

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Construções gênicas para o silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro em arabidopsis e trigo para o controle de giberela

Eduardo André Roesler

Passo Fundo

2021

Eduardo André Roesler

Construções gênicas para o silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro em arabis e trigo para o controle de giberela

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Doutorado em Agronomia.

Orientador:
Dra. Carolina Cardoso Deuner

Passo Fundo

2021

CIP – Catalogação na Publicação

- R718c Roesler, Eduardo André
Construções gênicas para o silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro em arabidopsis e trigo para o controle de giberela [recurso eletrônico] / Eduardo André Roesler. – 2021. 2.4 MB ; PDF.
- Orientadora: Profa. Dra. Carolina Cardoso Deuner.
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2021.
1. Trigo – Doenças e pragas – Controle. 2. Trigo – Cultivo. 3. Gibberella zeae. 4. Silenciamento gênico. I. Deuner, Carolina Cardoso, orientadora. II. Título.

CDU: 633.11

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO



PPGAgro
Programa de Pós-Graduação
em Agronomia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

“Construções gênicas para o silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro em arabidopsis e trigo para controle de giberela”

Elaborada por

Eduardo André Roesler

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
“Doutor em Agronomia – Área de Produção e Proteção de Plantas”

Aprovada em: 05/04/2021
Pela Comissão Examinadora

Dra. Carolina Cardoso Deuner
Presidente da Comissão Examinadora

Orientador

Dra. Nádia Canali Lângaro
UPF

Dra. Elene Yamazaki Lau
Embrapa Trigo

Dra. Maria Imaculada Pontes Moreira Lima
Embrapa Trigo

ANA KARLA MACHADO WOOD:070
WOOD:070045e5618
06565618
Date: 2022.04.19 18:54:18 +0100

Dra. Ana Karla Machado Wood
Rothamsted Research

Dr. Alexandre Augusto Nienow
Coordenador do PPGAgro

Dr. Eraldo Lourenso Zanella
Diretor da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo

DEDICATÓRIA

Dedico essa Tese à minha esposa Andressa Luísa Morás Roesler e para os nossos bens mais preciosos, nossa filha Louise Roesler e nosso filho Luiz Arthur Roesler.

Aos meus pais, Rosalvo Osvino Roesler e Reni Alice Schemmer Roesler, que me apoiaram, nunca deixaram de acreditar em mim e me deram suporte durante todos estes anos.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Andressa Luísa Morás Roesler, pelo amor, carinho, companheirismo, ajuda nos momentos difíceis e por ter nos dado os nossos bens mais preciosos, nossa filha Louise Roesler e nosso filho Luiz Arthur Roesler.

Aos meus pais, Rosalvo Osvino Roesler e Reni Alice Schemmer Roesler, que me apoiaram, nunca deixaram de acreditar em mim e me deram suporte durante todos estes anos.

Aos familiares que estiveram presentes nessa trajetória apoiando.

À Dra. Elene Yamazaki Lau, pelos anos de ensinamento, amizade, apoio, comprometimento, atenção, paciência, parceria e tempo dedicado a mim.

À minha orientadora professora Carolina Cardoso Deuner, pela orientação e pelo conhecimento transmitido.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo pelos ensinamentos através das disciplinas cursadas durante o doutorado.

Aos colegas da Universidade de Passo Fundo, em especial aos que também realizavam seu trabalho de pesquisa na Embrapa Trigo, Jessica Ferreira Rosset, Patrícia Frizon, Cleiton Korceski, Monica Bossardi Coelho, Camila Vancini, Natalia Weber e aos demais colegas do programa de pós-graduação em Agronomia.

Aos funcionários da Embrapa Trigo, em especial aos do Laboratório de Biotecnologia, Cultura de tecidos e Transformação Genética, Andréa Morás, Lucimere de Fátima Morelo e demais funcionários da biotecnologia Jordalan Muniz, Valdirene,

Tatiane Crespi, Sandro Pires pela ajuda durante esses três anos, os quais auxiliaram no estabelecimento e condução dos experimentos.

Aos estagiários que passaram durante a trajetória do doutorado, Natália Balbinot, Marcos Dhein, Gizele Rogalski, Renata Gabriela Schroeder, Júlia Britto, Paola Bueno, que contribuindo com essa e demais pesquisas realizadas.

Aos amigos, que mesmo não estando presente, me apoiaram e incentivaram.

À Universidade de Passo Fundo e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, ao Conselho de Pesquisa em Biotecnologia e Ciências biológicas (BBSRC) do Reino Unido pelo financiamento do trabalho através de bolsas bilaterais BBSRC – Embrapa (22.15.07.003.00.00 e BB / N018095 / 1, respectivamente).

"A educação tem raízes amargas, mas os seus frutos são doces."

(Aristóteles)

RESUMO

ROESLER, Eduardo André. Construções gênicas para o silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro em arabidopsis e trigo para o controle de giberela. [154] f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2021.

A giberela causada pelo fungo ascomiceto *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch, forma assexuada *Fusarium graminearum* Schwabe se destaca como importante doença do trigo, por reduzir a produtividade e qualidade dos grãos, além de causar contaminação por micotoxinas. As estratégias de controle disponíveis, tais como a resistência genética, os controles químicos e culturais são insuficientes para conter epidemias nos anos em que as condições ambientais são favoráveis à infecção. Considerando esses fatores, é necessário buscar novas estratégias para o controle desta doença. A tecnologia de Silenciamento Gênico Induzido pelo Hospedeiro (*Host Induced Gene Silencing*, HIGS), é baseada em RNA de interferência (RNAi) e, no caso de plantas, visa ao silenciamento de genes importantes para o crescimento, desenvolvimento ou patogenicidade dos patógenos. Esta estratégia pode ser utilizada no controle de fungos fitopatogênicos, e já foi demonstrado o aumento na resistência a *F. graminearum* em trigo e cevada. O objetivo geral foi verificar a capacidade de construções gênicas de RNAi para HIGS de genes alvo importantes para a patogenicidade ou virulência no controle de *F. graminearum*, e objetivos específicos: i) Avaliar o potencial das construções gênicas múltiplas RNAi-Chs3b, RNAi-Cyp51-Tri em arabidopsis e trigo e a construção gênica RNAi-Synchit2, com parte de gene quitina sintase de *Fusarium verticillioides*, em arabidopsis e ii) Avaliar o potencial das construções gênicas únicas de RNAi (*Lae1*, *Hog1*, *Snf1*, *Sid1*, *Top1* e *Fgl1* em arabidopsis para HIGS de *F. graminearum*. Visando ao silenciamento dos genes correspondentes nos fungos, plantas de arabidopsis foram transformadas com *Agrobacterium tumefaciens* contendo estas construções gênicas. A seleção e avanço de gerações de plantas transgênicas foram feitos, a segregação dos transgenes foi verificada e correlacionada com o número de inserções, e a resposta a *F. graminearum* foi verificada via inoculação em folhas destacadas e inflorescências. Em trigo, espigas de linhagens transgênicas nas gerações T2 e T3 contendo as construções gênicas RNAi-Chs3b e RNAi-Cyp51-Tri foram inoculadas com *F. graminearum* e avaliadas quanto à severidade, quantidade de grãos giberelados, níveis de DON e expressão relativa dos genes alvo no patógeno. Linhagens de arabidopsis contendo as construções gênicas RNAi-Chs3b, -Cyp51-Tri e -Synchit2 não apresentaram diferença quanto à severidade em folhas destacadas e inflorescências, duas linhagens transgênicas contendo a construção RNAi-Cyp51-Tri apresentaram redução nos níveis de deoxinivalenol (DON). As linhagens transgênicas de trigo BRS Guamirim contendo as construções gênicas RNAi-Chs3b e RNAi-Cyp51-Tri não apresentaram reduções significativas quanto a severidade, AACPD, porcentagem de grão giberelados e peso de grãos. Uma linhagem de trigo com RNAi-Cyp51-Tri apresentou redução no nível de DON. Não foi detectada a redução na expressão dos genes *Chs3b*, *Cyp51A*, *Cyp51B* e *Tri5* em *F. graminearum* expostos às linhagens transgênicas de trigo. Em linhagens transgênicas de arabidopsis tendo como alvo para HIGS os genes *Lae1*, *Hog1*, *Snf1*, *Sid1* e *Top1* de *F. graminearum*, apresentaram resposta não significativa quanto a severidade da doença em folhas destacadas. Estudos adicionais são necessários no intuito de verificar se os siRNAs estão sendo produzidos nestas plantas ou no fungo, analisar os níveis de expressão dos genes alvo ainda não verificados, além de testar o silenciamento em mais eventos, novas sequências e genes alvo. Palavras-chave: 1. *Fusarium graminearum*. 2. RNA de interferência. 3. Silenciamento gênico. 4. *Arabidopsis thaliana*. 5. *Triticum aestivum*.

ABSTRACT

ROESLER, Eduardo André. Gene constructions for host-induced gene silencing in arabidopsis and wheat for Fusarium Head Blight control. [154] f. Thesis (Doctorate in Agronomy) – University of Passo Fundo, Passo Fundo, 2021.

Fusarium Head Blight caused by the ascomycetous fungus *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch, asexual form *Fusarium graminearum* Schwabe stands out as an important wheat disease, for reducing the productivity and quality of grains, in addition to causing contamination by mycotoxins. The available control strategies, such as genetic resistance, chemical and cultural controls, are insufficient to contain epidemics in years when environmental conditions are favorable to infection. Certain factors, it is necessary to seek new strategies for the control of this disease. The Host Induced Gene Silencing (HIGS) technology, which is based on interference RNA (RNAi) and, in the case of plants, aims at silencing important genes for the growth, development or pathogenicity of pathogens. This strategy can be used to control phytopathogenic fungi, and an increase in resistance to *F. graminearum* in wheat and barley has already been developed. The major objective was to verify the ability of RNAi gene constructs for HIGS of target genes important for pathogenicity or virulence without *F. graminearum* control, and the specific objectives i) To evaluate the potential of multiple RNAi-Chs3b, RNAi-Cyp51-Tri multiple gene constructs in arabidopsis and wheat and the RNAi-Synchit2 gene construct, with part of the *Fusarium verticillioides* Chitin synthase gene, in arabidopsis and ii) Evaluate the potential of the unique RNAi gene constructs (RNAi-Lae1, -Hog1, -Snf1, -Sid1, -Top1 and -Fgl1 in arabidopsis for *F. graminearum* HIGS aiming at silencing the corresponding genes in the fungus. Arabidopsis plants were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* containing these gene constructs, correlated with the number of insertions, and the response to *F. graminearum* was verified via inoculation in detached leaves and inflorescences. In wheat, spikes of transgenic lines in the T2 and T3 generations containing the RNAi-Chs3b and RNAi-Cyp51-Tri gene constructs were inoculated with *F. graminearum* and evaluated for severity, Fusarium-damaged kernels, DON levels and relative expression of target genes from the pathogen. Lines of arabidopsis containing the RNAi-Chs3b, -Cyp51-Tri and -Synchit2 gene constructs did not show difference in severity in detached leaves and inflorescences, two transgenic RNAi-Cyp51-Tri lines show reduction in deoxynivalenol (DON) levels. The transgenic BRS Guamirim wheat lines containing the RNAi-Chs3b and RNAi-Cyp51-Tri gene constructions showed no reductions related to severity, AACPD, Fusarium-damaged kernels and grain weight. A wheat line with RNAi-Cyp51-Tri showed a reduction in DON level. No reduction in the expression of the *Chs3b*, *Cyp51A*, *Cyp51B* and *Tri5* genes was detected in *F. graminearum* exposed to transgenic wheat lines. In transgenic lines of arabidopsis targeting the genes *Lae1*, *Hog1*, *Snf1*, *Sid1* and *Top1* of *F. graminearum* for HIGS, dissipated response regarding the severity of the disease in detached leaves. Additional studies are added in order to verify whether siRNAs are being found in plants or in the fungus, analyzing the expression levels of target genes not yet verified, in addition to testing silencing in more events, new sequences and target genes.

