGCAGCCGGGTACCTATAAT AAGAAAAAATAATGACTTTTTATAGAAAGAA AAAGAAATGACTTGAAGTAGACGTTTTCTTTTT CTGACTGTTTTTAATTTATTCAAAAAAATGGAAA ACATTTTTTTTTGAAGAGCTTTTCTTTCTTTTCCA ATTTCGTATCTTGGTTTTACCTTCCTTACCTTTATTT AATATTTAAATTCTTGGAAATAACTTTTCTTTCAGT AATAACCTGTTTATTTATTTTACTTCATTTTTCAA AAAGAAAAACAAGAAAGAAAGAAAAGAAAAGAAA TACTCTTACTTTATTTATACATATCTCATTTTTTA TTCTTTAAAATAAGTGAATGAAAGATTTTT	888
GFP	TCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACG GAAACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGG AAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACT ACTTTCTCTTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATA CCCAGATCATATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAG AGCGCCATGCCTGAGGGATACGTGCAGGAGAGG ACCATCTTCTTCAAGGACGACGGGAACCTACAAGA CACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAGGGAGACACCCT CGTCAACAGGATCGAGCTTAAGGGAATCGATTT AAGGAGGACGGAAACATCCTCGGCCACAAGTTG GAATACAACCTACAACCTCCACAACGTATACATCA TGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTA ACTTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAA GCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATAC TCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACC	502