Key words: 1. *Fusarium graminearum* 2. Interference RNA. 3. Gene silencing. 4. *Arabidopsis thaliana* 5. *Triticum aestivum*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	Cultura do trigo	17
2.2	Giberela	18
2.2.1	Importância	18
2.2.2	Patógeno	19
2.2.3	Sintomas e sinais	19
2.2.4	Ciclo de vida	20
2.3	Tipos de resistência à giberela	21
2.4	Estratégias de controle	22
2.5	RNA de interferência e silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro	23
2.6	Genes que codificam para fatores de patogenicidade e virulência como candidatos para HIGS de <i>F. graminearum</i>	28
3	CAPÍTULO I	35
3.1	Resumo	35
3.2	Introdução	35
3.3	Material e Métodos	38
3.3.1	Local de realização dos experimentos com linhagens transgênicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
3.3.2	Construções gênicas para HIGS em <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
3.3.3	Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	42
3.3.4	Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
3.3.5	Análise de segregação e avanço de geração de <i>Arabidopsis</i>	49
3.3.6	Inoculação de <i>Fusarium graminearum</i> em folhas destacadas de <i>Arabidopsis</i>	50
3.3.7	Inoculação de <i>Fusarium graminearum</i> em inflorescências de <i>Arabidopsis</i>	51
3.3.8	Quantificação de desoxinivalenol em inflorescências de <i>Arabidopsis</i>	52
3.3.9	Experimentos realizados com linhagens transgênicas de trigo	53
3.3.10	Seleção de linhagens de trigo contendo as construções RNAi-Chs3b e RNAi-Cyp51-Tri	53
3.3.11	Condução das plantas de trigo	55
3.3.12	Extração de DNA e confirmação de plantas transgênicas de trigo	55

3.3.13 Fenotipagem de genótipos de trigo transgênicos	56
3.3.14 Avaliações em genótipos de trigo	57
3.3.15 Expressão gênica em <i>Fusarium graminearum</i> inoculado em linhagens transgênicas de trigo contendo as construções RNAi-Chs3b e RNAi-Cyp51-Tri	58
3.3.16 Análise dos dados provenientes dos ensaios de inoculação em trigo	61
3.4 Resultados	61
3.4.1 Construção gênica RNAi-Cyp51-Tri em arabidopsis	61
3.4.2 Construção gênica RNAi-Chs3b em arabidopsis	69
3.4.3 Construção gênica RNAi-Synchit2 em arabidopsis	74
3.4.4 Trigo BRS Guamirim transgênico contendo as construções gênicas RNAi-Cyp51-Tri e RNAi-Chs3b	79
3.4.5 Resultados dos genótipos transgênicos de trigo inoculados com <i>Fusarium graminearum</i> isolado CM3066	80
3.4.6 Análise de micotoxinas em genótipos de trigo inoculados com <i>Fusarium graminearum</i> isolado CML3066	86
3.4.7 Análise de expressão dos genes <i>Chs3b</i> , <i>Cyp51A</i> , <i>Cyp51B</i> , <i>Cyp51C</i> , <i>Tri5</i> e <i>Tri6</i> em <i>Fusarium graminearum</i> isolado CML3066 inoculado em linhagens transgênicas de trigo	87
3.5 Discussão	91
3.6 Conclusão	101
4 CAPÍTULO II	102
4.1 Resumo	102
4.2 Introdução	102
4.3 Material e Métodos	107
4.3.1 Local de realização dos experimentos	107
4.3.2 Construções gênicas HIGS	107
4.3.3 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	110
4.3.4 Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i>	111
4.3.5 Seleção de sementes expressando o gene DsRed	112
4.3.6 Confirmação de plantas transgênicas via PCR	112
4.3.7 Análise de segregação e avanço de geração	112
4.3.8 Inoculação com discos de <i>F. graminearum</i> em folhas destacadas de arabidopsis	113
4.4 Resultados	113
4.5 Discussão	122
4.6 Conclusão	130
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	131
6 CONCLUSÃO GERAL	133
REFERÊNCIAS	134
ANEXOS	150

<i>Anexo I</i> - Imagem da eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR a partir do DNA de linhagens de trigo HIGS contendo as construções gênicas RNAi-Chs3b e RNAi-Cyp51-Tri. Passo Fundo - RS, 2020	151
<i>Anexo II</i> - Alinhamento da sequência parcial de <i>Fusarium verticillioides</i> com a sequência de genes que codificam para quitina sintase em <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Fusarium graminearum</i> . Passo Fundo - RS, 2021	153

1 INTRODUÇÃO

As doenças estão entre as principais causas da perda de produtividade da cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.), cujos danos são significativos e podem levar à perda total, caso as condições forem favoráveis ao desenvolvimento dos patógenos. A giberela do trigo causada pelo fungo ascomiceto *Fusarium graminearum*, é considerada uma das mais importantes da cultura. A giberela é uma doença que tem o potencial de reduzir a rentabilidade em toda a cadeia produtiva, afetando assim a qualidade de vida e a economia regional. Uma consequência importante dessa doença é a contaminação dos grãos por micotoxinas do tipo tricotecenos, como o deoxinivalenol (DON), que representa um risco à saúde humana e animal.

No Brasil, Reino Unido, União Européia, Estados Unidos, China e África, graves epidemias de giberela ocorrem em períodos de três a quatro anos, resultando em perdas quantitativas e qualitativas. A giberela é particularmente importante para o trigo no Sul do Brasil, onde se encontra 90% das áreas cultivadas com esta cultura, devido à maior probabilidade de ocorrência das condições ambientais favoráveis à doença. Estas condições caracterizam-se por períodos prolongados de chuva e temperaturas entre 20 e 25°C coincidindo com a fase de antese da cultura, como ocorreu em 2009 e 2014. Nestes anos, toda a região de cultivo de trigo do Sul do Brasil foi acometida pela giberela, o que acarretou níveis elevados de micotoxinas em grãos de trigo impedindo a sua utilização como alimento ou ração.

Os fungicidas utilizados apresentam modesta eficiência, as práticas de manejo cultural, como a rotação de culturas, escalonamento de época de semeadura, não são eficientes de maneira isolada para reduzir os níveis de inóculo. O problema se agrava ainda mais devido a inexistência de cultivares de trigo resistentes à giberela que suportem os níveis de infecção em anos epidêmicos. Assim, é urgente a necessidade de desenvolver

novas e efetivas opções para solucionar esse problema, como a utilização da engenharia genética.

A engenharia genética é uma importante ferramenta que pode ser utilizada em programas de melhoramento de plantas, contribuindo assim para o aumento da variabilidade genética pela inserção de genes que estão indisponíveis para determinada cultura. Uma recente e importante ferramenta de engenharia genética é o RNA de interferência (RNAi), processo biológico conservado em muitos eucariotos, onde RNA de fita dupla (do inglês *double strand* RNA, dsRNA) são clivados por endonucleases do tipo DICER, originando pequenos RNA de interferência (do inglês *small interfering* RNA, siRNA), geralmente de 20 a 30 nucleotídeos, os quais se associam a complexos ribonucleoproteicos RISC (do inglês, *RNA-induced silencing complex*). O siRNA associado ao complexo RISC se liga a transcritos de mRNA complementares por pareamento de bases, funcionando como guia para a degradação de RNA mensageiro (mRNA), impedindo a tradução proteica e provocando o silenciamento de genes a nível pós-transcricional.

Nesse sentido, pode-se gerar plantas transgênicas que venham a produzir dsRNA que, por consequência, induzam o silenciamento de transcritos de genes alvo do patógeno durante a infecção podendo impedir/minimizar o desenvolvimento da doença. Esse fenômeno é denominado de silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro (do inglês *Host Induced Gene silencing*, HIGS), o qual vem sendo fortemente estudado na última década. Tendo em vista a importância da triticultura em nível mundial e da dificuldade em que se tem em combater o patógeno causador da giberela com as ferramentas disponíveis até o momento, HIGS tem potencial de ser uma alternativa viável. Entre outros fatores, a aplicação da estratégia requer a identificação de genes-alvo dentro de uma ampla gama de candidatos. Como a eficiência da produção de plantas transgênicas de trigo é baixa e o custo é alto, a espécie modelo *Arabidopsis thaliana* pode ser utilizada para indicar as construções gênicas mais promissoras a serem testadas em trigo.

O presente trabalho teve como objetivo geral verificar a capacidade de construções gênicas de RNAi para HIGS de genes alvo importantes para a patogenicidade ou

virulência no controle de *F. graminearum*, e objetivos específicos i) Avaliar o potencial das construções gênicas múltiplas RNAi-Chs3b e RNAi-Cyp51-Tri em arabidopsis e trigo e a construção gênica RNAi-Synchit2, com parte de gene quitina sintase de *Fusarium verticillioides*, em arabidopsis e ii) Avaliar o potencial das construções gênicas únicas de RNAi (Lae1, Hog1, Snf1, Sid1, Top1 e Fgl1 em arabidopsis para HIGS de *F. graminearum*.

Este documento é composto, além desta introdução, por uma breve revisão de literatura, onde são abordados os principais aspectos relacionados à giberela do trigo e aspectos relacionados a HIGS como estratégia empregada para se obter resistência à *Fusarium graminearum*. Em seguida, são apresentados em dois capítulos, as atividades de pesquisa desenvolvidas. No capítulo I, é apresentada a avaliação de duas construções gênicas múltiplas (RNAi-Cyp51-Tri e RNAi-Chs3b) em arabidopsis e trigo, e a construção gênica RNAi-Synchit2 em arabidopsis, visando o silenciamento de genes importantes de *Fusarium graminearum*. No capítulo II, seis construções gênicas simples foram avaliadas em arabidopsis quanto ao seu potencial para o controle de giberela. Por fim, são apresentadas as Considerações Finais e a Conclusão Geral da tese.

Esse projeto é parte do projeto colaborativo Embrapa – BBSRC “Uso de previsão do risco de doença, tecnologias NGS e HIGS para explorar e controlar a giberela em lavouras de trigo”, que foi concebido por cientistas da Embrapa Trigo, Soja, Recursos Genéticos e Biotecnologia, além da participação da Universidade Federal de Viçosa, Universidade Estadual de Londrina e Universidade de Passo Fundo, no Brasil, e o instituição Rothamsted Research, no Reino Unido. As atividades desenvolvidas nesse trabalho são referentes ao Plano de Trabalho 3: Avaliação de sequências gênicas alvo para HIGS em arabidopsis e trigo.

Apoio: Projeto SEG 02.15.07.003.00.00 “Bilateral BBSRC Embrapa - Uso de previsão do risco de doença, tecnologias NGS e HIGS para explorar e controlar a giberela em lavouras de trigo”; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2 REVISÃO DA LITERATURA

O trigo está entre as plantas mais cultivadas no mundo pela sua importância na alimentação humana e animal. No entanto, sua produtividade é limitada, por diversos patógenos que acometem a cultura sendo que um dos principais é o *F. graminearum*. Neste sentido, nesta revisão serão abordados aspectos relevantes em relação a esse patógeno, estratégias de controle convencional e, por fim, a engenharia genética como alternativa para solucionar esse problema.

2.1 Cultura do trigo

As espécies do gênero *Triticum* apresentam diferentes níveis de ploidia, sendo diploides ($2n=2x=14$), tetraploides ($2n=4x=28$) e hexaploide ($2n=6x=48$), com número básico cromossômico igual a sete. O *Triticum aestivum* é uma espécie hexaploide que possui três genomas conhecidos como A, B e D (GUPTA et al., 2008). Esse cereal que pode ser utilizado na elaboração de diversos produtos alimentícios, como pães, bolos, biscoitos e massas, razão por que seu consumo é incentivado (SCHEUER et al., 2011).

O trigo é uma importante cultura para a alimentação humana e animal, e é cultivado nos cinco continentes em locais onde há condições favoráveis para seu desenvolvimento. Conforme dados divulgados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2021), na safra de 2020/2021, a produção mundial de trigo foi de 773,66 milhões de toneladas, sendo o segundo cereal mais produzido. O maior produtor de trigo é a China com 133,59 milhões de toneladas, seguido da Índia com 103,6 milhões, safra 2019/20 (USDA, 2021). No Brasil, foram produzidos apenas 6,234 milhões de toneladas no ano de 2020 (CONAB, 2021). Essa produção é concentrada principalmente na Região Sul, sendo que o Paraná e Rio Grande do Sul representam cerca de 85% da produção brasileira.

A demanda pelo produto faz do Brasil o quinto maior importador visto que a produção não consegue suprir a demanda interna que, em 2020 foi de 13,21 milhões de toneladas (CONAB, 2021). A importação no ano de 2020 foi de 6,7 milhões de toneladas. Ficando atrás de países como o Egito, Turquia, Indonésia e Algéria que são os quatro maiores importadores do cereal (USDA, 2021).

2.2 Giberela

2.2.1 Importância

As doenças estão entre as principais causas da perda de produtividade da cultura do trigo no Brasil e no mundo, cujos danos são significativos e podem levar a perda total, caso as condições sejam favoráveis ao desenvolvimento dos patógenos. A giberela é considerada, dentre as doenças, uma das mais importantes em todo o mundo. A doença é altamente destrutiva, causando reduções na produtividade e qualidade. (DWEBA et al., 2017). Ela causa diversos danos às culturas do trigo, cevada e demais culturas de interesse agrônomo, dentre esses, pode-se citar principalmente a redução na produção e qualidade da semente. Outra consequência é a contaminação dos grãos por micotoxinas que são do tipo tricotecenos e representam um risco a segurança alimentar por serem tóxicas a saúde humana e animal quando ingeridas (DARWISH et al., 2014).

A ocorrência de giberela tem aumentado no passar dos anos, atingindo níveis epidêmicos em vários países. Causa prejuízos em todas as regiões do mundo onde se cultivam trigo e milho e as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento da doença. Na região Sul da América do Sul, assim como na região sul do Brasil, é considerada problema. No Brasil nos anos de 1957, 1975 e 1982, causou prejuízos esporádicos. Já nos anos de 1997, 1998, 2000 e 2002, com elevada precipitação pluvial, epidemias foram problema preocupante nas safras de trigo no Sul do Brasil (LIMA, 2004).

A ocorrência e intensidade da giberela são dependentes das condições climáticas durante o período de suscetibilidade que ocorre no espigamento, início da floração ao

início da maturação (LIMA, 2004). Em regiões onde o clima favorece o patógeno, com longos períodos de chuva (acima de 72 horas), a doença é frequente. Para que ocorra infecção são necessárias 30 horas de molhamento contínuo com temperatura média de 20 °C (REIS; CASA, 2005). Os riscos de ocorrência de epidemias aumentam quando se tem umidade relativa acima de 70% (DWEBA et al., 2017). Assim, na região Sul do Brasil, a cultura do trigo é bastante propensa à ocorrência de giberela visto que as características climáticas dessa região em determinados anos favorecem o patógeno, devido à prolongados períodos de chuva aliados a temperaturas elevadas que coincidem com a antese da cultura.

2.2.2 Patógeno

O principal patógeno associado à giberela do trigo no Brasil e no mundo é o fungo *Gibberella zeae* (Schw.) Petch (anamorfo = *Fusarium graminearum* Schwabe) (BOTTALICO; PERRONE, 2002). *G. zeae* pertence à divisão Amastigomycota, classe dos Ascomycetes, subclasse dos Pirenomyces, ordem Hypocreales e família Nectriaceae. Enquanto que *F. graminearum* pertence à divisão Amastigomycota, classe dos Deuteromicetes, ordem Moniliales e família Tuberculariaceae (ALEXOPOLUS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

2.2.3 Sintomas e sinais

Após a infecção na planta, o fungo propaga-se através da ráquis, sendo a ocorrência dos primeiros sintomas entre três e quatro dias. As espiguetas afetadas exibem branqueamento à medida que o patógeno cresce e se dissemina no interior da espiga. Ainda, as aristas de espiguetas infectadas acabam por desviar do sentido normal, já em genótipos de trigo com espiguetas sem aristas, a giberela é caracterizada pela descolaração das espiguetas (LIMA, 2004). No campo, quando as condições ambientais são favoráveis, o primeiro sintoma característico da giberela em trigo é o aparecimento de manchas marrons cobertas de água na base ou no meio da gluma ou na ráquis. Esses

sintomas iniciam na metade da espiga, onde as flores começam a abrir (BUSHNELL et al., 2003).

Quando realizado ensaios de infecção artificial, os micélios do fungo se espalham através da espiga após a inoculação, primeiramente abaixo do nó da ráquis e em seguida para cima e para baixo na ráquis até os sintomas ficarem evidentes por toda espiga (BROWN, 2011). O fungo rapidamente se prolifera e difunde intracelularmente, em seguida aparecem os sintomas, as espiguetas infectadas exibem anasarca, tornando-se despigmentadas, esbranquiçadas ou cor de palha, o que posteriormente resulta em sementes enrugadas, observa-se que os grãos infectados se tornam descoloridos, com coloração esbranquiçada (DWEBBA et al., 2017; REIS; CASA, 2007). Os grãos que apresentam sintomas característicos de giberela apresentam-se chochos, enrugados de coloração branco-rosada a pardo-clara, ásperos e róseos (PARRY; JENKINSON; MCLEOD, 1995; REIS; CASA, 2007).

Estruturas do patógeno (sinais) são facilmente visualizados a olho nu. Agregações de esporos de coloração salmão no ráquis e nas glumas das espiguetas podem surgir em decorrência da produção de macroconídios de *F. graminearum*. Ainda, podem ser observados estruturas sexuais conhecidas como peritécios de *G. zea*. Em espigas secas, sobre a superfície das espiguetas afetadas podem ser observadas pontuações escuras, os peritécios (PARRY; JENKINSON; MCLEOD, 1995, LIMA, 2004).

2.2.4 Ciclo de vida

A sobrevivência de *G. zea* ocorre de forma saprofítica tanto em resíduos vegetais de plantas hospedeiras como plantas não hospedeiras. Sobre os resíduos o fungo produz esporos assexuais, os macroconídios, que são liberados e dispersos pelo vento e chuva, assim sendo levados ao dossel da cultura. Em condições favoráveis de molhamento, peritécios são formados sobre os resíduos liberando os ascósporos, esporos sexuais do fungo. O principal inóculo ou inóculo primário é constituído pelos ascósporos provenientes dos de peritécios que são pequenos corpos arredondados, pretos e azulados, formados nos tecidos senecidos de trigo, inúmeras gramíneas e de soja, que são

transportados pelo vento a longas distâncias, atingindo sítios de infecção, constituídos pelas anteras do trigo (REIS; CASA, 2005).

Quando os ascósporos entram em contato com as espigas, e as condições são favoráveis, alta umidade e temperatura entre 20 °C e 30 °C, os esporos germinam e infectam as espiguetas (WEGULO, 2012). O período de suscetibilidade do trigo ocorre entre o início da floração e o início da maturação. Para que ocorra a infecção, são requeridas 30 horas de molhamento contínuo com temperatura média de 20 °C ou molhamento de 36 horas e temperatura média de 25 °C (REIS; CASA, 2005).

No ciclo assexual *F. graminearum* produz macroconídios que são esporos em repouso de parede espessa. Os clamidósporos permitem que *F. graminearum* sobreviva a condições desfavoráveis, permitindo a hibernação tanto no solo como em resíduos culturais até que haja umidade e temperatura adequadas para iniciar um novo ciclo de infecções. Os macroconídios podem ser transportados do solo para espigas pela água e vento o qual desempenha papel predominante na dispersão do patógeno. (SEONG et al., 2008).

2.3 Tipos de resistência à giberela

Com base na resposta do hospedeiro à infecção pelo patógeno, há cinco tipos descritos de resistência à giberela. As duas primeiras foram relatadas como resistência à penetração inicial do patógeno ou tipo I e resistência à extensão dos sintomas dentro da espiga ou tipo II (SCHROEDER; CHRISTENSEN, 1963). Posteriormente, foram descritos tipos adicionais de resistência: tipo III – resistência dos grãos à infecção, tipo IV – tolerância ou habilidade em manter a produção independente da presença da doença e tipo V – resistência às toxinas (MILLER; ARNISON, 1986), podendo ser tanto a habilidade do hospedeiro em degradar as toxinas produzidas pelo patógeno ou a planta ser insensível ao acúmulo de toxinas nos tecidos.

Na resistência tipo II, quando as espiguetas são inoculadas, não ocorre a propagação do fungo para as espiguetas vizinhas. Já em genótipos suscetíveis, ocorre a rápida difusão do fungo, fazendo com que a espiga inteira fique esbranquiçada. Na

resistência tipo I, observa-se que as espigas de plantas com essa resistência apresentam apenas poucas espigas infectadas, enquanto no genótipo suscetível é possível verificar diversas espiguetas independentes infectadas na espiga (BAI et al., 2018).

2.4 Estratégias de controle

O manejo efetivo da giberela não pode ser alcançado com apenas uma técnica devido às suas limitações. É necessária a utilização de diferentes estratégias conjuntas, como controle cultural e químico, que proporcionam resultados mais efetivos (MCMULLEN et al., 2012). O controle químico, pelo uso de fungicidas, é o método mais empregado no controle de *Fusarium* nos cultivos atuais. No entanto, não proporciona um controle total, devido a vários fatores como o genótipo, clima, produto, dose, tecnologia de aplicação entre outros (DWEBA et al., 2017) além de possuir uma pequena janela de utilização, sendo ideal aplicar de forma preventiva e no momento de máxima extrusão das anteras, entre 20 a 50% do florescimento do trigo. O aumento do uso de fungicidas para o manejo da giberela no trigo resulta em preocupações quanto à resistência aos mesmos (MACHADO et al., 2017b; MACHADO et al., 2017c).

O problema se agrava ainda mais pelo fato de a resistência genética a giberela disponível ser poligênica e por ser altamente influenciada pelo ambiente (BAI; SHANER, 1994). Ainda, não se tem resistência genética qualitativa (genes R) eficientes contra o patógeno, apenas loco de caráter quantitativo (QTLs), que são de pequeno efeito a intermediário (LIU et al., 2009b). São descritos mais de 250 QTLs cobrindo 21 cromossomos de trigo (LIU et al., 2009b). O principal deles é o *Fhb1* do genótipo chinês Sumai3, e vem sendo usado em programas de melhoramento (LV et al., 2014). Há ainda relatos da utilização de *Fhb2* (LU et al., 2010) e *Fhb7* (GUO et al., 2015). Atualmente sabe-se que *Fhb1* codifica uma lectina responsável em conferir resistência. (RAWAT et al., 2016).

Cultivares de trigo suficientemente resistentes a *F. graminearum* ainda não foram obtidas, os fungicidas apresentam apenas uma modesta eficiência na proteção da cultura

do trigo e práticas de manejo cultural, como a rotação de culturas, não são eficientes para reduzir os níveis de inóculo (DWEBA et al., 2017; MACHADO et al., 2017b).

A ausência de cultivares com resistência completa, aliado à baixa eficiência dos fungicidas no controle da giberela, reforçam a necessidade da utilização de outras técnicas de controle do patógeno, ou seja, mesmo que se tenha avançado com o conhecimento sobre a giberela de maneira global, o manejo da doença ainda continua sendo um importante desafio. Nos últimos vinte anos a engenharia genética aprofundou os conhecimentos sobre RNA de interferência (RNAi), possibilitando a sua aplicação como estratégia no controle de pragas e patógenos através do hospedeiro, o que faz dessa uma alternativa interessante para utilização em plantas visando ao controle dos organismos que acometem as culturas de interesse.

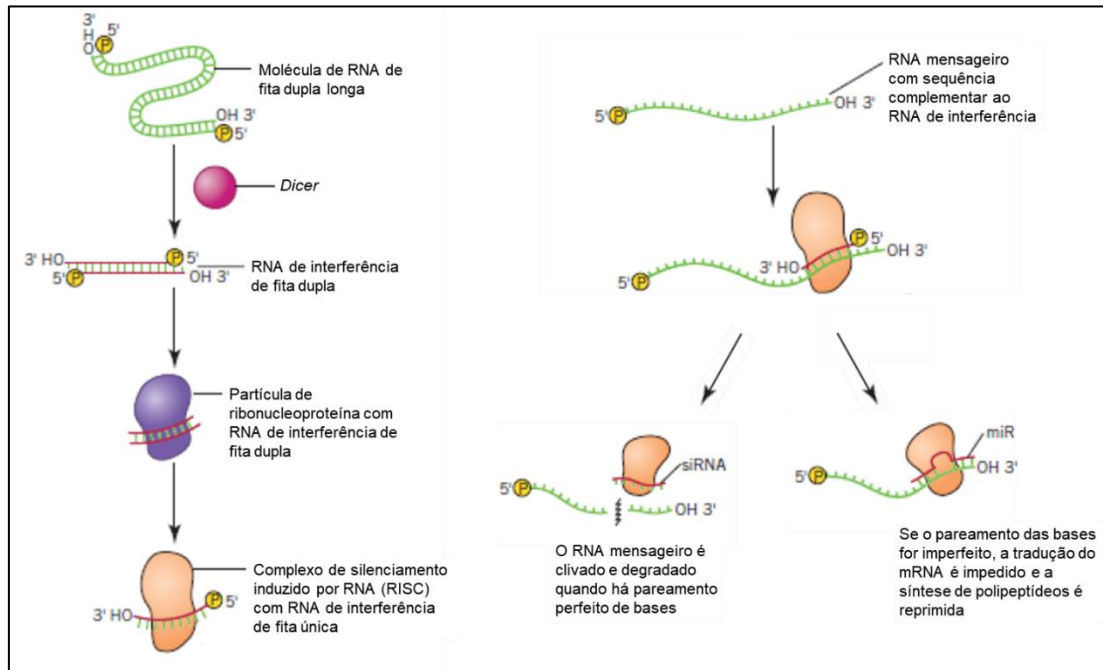
2.5 RNA de interferência e silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro

O RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo de regulação gênica conservado e presente em todos os eucariotos (KETTING, 2011). Em eucariotos, esse processo é denominado de silenciamento gênico pós-transcricional (VAUCHERET; BÉCLIN; FAGARD, 2001). A tecnologia de RNAi é uma ferramenta que tem permitido elucidar a função gênica assim como alterar a expressão de genes para obter características desejáveis (YOUNIS et al., 2014). É também uma ferramenta promissora que tem impacto diretamente na agricultura devido a regulação da expressão gênica ser de maneira precisa sem afetar a expressão de outros genes e já foi relatado em diversos trabalhos visando ao controle de pragas e patógenos (MAMTA; RAJAM, 2017; MOROZOV et al., 2019).

Nesse fenômeno, pequenas moléculas de RNA conhecidas como pequenos RNAs de interferência (do inglês, small interfering RNAs - siRNAs), que tem aproximadamente 21 a 28 pares de bases, são produzidas a partir de moléculas maiores de RNA de fita dupla pela ação da enzima RNase III Dicer (SNUSTAD; SIMMONS, 2017). Esses siRNA são incorporados ao complexo RISC (do inglês *RNA-induced silencing complex*, RISC), posteriormente são desenrolados, sendo que uma das fitas é eliminada. Assim, o RNA de

fita simples no complexo RISC interage de maneira específica com moléculas de RNA mensageiro através do pareamento de bases. Em seguida, o transcrito é clivado pela enzima argonauta (AGO) do complexo RISC. Com isso, ocorre o silenciamento da expressão deste gene específico, impedindo sua expressão ou, no caso de pareamento imperfeito das bases, ocorre o impedimento da tradução do mRNA e consequente síntese de polipeptídeos (Figura 1) (SNUSTAD; SIMMONS, 2017; MOROZOV et al., 2019).

Figura 1 - Representação dos processos do mecanismo RNA de interferência



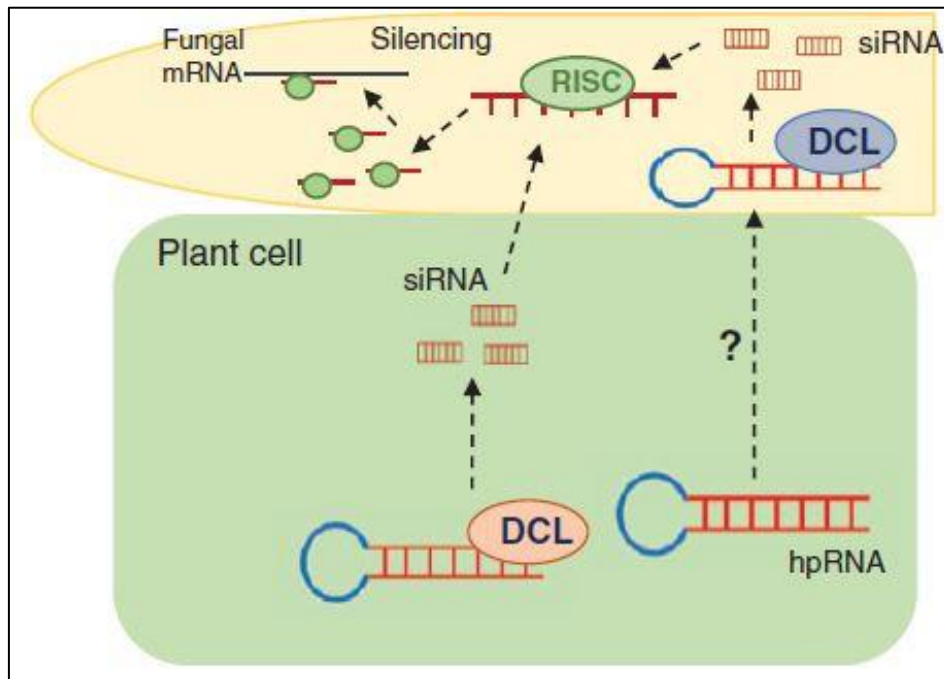
Fonte: Modificado de Snustad e Simmons (2017).

O siRNA pode ser transferido entre organismos de diferentes reinos taxonômicos, tal como entre plantas e patógenos eucariotos e pragas, e que pode resultar no silenciamento de genes do hospedeiro ou do patógeno (KNIP; CONSTANTIN; THORDAL-CHRISTENSEN, 2014; CHEN et al., 2016). Um exemplo da aplicação de RNAi é a tecnologia do silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro (*Host Induced Gene Silencing* – HIGS), onde a expressão de RNA de fita dupla (do inglês, double-stranded RNAs – dsRNAs) em plantas transgênicas pode induzir o silenciamento de transcritos de genes alvo do patógeno durante a infecção (YIN; HULBERT, 2015, MACHADO et al., 2017a).

Nessa tecnologia, são produzidas plantas transgênicas contendo construções gênicas que permitem a transcrição de RNA em forma de grampo (do inglês, hairpin RNA – hpRNA), formando um dsRNAs, com sequência complementar ao transcrito do gene alvo. A partir destes transgenes são produzidas moléculas de dsRNAs longos, que são processados pelas proteínas vegetais semelhantes a Dicer (do inglês, Dicer-like proteins - DCL) ou proteínas DCL que estão presentes no patógeno, sendo neste caso o fungo (LIU; FENG; ZHU, 2009). A planta modelo arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) contém quatro proteínas DCL parálogas, DCL1, DCL2, DCL3 e DCL4 das quais DCL2 e DCL4 geram siRNA de 22 a 24 nucleotídeos (BORGES; MARTIENSSEN, 2015).

Posteriormente, a fita de siRNA guia (complementar ao RNA mensageiro) (do inglês, messenger RNA – mRNA) liga-se à proteína Argonauta e a outras proteínas para formar o RISC. O siRNA/RISC liga-se à sequência complementar do mRNA alvo no fungo, resultando na degradação deste transcrito (Figura 2).

Figura 2 - Representação da possível via do silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro



Fonte: Machado et al. (2017).

Tem sido discutido se os siRNAs são formados no hospedeiro e transferidos para o patógeno ou se o dsRNA longo é transferido para o patógeno e a maquinaria de

silenciamento do patógeno produz os siRNAs (Figura 2) (MACHADO et al., 2017; MAJUMDAR; RAJASEKARAN; CARY, 2017). Recentemente foi demonstrado que pequenos RNAs originários de plantas são enviados para fungos por meio de vesículas extracelulares e são capazes de silenciar genes de virulência (CAI et al., 2018).

Desde a sua descoberta, há mais de 20 anos, o RNA interferência tem sido amplamente utilizado em plataformas de proteção de culturas. Até agora, as abordagens de RNAi têm convencionalmente baseadas no uso de plantas transgênicas que expressam dsRNAs contra alvos selecionados (DALAKOURAS et al., 2020). O primeiro uso de hpRNA para indução de silenciamento de gene endógeno e controle de viroses em plantas foi demonstrado por Smith et al. (2000).

Tinoco et al. (2010) relataram o trabalho pioneiro na resistência mediada por HIGS envolvendo fungos fitopatogênicos, demonstrado no patossistema tabaco x *Fusarium verticillioides*. Em outro trabalho, nos patossistemas cevada x oídio e trigo x oídio, o acúmulo de dsRNA ou RNA antisense na planta, foi capaz de silenciar transcritos fúngicos, e este fato afetou o desenvolvimento do fungo biotrófico *Blumeria graminis* (NOWARA et al., 2010). Em trigo, Chen et al., (2016) demonstraram que plantas expressando sequências antisense de genes alvo de *Fusarium culmorum* foram capazes de reduzir os níveis de transcritos no patógeno, e conseqüentemente ocorreu a redução dos sintomas da doença. Além disso, foram feitas outras tentativas de obter plantas transgênicas resistentes a fungos biotróficos como *Puccinia striiformis* em trigo (YIN; JURGENSON; HULBERT, 2011), *Puccinia triticina* também em trigo (PANWAR MCCALLUM; BAKKEREN, 2013), e *Bremia lactucae* em alface (GOVINDARAJULU et al., 2015).

Os diversos trabalhos realizados na tentativa de controlar doenças fúngicas via HIGS, geralmente têm sido relacionados com a inibição da doença pelo silenciamento de genes estruturais essenciais, como quitina e ergosterol; regulação do desenvolvimento; metabolismo primário e secundário e relacionados à patogenicidade (CHUNTAO; HULBERT, 2015). Nesse sentido, estudos realizados por Koch et al. (2013), demonstraram a efetividade da abordagem HIGS no patossistema cevada x *F. graminearum*, silenciando genes que codificam para citocromo P450 lanosterol C-14 α demetilase (CYP51), enzima chave no processo de produção de ergosterol, constituinte de membrana celular dos

fungos. Em outro patossistema (trigo x *F. graminearum*), Cheng et al. (2015) demonstraram a efetividade do silenciamento de genes de *Fusarium* relacionados à síntese de quitina. Este é componente estrutural da parede celular de fungos e não está presente em plantas e animais (LENARDON et al., 2010), o que o torna este um alvo de interesse. Em condições de campo, Cheng et al. (2015) demonstraram que HIGS é uma estratégia efetiva para aumentar a resistência de plantas de trigo.

Ainda são vários os desafios para a utilização dessa ferramenta nas culturas, tais como: a seleção de sequências alvo sem efeito em organismos não alvo (*off target*), obtenção de expressão estável, obtenção de protocolos eficientes de transformação, avaliação de aspectos relacionados à segurança e resistência do consumidor à tecnologia transgênica (MACHADO et al., 2017a). No entanto, como demonstrada nas pesquisas citadas, é uma tecnologia efetiva que permitiria diminuir os custos bem como a contaminação química pela utilização de defensivos agrícolas (CHEN et al., 2016; CHUNTAO; HULBERT, 2015; MACHADO et al., 2017a).

Genes candidatos a alvo para HIGS podem ser inferidos tanto por comparação com estudos prévios quanto com a identificação em estudos genômicos. Uma das limitações para confirmar a viabilidade do uso desses genes é a capacidade de estudos funcionais dos genes potenciais em grande escala. Uma barreira na aplicação direta de HIGS em trigo e demais cereais para estudos funcionais de genes candidatos a alvo é a transformação genética, sendo requisito primário o desenvolvimento de sistemas eficientes de transformação e regeneração, o que leva tempo e tem um custo elevado (KIM; HAGER, 2020).

Assim, o amplo conhecimento da biologia, das bases genéticas e moleculares de plantas modelo, associado à fácil manipulação e grande produção de sementes por autopolinização, motivaram estudos com *A. thaliana* acerca da interação patógeno-hospedeiro, das variações naturais da resistência à infecção e novas tecnologias para limitar a infecção de fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* (URBAN et al., 2002; CHEN et al., 2006; KOCH et al., 2013; NALAM et al., 2015). *A. thaliana* é uma planta modelo suscetível a *F. graminearum* (URBAN et al. 2002; CHEN et al. 2006) que pode

permitir a pré-seleção de vários genes-alvo de forma rápida. *A. thaliana* ecótipo Landsberg erecta 0 (Ler-0) foi considerado um acesso adequado para estudos de *F. graminearum* porque consistentemente apresentou infecção floral severa com respostas de baixa variabilidade (URBAN et al. 2002). Este ecótipo foi também considerado mais suscetível a *F. graminearum* do que *A. thaliana* (L.) ecótipo Columbia-0 (Col-0) usando folha e flor destacadas (CHEN et al. 2006). Tais trabalhos suportam que o uso de *A. thaliana* (Ler-0) pode ser adequado para auxiliar os estudos buscando a resistência à giberela em trigo e outros cereais através da estratégia HIGS.

2.6 Genes que codificam para fatores de patogenicidade e virulência como candidatos para HIGS de *F. graminearum*

A capacidade de um fungo de causar a doença é denominada patogenicidade e a capacidade de agravar a doença é denominada virulência. Os termos fatores de patogenicidade e fatores de virulência são livremente usados para se referir a qualquer substância que um patógeno usa para parasitar a planta. Esses fatores permitem que a planta cause doenças, bem como avance a infecção dentro do hospedeiro (RAUWANE et al., 2020).

Nas últimas décadas têm sido feitos estudos na tentativa de identificar genes fundamentais para sobrevivência de *F. graminearum*. Devido à relevância dos problemas causados por *F. graminearum*, extensos estudos têm sido feitos para identificar e entender seus fatores de patogenicidade e virulência (RAUWANE et al., 2020). Inúmeros genes são potenciais candidatos a alvo para HIGS de *F. graminearum*, e estes estão envolvidos diretamente em processos relacionados à sua sobrevivência como o metabolismo primário e secundário, desenvolvimento sexual, virulência e patogenicidade (CHUNTAO; HULBERT, 2015). Genes candidatos a alvo para HIGS podem ser inferidos tanto por comparação com estudos prévios em outros fungos quanto podem ser identificados em estudos funcionais. Alguns estudos envolvendo os potenciais genes alvo para HIGS utilizados neste trabalho serão abordados na sequência.

Um dos candidatos é o gene que codifica para a proteína LaeA (Loss of aflR-expression A) que faz parte do complexo Velvet, que consiste em no mínimo dez proteínas, e coordena a biossíntese de metabólitos secundários, o desenvolvimento morfológico em resposta a luz, assim como regula a reprodução de *F. graminearum* (BAYRAM et al., 2008; BAYRAM; BRAUS, 2012; KIM et al., 2013). Em *F. graminearum* e outros fungos, o metabolismo secundário é responsável pela produção de antibióticos, pigmentos, hormônios e principalmente micotoxinas (SIEBER et al., 2014). Kim et al. (2013) estudaram a função do gene *FgLaeA* em *F. graminearum*, que é homólogo ao gene *LaeA* de *Aspergillus nidulans* e codifica um regulador global tanto para o metabolismo secundário quanto para o desenvolvimento sexual. A deleção de *FgLaeA* na linhagem transgênica de *F. graminearum* expressando o gene de luciferase sob controle dos promotores de TRI6 e ZEB2 levou à redução da luminescência nas estirpes, assim como houve redução no acúmulo de micotoxinas. TRI6 e ZEB2 são fatores de transcrição que controlam a biossíntese de tricotecenos e zearalenona. A superexpressão deste gene levou ao aumento da produção de tricotecenos e outros metabólitos. Estes fatos indicam que *FgLaeA* controla a expressão destes fatores de transcrição em *F. graminearum*. Em trigo, linhagens de *F. graminearum* mutantes de perda de função para *FgLaeA* mostraram uma indução precoce na formação de corpos de frutificação (peritécios) e redução dos sintomas, indicando que *FgLaeA* controla negativamente a indução peritecial e controla positivamente a virulência (KIM et al., 2013).

Outros potenciais alvos fazem parte das vias de proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês, mitogen-activated protein kinase – MAPK), que estão envolvidas em diversos processos fisiológicos em respostas a estímulos ambientais pelos fungos como: resposta a estresse, virulência, sinalização celular, interação com outros organismos etc. (MARTÍNEZ-SOTO; RUIZ-HERRERA, 2017). Em *F. graminearum* não é exceção, sendo as proteínas quinases importantes em vários aspectos de crescimento, desenvolvimento e processos infecciosos (WANG et al., 2011). Uma destas vias MAPK é a do glicerol de alta osmolaridade (do inglês, high osmolarity glycerol – HOG), o gene *Hog1* (MAPK) é o principal componente desta via e está envolvido na

resposta ao estresse por hiperosmolaridade, síntese de glicerol e estresse oxidativo (PAREEK; RAJAM, 2017). Em alguns fungos fitopatogênicos *Hog1* mostra-se importante na patogenicidade por afetar a reprodução sexual, formação de apressório e penetração no tecido hospedeiro (ZHENG et al., 2012). RAMAMOORTHY et al. (2007), baseado em seus achados, propuseram que a cadeia de sinalização via MAPK é essencial para proteção de *F. graminearum* contra proteínas antimicrobianas produzidas por seu hospedeiro. Nesse estudo, os autores utilizaram defensinas antifúngicas que inibem o crescimento de *F. graminearum in vitro* para determinar a cadeia de sinalização modulada por elas. A caracterização molecular de mutantes de *F. graminearum* que exibiram resposta hipersensível às defensinas revelou que esta sensibilidade é regulada pelas quinases Mgv1 e Gpmk. Para verificar o envolvimento de Hog1 na cascata de sinalização em *F. graminearum* desafiado por defensinas, RAMAMOORTHY et al. (2007) nocautearam o gene *FgHog1* no isolado PH-1 de *F. graminearum*. Os resultados da inoculação do trigo cultivar Norm (suscetível) demonstraram que o mutante *FgHog1* foi capaz de colonizar apenas a espiguetta inoculada, raramente se espalhando para as adjacentes, indicando que este gene é necessário para a propagação, e é requerido para a completa patogenicidade de *F. graminearum* em trigo (RAMAMOORTHY et al., 2007).

Um grande avanço foi realizado por Wang et al., (2011), que caracterizaram mutantes para genes putativos de quinases quanto ao defeito no crescimento, formação de esporos, morfologia de colônias e conídios, germinação, respostas ao estresse, infecção na planta, produção de DON e reprodução sexual, e reafirmaram que as quinases são importantes para vários processos de desenvolvimento, infecção, virulência e patogenicidade em *F. graminearum*. Wang et al. (2011), identificaram 116 genes quinase putativos em *F. graminearum*, posteriormente foram gerados e caracterizados 96 mutantes para esses genes. Desses, 42 mutantes apresentaram significativa redução na virulência ou foram não patogênicos, 45 apresentaram defeitos na reprodução sexual. Antes deste estudo, eram conhecidos como sendo importantes na infecção de plantas por *F. graminearum* apenas três proteínas quinase (Mgv1, Gpmk e GzSnf1) (HOU et al., 2002; JENCZMIONKA et al., 2003; LEE et al., 2009; URBAN et al., 2003).

A habilidade dos fungos de sobreviver em muitos ambientes está ligada à sua capacidade de adquirir nutrientes essenciais. Por exemplo, para realizar os processos biológicos essenciais os eucariotos precisam de micronutrientes, incluindo o ferro (GREENSHIELDS et al., 2007). Sistemas altamente específicos para a aquisição de ferro foram desenvolvidos pelos fungos, como a produção e a absorção de sideróforos quelantes de ferro, importantes para certos patógenos bacterianos humanos, bem como para fungos fitopatogênicos, como *F. graminearum*, para adquirir ferro do hospedeiro (POWER et al., 2006). Greenshields et al. (2007), estudaram o redutor sideróforo SID1 e verificaram a sua importância na via de absorção de ferro e seu papel na virulência de *F. graminearum*. Nesse trabalho foram identificados cinco genes relacionados a absorção de ferro em *F. graminearum* com a expressão gênica induzida em resposta à limitação de ferro. Para estudar a contribuição relativa do sideróforo e vias de absorção de ferro foram criados mutantes de *F. graminearum* com perda de função dos genes *FET3* (ferroxidase) e *SID1* (sideróforo biossintético), os mutantes *sid1* não produziram sideróforos e apresentaram crescimento lento sob condições de baixo teor de ferro, enquanto mutantes *fet3*, apresentaram produção de sideróforo inalterado. Quando mutantes *fet3* e *sid1* foram inoculados em espiguetas de trigo, o primeiro mostrou-se igual ao tipo selvagem enquanto *sid1* apresentou infecção local, mas não se propagou para outras espiguetas.

Ainda, os processos celulares de transcrição, replicação e recombinação do DNA são básicos para os organismos eucariotos, incluindo *F. graminearum*. Nesses processos atuam diversas enzimas como as topoisomerases que relaxam o DNA superenovelado, permitindo que estes processos ocorram (WANG, 2002). Baldwin et al. (2010) estudaram o papel da topoisomerase 1 – Top1 em espécies de *Fusarium* e verificaram seu envolvimento na virulência e reprodução. Nesse estudo a mutação de deleção de *Top1* em *F. graminearum* e *Fusarium culmorum* causou grande redução de virulência em espigas de trigo inoculadas. A esporulação assexuada foi reduzida em mutantes de *F. graminearum* e foram ausentes em *F. culmorum*. Ainda, o mutante para o gene *Top1* de *F. graminearum* não desenvolveu esporos sexuais *in vitro* quando a produção de peritécio foi induzida. Esse foi o primeiro estudo demonstrando a importância da *Top1* na patogenicidade de espécies de *Fusarium* em plantas.

Os patógenos de plantas desenvolveram estratégias sofisticadas de penetração, infecção e colonização para suprimir os mecanismos de defesa das plantas de hospedeiros suscetíveis e causar doenças. Wanjiru, Zhensheng e Buchenauer (2002) mostram que a patogenicidade de *F. graminearum* é dependente das enzimas extracelulares secretadas. O fungo entra no hospedeiro através das paredes das células epidérmicas com a ajuda de hifas de infecção, levando à redução da celulose, pectina e xilano da planta hospedeira. Jenczmionka e Schäfer (2005) mostraram que a produção de pectinases, amilases, celulases, xilanases, proteases e lipases por *F. graminearum* aumenta sua penetração e proliferação na planta atacada.

As lipases são enzimas que hidrolisam as ligações dos ésteres carboxílicos dos triacilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol. As lipases secretadas por fungos patógenos de plantas estão envolvidas na penetração de fungos em barreiras vegetais, como ceras e cutículas (SUBRAMONI; SUÁREZ-MORENO; VENTURI, 2010). Esta lipase é sugerida como responsável pela geração de ácidos graxos livres poliinsaturados que suprimem a biossíntese de calose pela planta, para inibir a imunidade inata durante a infecção em espigas de trigo (BLÜMKE et al., 2014). O papel das lipases não está completamente elucidado, mas os resultados iniciais indicam que elas podem ser um alvo promissor para o controle de doenças fúngicas. Estudos têm mostrado que essas enzimas são fatores associados à virulência e patogenicidade em patógenos de plantas, incluindo *FgFgl1* que codifica para uma lipase em *F. graminearum* (VOIGT; SCHAFER; SALOMON, 2005). Mutantes de *Fgfgl1* tiveram a atividade lipolítica extracelular reduzida em cultura *in vitro* assim como houve redução da virulência em trigo e milho (VOIGT, SCHAFER E SALOMON, 2005). Posteriormente foi verificado que a lipase *Fgl1* é necessária, mas não é suficiente para restaurar a patogenicidade completa do mutante não patogênico *gpmk1* de *F. graminearum* (SALOMON et al. 2012), o que é condizente com a redução e não eliminação da virulência em mutantes *Fgfgl1*.

Os fungos biotróficos penetram no hospedeiro usando estruturas de penetração e desenvolvem uma grande rede de hifas dentro dos espaços intercelulares. Através das hifas, esses fungos absorvem os nutrientes das células vegetais vivas. Enquanto que os patógenos necrotróficos matam o tecido do hospedeiro e derivam nutrientes do tecido

morto. Já os hemibiotróficos adotam um estilo de vida necrotrófico após o biotrófico (RAUWANE et al., 2020). Como fungo hemibiotrófico, *F. graminearum* produz, entre outras substâncias, enzimas que degradam a parede celular (celuloses, hemiceluloses, xilanases e pectinases) e principalmente toxinas (WANJIRU; ZHENSHENG; BUCHENAUER, 2002; RAUWANE et al., 2020).

As defesas impostas pelas plantas requerem que o patógeno engaje um modo mais sofisticado, a produção dessas enzimas não é suficiente para supera-las. Posterior a liberação de enzimas, *F. graminearum* ataca plantas hospedeiras através da liberação de micotoxinas que incluem principalmente o tricoteceno DON (YAZAR; OMURTAG, 2008). Produto do metabolismo secundário, o deoxinivalenol (DON) é uma micotoxina do tipo tricoteceno, que é um grande grupo de micotoxinas que causam diferentes efeitos tóxicos e são associados com a inibição da síntese proteica ribossomal, ruptura da integridade da membrana, alteração no transporte de elétrons e conteúdo de clorofila nas plantas (DESJARDINS, 2006; AUDENAERT et al., 2013), o que leva a diversos efeitos nas plantas, incluindo inibição da germinação da semente, do crescimento de plântulas, de raízes, podendo ainda causar murcha, clorose, necrose em toda planta (MCCORMICK, 2003), que é uma morte celular programada.

No momento da penetração do fungo e crescimento dentro da planta, as proteases e micotoxinas de *Fusarium* atuam em uma forma coordenada durante a colonização, desempenhando papéis complementares durante a supressão da defesa pelo hospedeiro (AYUMI; MANICKAVELU, 2015). Embora não seja necessário para estabelecer a infecção local, o DON é essencial para o patógeno romper a barreira da espiga inicialmente infectada e disseminar-se para os tecidos adjacentes (JANSEN et al., 2005; LANGEVIN et al., 2004). Para Bai e Sharner (2004), DON atua mais como um fator de agressividade (virulência) do que como um determinante de patogenicidade do fungo. É sugerido que as espécies de *Fusarium* que causam doença estão correlacionadas com o acúmulo de tricoteceno no hospedeiro e, portanto, a agressividade reduzida pode ser observada tanto pela redução da produção de toxinas pelo patógeno quanto pela remoção ou degradação das toxinas pelo hospedeiro (FOROUD; EUDES, 2009).

F. graminearum produz diversas toxinas, a micotoxina primária produzida é o tricoteceno deoxinivalenol (DON), outras toxinas incluem a zearalenona (ZEA), nivalenol (NIV), 4-acetil nivalenol (4-NIV) e derivados de DON, 3-acetildeoxinivalenol (3-ADON) e 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON) (DESJARDINS; HOHN; MCCORMICK, 1993; TRALAMAZZA et al., 2016; RAUWANE et al., 2020).

Vários genes codificam proteínas envolvidas na biossíntese de tricotecenos (DWEBBA et al., 2017). Esses genes são agrupados no cluster TRI (de tricoteceno) que é um dos clusters gênicos relacionados a metabólitos secundários mais estudados em fungos (PROCTOR et al., 2018). O cluster é distribuído em quatro regiões genômicas, sendo que a principal se encontra no cromossomo 2 de *F. graminearum*, com 12 genes (MERHEJ; RICHARD-FORGET; BARREAU, 2011). Sete genes *Tri* (*TRI8*, *TRI7*, *TRI3*, *TRI4*, *TRI5*, *TRI11* e *TRI13*), codificam para enzimas que catalisam 10 reações da via biossintética dos tricotecenos (CARDOZA et al., 2011). Os genes *TRI4*, *TRI5*, *TRI6* e *TRI10* codificam fatores chave na via de biossíntese dessas micotoxinas (AYUMI; MANICKAVELU, 2015). *TRI5* desempenha papel fundamental, pois codifica para a tricodieno sintase, que participa da primeira etapa na via da biossíntese de tricodieno, *TRI4* codifica para o citocromo P450 monooxigenase, enzima que atua após *TRI5* na síntese de tricodieno (TOKAI et al., 2007; BOENISCH; SCHÄFER, 2011). Os genes *TRI6* e *TRI10* são fatores de transcrição e provavelmente regulam outros genes do grupo TRI (SEONG et al., 2009). A distribuição desses genes dentro do cluster pode variar entre espécies de *Fusarium*, levando à produção de diferentes tipos de micotoxinas (VILLAFANA; RAMDASS; RAMPERSAD, 2019). Os tricotecenos do tipo B (NIV, DON, 3-ADON e 15-ADON) são quimiotipos comumente detectados em espécies de *Fusarium* causadores de giberela no Brasil (ASTOLFI et al., 2012; DEL PONTE et al., 2015).

Os genes abordados, pela sua importância no metabolismo primário e metabolismo secundário, desenvolvimento sexual, virulência e patogenicidade em *F. graminearum* são alvos promissores para o silenciamento via HIGS.

3 CAPÍTULO I

Chs3b, Cyp51A, Cyp51B, Cyp51C, Tri5 e Tri6 como alvo para o HIGS em *Fusarium graminearum* em arábido e trigo

3.1 Resumo

O fungo *Fusarium graminearum*, um dos agentes causais da giberela, é altamente destrutivo em trigo. O Silenciamento Gênico Induzido pelo Hospedeiro (HIGS) é uma tecnologia baseada em RNAi, podendo ser utilizada para o controle de *F. graminearum*, visando silenciar um ou mais genes essenciais para o patógeno. Os genes *Chs3b*, *Cyp51A*, *Cyp51B*, *Cyp51C*, *Tri5* e *Tri6*, envolvidos em processos essenciais para *F. graminearum*, são potenciais alvos de HIGS. O trabalho objetivou verificar o potencial das construções gênicas RNAi-*Chs3b*, RNAi-*Cyp51-Tri*, em *Arabidopsis thaliana* e trigo e a construção gênica RNAi-*Synchit2* em arábido para HIGS em *F. graminearum*. As plantas transgênicas de arábido contendo as construções foram avançadas de geração, a segregação do transgene avaliada e a resposta ao patógeno foi verificada via inoculação em folhas destacadas e inflorescências nas gerações T2 e T3. Em trigo, linhagens transgênicas T2 e T3 foram avaliadas quanto à resistência à giberela. Espigas foram inoculadas com *F. graminearum* e avaliadas quanto a severidade, área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), porcentagem de grãos giberelados, peso de grão, quantidade de DON, e expressão relativa dos genes *Chs3b*, *Cyp51A*, *Cyp51B* e *Tri5*. Linhagens transgênicas RNAi-*Chs3b*, -*Cyp51-Tri* e -*Synchit2* de arábido não apresentaram diferença quanto à severidade em folhas destacadas e inflorescências. Níveis de DON foram significativamente diminuídos em duas linhagens RNAi-*Cyp51-Tri*. As linhagens transgênicas de trigo contendo RNAi-*Chs3b* e RNAi-*Cyp51-Tri* não apresentaram diferenças significativas quanto a severidade, AACPD, porcentagem de grão giberelados e peso de grãos em relação aos genótipos controles, uma linhagem contendo RNAi-*Cyp51-Tri* apresentou diminuição no nível de DON. A expressão dos genes *Chs3b*, *Cyp51A*, *Cyp51B* e *Tri5* não foi reduzida em *F. graminearum* inoculadas nas linhagens transgênicas de trigo. O uso de construções gênicas múltiplas ou com origem em *S. sclerotiorum* não influenciou na patogenicidade ou virulência em arábido e em trigo.

Palavras-chave: 1. Giberela. 2. Silenciamento gênico. 3. Citocromo P450. 4. Quitina sintase. 5. Deoxinivalenol

3.2 Introdução

O fungo *Fusarium graminearum*, um dos agentes causais da giberela, é considerado dentre os fungos fitopatogênicos, um dos mais importantes em todo o mundo, sendo uma doença altamente destrutiva em trigo, cevada e milho, causando reduções na produtividade e afetando a qualidade do produto (DWEBA et al., 2017). Uma consequência da giberela é a contaminação dos grãos por micotoxinas como o DON e

representam um risco à segurança alimentar por serem tóxicas à saúde humana e animal quando ingeridas (DARWISH et al., 2014). A ausência de cultivares com resistência completa, o pouco conhecimento sobre os genes de resistência aliada a baixa eficiência dos fungicidas, que são as atuais estratégias de controle disponíveis, não são suficientes para conter as epidemias de giberela e reforçam a necessidade de buscar outras técnicas de controle desse patógeno (MACHADO et al., 2017a; MACHADO et al., 2017b). Nesse sentido, opções biotecnológicas como o Silenciamento Gênico Induzido pelo Hospedeiro (do inglês *host induced gene silencing*, HIGS), podem ser empregados para obter plantas geneticamente modificadas com resistência aos patógenos, incluindo *F. graminearum*.

HIGS é uma abordagem baseada em RNAi, sendo que neste processo, pequenos RNAs de interferência (siRNA) produzidos pela planta, silenciam genes de organismos de outros reinos, como pragas e patógenos dessas plantas (YIN; HULBERT, 2015). Estudos recentes evidenciaram que siRNAs podem ser transferidos entre plantas e fungos, o que resulta no silenciamento de genes específicos do patógeno (CHEN et al., 2016). Nos trabalhos envolvendo a utilização de HIGS para combater patógenos fúngicos geralmente têm sido relatados alterações na morfologia, inibição de seu crescimento em planta e principalmente diminuição de sua virulência (ANDRADE et al., 2016).

Estudos iniciais de HIGS para fungos fitopatogênicos foram realizados por Tinoco et al. (2010), onde foi demonstrado pela primeira vez o fenômeno de interferência *in vivo* no patossistema tabaco x *Fusarium verticillioides*. Em outro trabalho, nos patossistemas cevada/trigo x oídio, o acúmulo de RNA fita-dupla ou RNA antisense na planta, foi capaz de silenciar transcritos fúngicos, e estes afetaram o desenvolvimento do fungo biotrófico *Blumeria graminis* (NOWARA et al., 2010). Além disso, outros trabalhos foram feitos na tentativa de obter plantas transgênicas resistentes a fungos biotróficos, como trigo a *Puccinia striiformis* (YIN; JURGENSON; HULBERT, 2011) e *Puccinia triticina* (PANWAR et al., 2013), e alface a *Bremia lactucae* (GOVINDARAJULU et al., 2015). Em trigo, Chen et al. (2016) demonstraram que plantas expressando sequências antisense de genes alvo de *Fusarium culmorum* foram capazes de reduzir os níveis de transcritos no patógeno, e conseqüentemente ocorreu a redução dos sintomas da doença.

Os diversos trabalhos que têm sido realizados na tentativa de controlar doenças fúngicas via HIGS geralmente estão relacionados com a inibição da doença devido ao silenciamento de genes essenciais para o patógeno, como os envolvidos na produção de quitina e ergosterol, que são componentes da parede celular e membrana plasmática, na regulação do desenvolvimento, no metabolismo primário e secundário e também na patogenicidade (CHUNTAO; HULBERT, 2015). Alguns estudos têm mostrado HIGS como alternativa viável e eficiente para o controle de doenças fúngicas (KOCH et al., 2013, GHAG; SHEKHAWAT; GANAPATHI, 2014, CHENG et al., 2015, HU et al., 2015; ANDRADE et al., 2016, CHEN et al., 2016).

Estudos realizados por Koch et al. (2013), demonstraram a efetividade da abordagem HIGS no patossistema cevada x *F. graminearum*, silenciando genes que codificam para citocromo P450 lanosterol C-14 α demetilase - CYP51 (*CYP51A*, *CYP51B*, *CYP51C*), enzima chave no processo de produção de ergosterol, constituinte de membrana celular dos fungos, *CYP51C* não codifica para citocromo P450 lanosterol C-14 α demetilase, mas impacta diretamente na desmetilação do lanosterol C-14 α . Em outro patossistema (trigo x *F. graminearum*), Cheng et al. (2015) demonstraram a efetividade do silenciamento de genes de *Fusarium* relacionados à síntese de quitina, que é componente estrutural da parede celular de fungos e não está presente em plantas e animais (LENARDON, et al., 2010). Andrade et al. (2016) obtiveram lesões menores silenciando o gene *Chs* em *Sclerotinia sclerotiorum* via HIGS. Os estudos tomados em conjunto abrem perspectivas para o desenvolvimento de plantas transgênicas de trigo resistentes à *F. graminearum*.

Outros alvos potenciais para HIGS são os genes responsáveis pela produção de tricotecenos, grande grupo de micotoxinas, que inclui a deoxinivalenol (DON). Essas micotoxinas causam diferentes efeitos tóxicos e são associados com a inibição da síntese proteica ribossomal, ruptura da integridade da membrana e alteração no transporte de elétrons e conteúdo de clorofila nas plantas (DESJARDINS, 2006), o que leva a diversos efeitos nas plantas incluindo a inibição da germinação da semente, do crescimento de plântulas, de raízes, podendo ainda causar murcha, clorose e necrose em toda a planta (MCCORMICK, 2003). Vários genes codificam proteínas envolvidas na biossíntese de

tricotecenos como DON. Os genes *TRI4*, *TRI5*, *TRI6* e *TRI10* codificam fatores chave na via de biossíntese dessas micotoxinas (AYUMI E MANICKAVELU, 2015). *TRI5* desempenha papel fundamental, pois codifica para a tricodieno sintase, que participa da primeira etapa desta via e *TRI4* codifica para o citocromo P450 monooxigenase, enzima que atua após *TRI5* na síntese de tricodieno (TOKAI et al., 2007). Os genes *TRI6* e *TRI10* são fatores de transcrição e provavelmente regulam outros genes envolvidos na síntese de DON (SEONG et al., 2009).

Pelo fato de *F. graminearum* ser capaz de infectar *A. thaliana*, esse patossistema tem sido utilizado para estudar alguns aspectos da interação *F. graminearum* – planta. Como a eficiência da produção de plantas transgênicas de trigo é baixa e o custo é alto, esta espécie modelo pode ser utilizada para indicar as construções gênicas mais promissoras a serem testadas em trigo. Diversos estudos sugerem que testes preliminares de genes candidatos para HIGS de *F. graminearum* possam ser realizados em *A. thaliana*, auxiliando estudos que almejam resistência à giberela em trigo e outras espécies de interesse através desta tecnologia (URBAN et al., 2002; CHEN et al., 2006; KOCH et al., 2013; NALAM et al., 2015).

O objetivo desse trabalho foi verificar o potencial das construções gênicas RNAi-Chs3b e RNAi-Cyp51-Tri em arabidopsis e trigo e a construção gênica RNAi-Synchit2, em arabidopsis via Silenciamento Gênico Induzido pelo Hospedeiro tendo como alvo genes essenciais para *F. graminearum*.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Local de realização dos experimentos com linhagens transgênicas de *Arabidopsis thaliana*

A trabalho foi desenvolvido na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Trigo, localizada na Rodovia BR 285, Km 294, Passo Fundo - RS. Foram utilizadas as instalações da instituição para fins da pesquisa, incluindo Laboratório de Biotecnologia, Fitopatologia bem como casa-de-vegetação e câmaras de crescimento.

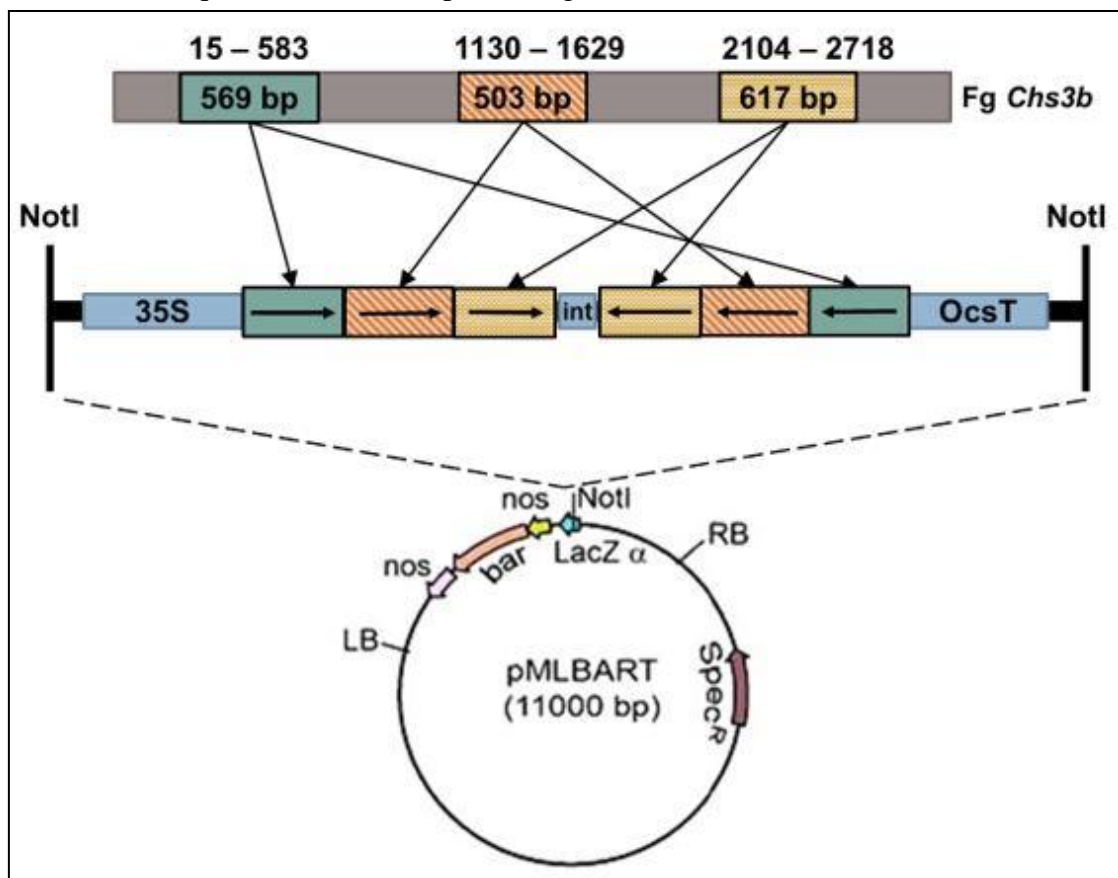
3.3.2 Construções gênicas para HIGS em *Arabidopsis thaliana*

As construções gênicas RNAi-Chs3b e RNAi-Cyp51-Tri foram montadas na instituição de pesquisa de Rothamsted Research, no Reino Unido, no projeto colaborativo Embrapa – BBSRC “Uso de previsão do risco de doença, tecnologias NGS e HIGS para explorar e controlar a giberela em lavouras de trigo”. Os vetores pMLBART-Chs3b e pMLBART-Cyp51-Tri foram enviados para a Embrapa Trigo. Da mesma forma, o vetor pCAMBIA-Synchit2 foi cedido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia para fins de pesquisa, dentro deste mesmo projeto. As plantas transgênicas de *Arabidopsis* contendo as construções gênicas RNAi-Chs3b, RNAi-Cyp51-Tri e RNAi-Synchit2 foram geradas na Embrapa Trigo.

O plasmídeo base das construções gênicas RNAi-Chs3b e RNAi-Cyp51-Tri foi o vetor binário pMLBART, de 11000 pares de bases (pb), e contém o gene *aaAI*, de *Escherichia coli*, que confere resistência a espectinomicina, utilizado para seleção de bactérias transformadas com vetor. O T-DNA do plasmídeo pMLBART contém, além das construções gênicas para RNAi, o gene *bar*, de *Streptomyces hygroscopicus*, controlado pelo promotor *nos* da nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens*, que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio, importante na seleção de plantas contendo o transgene.

A construção gênica RNAi-Chs3b foi montada com base em Cheng et al. (2015), contém três fragmentos do gene Quitina sintase 3b (*Chs3b*) de *F. graminearum* concatenados no sentido senso, espaçados pelo íntron *Adh maize*, as mesmas três partes do gene *Chs3b* no sentido antisenso, além do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (Cauliflower mosaic virus - CaMV) e o terminador OcsT da octopina sintase de *A. tumefaciens* (Figura 3). O gene *Chs3b* é o alvo a ser silenciado através da produção de RNA fita de simples que é auto complementar e formará a estrutura de um grampo, em inglês (*hairpin* RNA). A sequência complementar possui as três regiões do gene *Chs3b* (posições 15-583 (569 pb), 1130-1629 (503 pb) e 2104-2718 (617 pb)) totalizando 1689 pb (Figura 3).

Figura 3 - Esquema da construção RNAi-Chs3b para HIGS em *Fusarium graminearum* derivada das sequências utilizadas por Cheng et al. (2015)



Fonte: Modificado de Cheng et al. (2015).

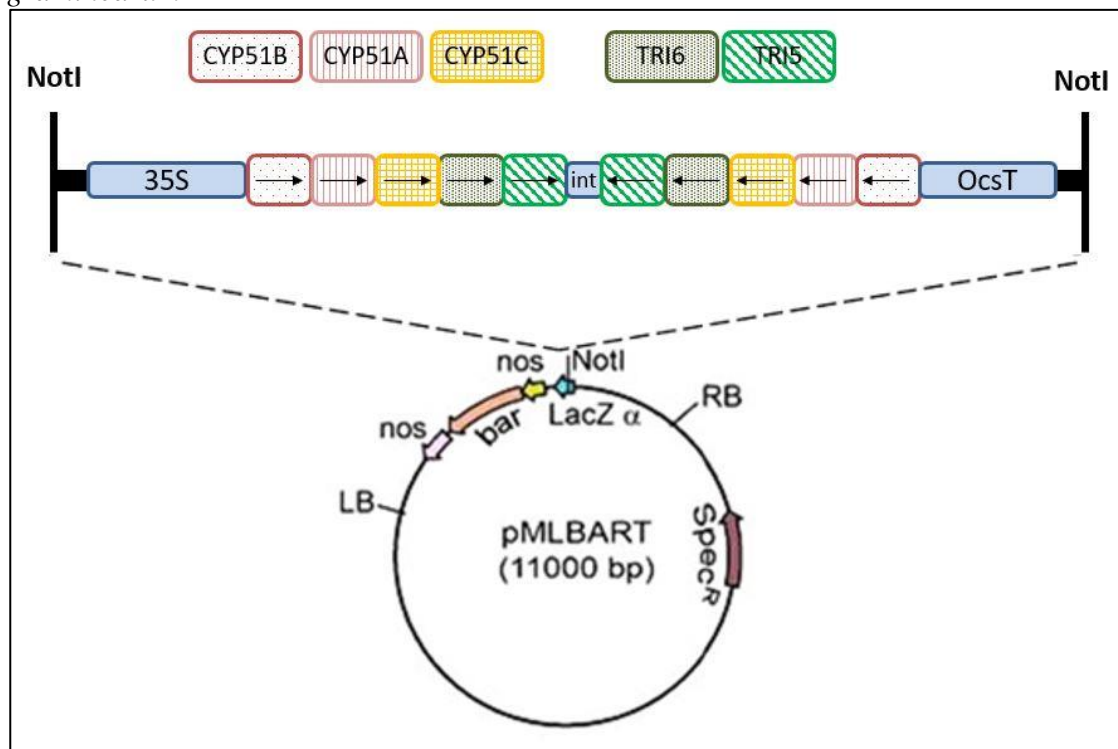
Nota: O vetor binário pMLBART-RNAi-Chs3b utilizado contém no T-DNA o promotor CaMV 35S, três regiões do gene *Chs3b* concatenadas no sentido senso, seguidas do íntron 2 do gene *Adh* de milho e das mesmas sequências do gene concatenadas na orientação antisenso e o terminador OcsT, de *Agrobacterium tumefaciens*, além do gene *bar*, contendo o promotor do gene que codifica para a nopalina sintase (*nos*) e o terminador do gene que codifica para a octopina sintase, ambos de *Agrobacterium tumefaciens*.

A construção gênica RNAi-Cyp51-Tri foi montada objetivando silenciar cinco genes reconhecidos como importantes para *F. graminearum*, sendo três da família gênica que codifica para o citocromo P450 lanosterol C-14 α -demetilase (*Cyp51A*, *Cyp51B* e *Cyp51C*), *CYP51C* não codifica para citocromo P450 lanosterol C-14 α demetilase, mas impacta diretamente na desmetilação do lanosterol C-14 α , além de dois genes que estão envolvidos na produção de deoxinivalenol (DON) (*Tri5* e *Tri6*). Essa construção gênica contém o promotor CaMV 35S, fragmentos de 250 pares de bases (pb) de cada gene

concatenados, o íntron 2 do gene *Adh* de milho, as mesmas cinco partes de cada gene concatenadas no sentido antisenso e o terminador OcsT (Figura 4).

As sequências de *F. graminearum* utilizadas nestas construções gênicas são idênticas às dos genes correspondentes no isolado CML3066, que teve o seu genoma completo sequenciado no âmbito deste projeto (MACHADO et al., 2020).

Figura 4 - Esquema da construção RNAi-Cyp51-Tri para HIGS em *Fusarium graminearum*

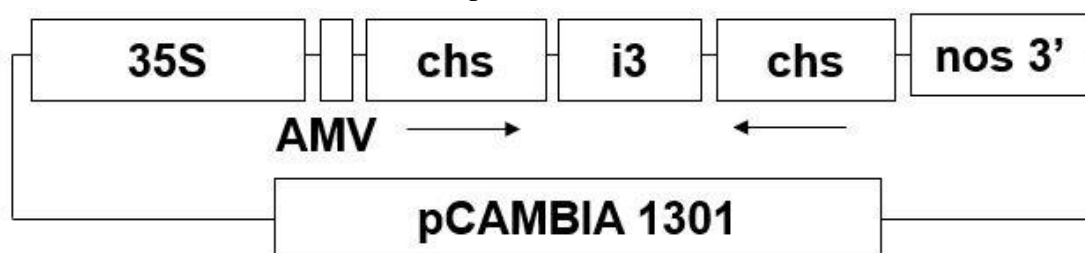


Nota: O vetor binário pMLBART-RNAi-Cyp51-Tri contém no T-DNA o promotor CaMV 35S, cinco regiões de 250 pb de cada gene (*Cyp51B*, *Cyp51A*, *Cyp51C*, *Tri6* e *Tri5*) concatenadas no sentido senso, seguidas do íntron 2 do gene *Adh* de milho e das mesmas sequências dos genes concatenadas na orientação antisenso e o terminador OcsT, de *Agrobacterium tumefaciens*, além do gene *bar*, contendo o promotor e o terminador do gene que codifica para a nopalina sintase (*nos*) de *A. tumefaciens*.

A construção RNAi-Synchit2 é a mesma usada por Andrade et al. (2016) para gerar plantas transgênicas de tabaco visando HIGS de *Sclerotinia sclerotiorum*, sendo referido como Δ chs pelos autores, e a expressão está sob o controle do promotor 35S de CaMV e da sequência potencializadora de transcrição do vírus do mosaico da alfafa (AMV), fragmento de 494 bp da sequenciado do gene que codifica para a quitina sintase

(*chs*) de *F. verticillioides* no sentido senso e antisenso flanqueando o íntron 3 do gene malato sintase (*i3*) de *A. thaliana* e terminador de nopalina sintase de *A. tumefaciens* (NOS 3') (Figura 5). De acordo com a busca feito no GenBank (02/02/2021) utilizando o algoritmo *blastn*, a sequência gênica com maior identidade em *F. graminearum* com este fragmento gênico está no gene *FgChs6*, que codifica para a quitina sintase 6 (XM_011319518.1), com 83% de identidade (Anexo II).

Figura 5 - Representação da construção RNAi-Synchit2 para HIGS em *Fusarium graminearum*, utilizada anteriormente por Andrade et al. (2016)



Fonte: Modificado de Andrade et al. (2016).

Nota: O vetor binário pCambia-Synchit2 utilizado contém no T-DNA, o promotor CaMV 35S, a sequência potencializadora da transcrição (*enhancer*) do vírus do mosaico da alfafa (AMV), o fragmento de 494 pb do gene que codifica para a quitina sintase de *Fusarium verticillioides*, concatenadas no sentido senso, seguidas do íntron *i3* e da mesma sequência do gene na orientação antisenso e o terminador NOS 3, de *Agrobacterium tumefaciens*.

3.3.3 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

No Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, os vetores plasmidiais pMLBART vazio, pMLBART-Chs3b, pMLBART-Cyp51-Tri e o vetor pCambiaSynchit2 foram inseridos em *A. tumefaciens* AGL1 através de eletroporação. Para isso, foi feito o preparo de células competentes de *A. tumefaciens* da estirpe AGL1. Previamente, colônias de AGL1 foi crescido em placas de Petri contendo meio LB (Luria Broth base, Fluka) 25 g/L + ágar 15 g/L acrescido de 50 µg/mL de Rifampicina, 100 µg/mL de Carbenicilina, para selecionar a estirpe AGL1, durante 2 a 3 dias a 28 °C em estufa. Para o preparo das células competentes foi crescido durante a noite “*overnight*”, a 28 °C e 250 rpm, uma colônia isolada a partir do meio LB sólido em 5 mL de meio Rhizo líquido (bacto-extrato de levedura 5 g/L, triptona 0,5 g/L, manitol 8 g/L, sulfato de amônio 2 g/L, cloreto de sódio 5 g/L) (TEPFER; CASSE-DELBART, 1987), ajustado

para pH 6,6 e autoclavado. Na etapa seguinte foram inoculados 125 μ L da cultura bacteriana em 50 mL de meio Rhizo e crescido *overnight* nas mesmas condições anteriormente citadas até atingir a densidade óptica em comprimento de onda de 600nm (600 OD₆₀₀): 1,5. No dia seguinte as células foram centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos, a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Após isso, as células foram mantidas sempre no gelo. O *pellet* foi ressuspendido em 125 μ L de água destilada estéril gelada e o volume completado para 50 mL. Procedeu-se à centrifugação a 5000 rpm durante 10 minutos, e em seguida houve o descarte imediato do sobrenadante. Esta etapa foi repetida quatro vezes com água destilada estéril gelada e uma vez com glicerol 10% (v/v) gelado. As células remanescentes foram ressuspendidas em glicerol 10%. A seguir foram feitas alíquotas de 50 μ L, que foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80 °C.

Para a eletroporação, as células eletrocompetentes foram descongeladas no gelo e adicionadas de 1 μ L de DNA plasmidial (1 ng/ μ L). As células foram transferidas para cubeta gelada de 1 mm de abertura e efetuou-se a eletroporação a 1440 volts. A elas foram adicionadas 500 μ L de meio Rhizo aquecido a 28 °C e transferidas para tubo de 15 mL tipo Falcon. Para as células transformadas expressarem o gene que produz a proteína que confere resistência ao antibiótico, elas foram incubadas a 28 °C durante três horas a 250 rpm. A seleção das bactérias transformadas foi realizada espalhando 50 a 100 μ L desta suspensão com auxílio de alça de Drigalski em placa de Petri contendo meio em meio LB + ágar 15 g/L com 50 μ g/mL de rifampicina, 100 μ g/mL de carbenicilina, para seleção da estirpe AGL1, acrescido de 50 μ g/mL de espectinomicina para selecionar as construções gênicas RNAi-Cyp51-Tri e RNAi-Chs3b, as placas foram incubadas a 28 °C durante três dias para selecionar células que receberam os plasmídeos com as construções gênicas. Para seleção da construção RNAi-Syncht2, foi utilizado 50 μ g/mL de canamicina além de rifampicina e carbenicilina nas concentrações mencionadas acima.

Para confirmação de bactérias transformadas foi feita a extração de plasmídeos, onde uma colônia de AGL1 para cada vetor binário foi crescida em 5 mL de meio LB líquido acrescido dos antibióticos acima mencionados em shaker a 28 °C e 250 rpm por 2 a 3 dias. Após esse período, 1,5 mL da cultura bacteriana foi transferida para microtubo e centrifugado a 4000 rpm por cinco minutos e o sobrenadante foi descartado. A operação

foi repetida para coletar mais células. O *pellet* foi ressuscitado em 100 µL de tampão GTE (glicose 50 mM, EDTA 10 mM, tris-HCL 25 mM, pH 8,0), filtroesterilizado, adicionado 5 mg/mL de lisozima antes da utilização. Adicionou-se à esta solução 200 µL de solução II (SDS 1%, NaOH 0,2 N) recém preparada, invertendo os tubos quatro vezes e incubando à temperatura ambiente durante cinco minutos. Após isso adicionou-se a ela 30 µL de solução de fenol alcalina (1 volume de fenol + 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1) recém preparada. Os tubos foram invertidos 16 vezes, acrescentados de 300 µL de solução de acetato de potássio 3M filtroesterilizado (14,7 g de acetato de potássio em 20 mL de água destilada, acrescentado de ácido acético glacial até atingir pH 4,8 e o volume completado para 50 mL) e invertidos por 20 vezes, seguida de incubação de 20 °C por 20 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos, a fase aquosa foi pipetada e transferida para novo microtubo. Em seguida foram adicionados dois volumes de etanol 95% gelado e as amostras foram misturadas com vórtex e centrifugadas a 12000 rpm por 20 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 500 µL de etanol 70% gelado e deixado para secar. Uma vez seco, o *pellet* foi ressuscitado em TE 0,1 (10 mM tris-HCl + 1 mM EDTA, pH 8) contendo RNase A (100 µg/mL), deixado em banho maria a 37 °C por duas horas. As amostras foram estocadas a -20 °C.

A confirmação da presença dos plasmídeos se deu por PCR usando dois pares de primers específicos para a construção RNAi-Cyp51-Tri e RNAi-Chs3b (35SP.F, RNAI5.R1, RNAI3.F1 e OcsT.R) (Tabela 1), que detectam os fragmentos senso e antisenso das construções, amplificando do promotor 35S até o íntron 2 do gene *Adh* de milho e deste íntron até o terminador OcsT, respectivamente. Para detectar a construção Sychit2, foram utilizados os primers ChirnaiF e ChirnaiR (Tabela 1), que anelam nas extremidades do fragmento do *Chs*, permitindo sua amplificação. A reação da polimerase em cadeia (PCR) foi feita em termociclador (GeneAmp, Applied Biosystems), em reação de 20 µL composto por 4 µL de tampão 5X Go Taq®Flexi, 2,4 µL de dNTP (10 mM), 0,9 µL de MgCl₂ (25 mM), 1,2 µL de primer montante (10 mM), 1,2 µL de primer a jusante (10 mM), 0,3 µL de GoTaq® Hot Start Polimerase (5 u/µL) (Promega), 100 ng de DNA, água Milli-Q até o volume final de 20 uL. A termociclagem consistiu de

desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguida de 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 62 °C por 30 s, 68 °C por 2 min, e extensão final de 5 min a 68 °C para as construções RNAi-Cyp51-Tri e RNAi-Chs3b. Para RNAi-Synchit2, a termociclagem consistiu de desnaturação inicial de 94 °C por 1 min, seguida de 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 68 °C por 1 min, e elongação final de 7 min a 68 °C.

Tabela 1 - Primers para confirmação da presença das construções RNAi-Chs3b, RNAi-Cyp51-Tri e Synchit2 inseridas em *Agrobacterium tumefaciens* e *Arabidopsis thaliana*. Passo Fundo – RS, 2017

Nome	Sequência	Amplicon (pb ¹)
35SP.F	5' CACGAGGAGCATCGTGGAAA 3'	RNAi-Chs3b: 1917
RNAi5.R1	5' GGGATGGCTGATTAGATACCTTGG 3'	RNAi-Cyp51-Tri: 1521
RNAi3.F1	5' CGGTTGACTTGCGCCTTCTTG 3'	RNAi-Chs3b: 1755
OCst.R	5' ATCATGCGATCATAGGCGTCTC 3'	RNAi-Cyp51-Tri: 1359
ChirnaiF	5' AGGGCCCGGTACCTTCAGCGTATGC 3'	Synchit2: 521
ChirnaiR	5' AGAGCTCTCTAGAGGCCAATCGAGG 3'	

Nota: ¹Pares de bases.

3.3.4 Transformação de *Arabidopsis thaliana*

Para a transformação genética de *A. thaliana* utilizou-se o ecótipo Landsberg erecta (Ler), escolhido pelo prévio conhecimento em relação a suscetibilidade à *F. graminearum*, em flores (URBAN et al., 2002). As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento vegetal (CONVIRON), com 11 horas de fotoperíodo, 23 °C na luz e 22 °C no escuro. As sementes foram vernalizadas em geladeira a 4 °C por aproximadamente 5 dias, e em seguida semeadas em vasos plásticos de 9 cm de diâmetro contendo uma mistura previamente irrigada composto por substrato Dacko (turfa de sphagno, vermiculita expandida, resíduo orgânico classe A, calário dolomítico) acrescido de 4 g de PG-Mix™ 14-16-18 (Yara) e 16 g de Osmocote® Plus 15-9-12 para cada 8 L de substrato. A semeadura foi realizada com auxílio de micropipeta para a distribuição homogênea das sementes sobre o substrato, sendo depositadas aproximadamente 40 sementes por vaso, que foi coberto com filme plástico para manter a umidade necessária à germinação. Após cinco a sete dias, o filme plástico foi retirado aos poucos para aclimatar as plantas. A

irrigação foi conforme a necessidade hídrica das plantas. Após 21 dias, as plantas foram transferidas para vasos de mesmo tamanho, com uma planta por vaso.

A inflorescência principal e as secundárias com 2 a 10 cm com poucas flores abertas foram cortadas para induzir a produção de mais inflorescências, pela quebra da dominância apical. As plantas transgênicas foram geradas pelo método de mergulho floral (*floral dip*) descrito por Clough e Bent (1998), no qual são geradas sementes transgênicas hemizigotas. Há indícios de que os óvulos são transformados, e não os pólenes (DESFEUX; CLOUGH; BENT, 2000). Para isso, colônias de *A. tumefaciens* AGL1 contendo o vetor vazio pMLBART, pMLBART-Chs3b, pMLBART-Cyp51-Tri e pCAMBIA-Synchit2 foram crescidas, individualmente, em meio MG/L líquido (manitol 5 g/L, ácido L-glutâmico 1 g/L, fosfato monopotássico 0,25 g/L, sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,1 g/L, cloreto de sódio 0,1 g/L, triptona 5 g/L, bacto-extrato de levedura 2,5 g/L), ajustado a pH 7,0, autoclavado e acrescido de 1 µg/L de biotina, 50 µg/mL de rifampicina, 100 µg/mL de carbenicilina e 50 µg/mL de espectinomicina (antibióticos para as construções no vetor pMLBART) ou 50 µg/mL de rifampicina, 100 µg/mL de carbenicilina e 50 µg/mL de canamicina (antibióticos para RNAi-Synchit no vetor pCAMBIA), agitando de 16 a 20 horas em agitador “shaker” a 28 °C e 250 rpm. As bactérias foram centrifugadas a 4500 rpm durante 10 minutos a 22°C, ressuspensas em 5 mL em sacarose 5% (v/v), com a concentração de bactérias ajustada para OD600: 0,8. A suspensão bacteriana foi acrescida de Silwet L-77 (0,02%) antes da inoculação. As inflorescências de plantas de *A. thaliana* Ler foram mergulhadas na suspensão de bactérias e cobertas com saco plástico transparente (câmara úmida) por 12 horas, fornecendo as melhores condições para a transformação ocorrer. O procedimento foi repetido duas a três vezes para cada planta em intervalos de cinco a sete dias.

Após esse período, as plantas foram tutoradas com palitos de madeira de aproximadamente 30 cm e protegidas com plásticos transparentes abertas na extremidade superior e presas aos vasos na extremidade inferior. As plantas foram conduzidas com irrigação somente até a produção das siliquis, quando foi interrompida gradativamente para as sementes atingirem a maturação fisiológica. Após a coleta, as sementes (mistura

de sementes transformadas e não transformadas) foram devidamente identificadas e armazenadas em geladeira.

A seleção das plantas transgênicas foi feita *in vitro*, por meio de plaqueamento das sementes colhidas das plantas submetidas à transformação em placas de Petri de 90 mm x 15 mm contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com os respectivos agentes seletivos. Para o preparo de 1 L deste meio de cultura, foi adicionado 7 g de ágar a 400 ml de água, autoclavado e esfriado para aproximadamente 50 °C. Uma segunda parte com volume final de 600 ml, foi preparada com a adição de 100 ml de macronutrientes MS (10x), 10 ml de micronutrientes MS (100x), 10 ml de FeNa₂EDTA MS (100x), 10 ml de vitaminas MS (100x), 100 mg de inositol, 30 g de sacarose, o pH foi ajustado para 5,7 e filtroesterilizado. Foi ainda acrescido de fosfotricina 5 µg/mL para a seleção das plantas transformadas com as construções RNAi-Chs3b, RNAi-Cyp51-Tri e plantas controle sem construção de RNAi. Para a seleção de plantas transformadas com RNAi-Synchit2, foi acrescentado 20 µg/mL de higromicina a este meio de cultura. Aproximadamente 250 sementes foram desinfestadas em álcool 70% v/v, durante 1 minuto, solução de hipoclorito (2,5 a 5% de ingrediente ativo) 50% (v/v) + 0,05% (v/v) de Tween 20. As sementes foram enxaguadas de 5 a 7 vezes com água destilada estéril e deixadas submersas em água. As sementes foram mantidas em geladeira durante três dias quando já estavam armazenadas na geladeira, ou durante sete dias quando recém colhidas, para a quebra de dormência. Após esse período, as sementes foram distribuídas com auxílio de micropipeta sobre o meio de cultura, retirado o excesso de água e a placa de Petri foi vedada com fita micropore. As placas foram colocadas em estufa incubadora de B.O.D (Percival), iluminação de 120-150 µmol/m². s, fotoperíodo de 12 horas, 23 °C.

As plantas sobreviventes à seleção foram aclimatadas em vasos plásticos com a mistura de substrato citado anteriormente. Quando as plantas estavam com as folhas expandidas, foi realizada a extração de DNA genômico pelo método CTAB (CHEN; RONALD, 1999). Para tanto, duas a três folhas jovens foram coletadas em microtubos contendo 3 esferas metálicas de 2,3 mm, para maceração. O tecido vegetal foi congelado em nitrogênio líquido, macerado em equipamento Mini-Beadbeater-96 (BioSpec Products) durante 1 min. Posteriormente, foram adicionados 900 µL de tampão CTAB

(NaCl 1,4 M + Tris-HCl pH 8,0 + EDTA pH 8,0 100 mM + CTAB 2% (p/v)) aquecido a 65 °C e a solução foi homogenizada com vórtex. As amostras foram incubadas a 65 °C por uma hora, sendo agitadas manualmente a cada 10 min. Adicionou-se 700 µL de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), sendo as amostras agitadas manualmente por cerca de 5 min. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos. A fase aquosa contendo o DNA foi transferida para novos tubos e adicionada de igual volume de isopropanol gelado e meio volume de acetato de amônio 7,5 M, sendo os tubos agitados manualmente para precipitar o DNA. Realizou-se uma nova centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos, seguida de três lavagens do *pellet* com etanol 70% gelado. O pellet foi seco com uso de *speed vac* por 7 minutos e ressuspendido em TE 0,1 (10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA, pH 8) contendo RNase A (10 µg/mL). As amostras foram incubadas *overnight* na geladeira a 4 °C ou 60 minutos a 37 °C em banho-maria ou 30 minutos a 65 °C.

As amostras foram quantificadas, utilizando 2 µL de DNA, 4 µL de tampão 6X (*Stop solution*) e 4 µL de água. As amostras foram quantificadas em gel contendo tampão TBE, agarose 1% (p/v) e brometo de etídeo (0,5 µg/mL). Foram utilizados 50 ng e 100 ng do marcador de peso molecular lambda para quantificação das amostras por comparação, e a corrida de eletroforese foi de 1 hora e 30 minutos, a 90 volts. Após a corrida, o gel foi visualizado e analisado com auxílio do Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System (Bio-Rad), a quantificação foi através de comparação visual com os padrões. Após a quantificação, realizou-se a PCR para confirmação de plantas transgênicas, conforme descrito no item 3.3.3. Para inferir o tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador 1 kb ladder (Amresco).

As plantas confirmadas transgênicas (T0) foram tutoradas conforme descrito anteriormente. Para o avanço de geração, as sementes T1 provenientes dessas plantas foram coletadas, identificadas e armazenadas em geladeira.

3.3.5 Análise de segregação e avanço de geração de arabidopsis

Para a análise de segregação do transgene e avanço de geração de plantas com as construções RNAi-Chs3b e RNAi-Cyp51-Tri e transformadas somente com o vetor vazio, foram selecionadas sementes de plantas T1 transgênicas, as sementes foram vernalizadas e semeadas em vasos, nas mesmas condições anteriores. Uma semana após a semeadura, o herbicida glufosinato de amônio 0,1% (Liberty®, BASF) foi aplicado, e reaplicado sete dias após a primeira aplicação. Para análise de segregação, as plantas foram fotografadas no dia da aplicação e após 15 dias. A aderência dos modelos genéticos para uma e duas inserções do transgene foi testada utilizando o teste de Qui-Quadrado (χ^2) conforme descrito por Steel & Torrie (1980) em planilha eletrônica (Excel). A hipótese de nulidade foi aceita quando o nível de probabilidade calculado foi igual ou superior a 5%. Segundo Steel & Torrie (1980) tem-se:

$$\chi^2 = \sum[(Obs - Esp)^2/Esp]$$

Com n-1 graus de liberdade onde: *Obs*: número de plantas observado para determinada classe fenotípica; *Esp*: número de plantas esperado para determinada classe fenotípica, de acordo com modelo genérico proposto; n: número de classes fenotípicas esperado.

As plantas sobreviventes, foram transplantadas 21 dias após a aplicação do herbicida, sendo tutoradas com estacas de 30 cm e cobertas com plásticos transparentes, abertos em ambas as extremidades, sendo a inferior presa ao vaso para evitar a polinização cruzada. Ao final do ciclo, as sementes foram coletadas de forma individual, com cuidado para não ocorrer mistura das sementes.

Para análise de segregação de plantas RNAi-Synchit2, as sementes T1 e T2 foram desinfestadas conforme procedimentos anteriores descritos, plaqueadas em meio MS sem agente seletivo. Aos sete dias, as plantas foram transferidas para meio MS acrescido de 20 µg/mL de higromicina. O número de plantas sobreviventes foi quantificado após 15 dias

em meio seletivo e a análise de segregação do transgene foi feita através do teste de χ^2 em planilha eletrônica.

Preferencialmente sementes T3 com potencial de serem homozigotas, com base na segregação da geração T2, foram selecionadas para o experimento de inoculação. Da mesma forma que anteriormente, procedeu-se a condução e aplicação de herbicida para plantas transformadas com RNAi-Chs3b, RNAi-Cyp51-Tri e pMLBART vazio, ou seleção *in vitro*, no caso de plantas RNAi-Synchit2, nessa geração. Após a análise de segregação, plantas sobreviventes da aplicação de herbicida de linhas selecionadas foram posteriormente doadoras de folhas para serem inoculadas com *F. graminearum*.

3.3.6 Inoculação de *Fusarium graminearum* em folhas destacadas de arabisopsis

O isolado CML3066 de *F. graminearum* foi cultivado em meio BDA durante 7 dias, com temperatura de 23 ± 2 °C e regime de 12 h de luz branca fluorescente. No dia da inoculação, discos de cultura de *F. graminearum* foram obtidos pressionando uma ponteira estéril de micropipeta P1000 cortada na extremidade até obter um orifício de 3 mm de diâmetro, sobre o meio BDA contendo micélio e conídios de *F. graminearum* do isolados CML3066. As folhas foram destacadas da roseta de linhagens transgênicas homozigotas/hemizigotas da geração T2 de *A. thaliana* em estágio de desenvolvimento 3.90 (crescimento completo da roseta) de acordo com Boyes et al. (2001), estando com aproximadamente sete semanas de idade. Antes da inoculação, as folhas foram feridas com auxílio de uma ponteira estéril de micropipeta próximas à nervura central, do lado direito da face adaxial da folha. A inoculação foi realizada aplicando o disco de 3 mm no local do ferimento.

Após a inoculação as folhas foram transferidas para placas de Petri contendo meio água/ágar 1% (p/v). As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas no escuro por 24 h, com temperatura de 22 ± 2 °C. Após este tempo, as placas foram mantidas durante três dias com luminosidade de aproximadamente $135 \mu\text{moles. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$, com fotoperíodo de 11 horas de luz (dia) e 13 hora de escuro (noite) e temperatura de 22 °C

dia/ 20 °C noite. A severidade foi quantificada aos 3 dias após a inoculação (dpi), através da análise das imagens utilizando software ImageJ (v. 1.8.0_112). Os experimentos foram compostos por folhas de linhagens transgênicas e controles, e no total foram inoculadas 12 folhas por linhagens alocadas em 3 repetições, o delineamento adotado foi inteiramente casualizado. Os dados foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p.<0,05$), uma vez que após tentativas de transformação os dados não atenderam aos pressupostos de normalidade dos resíduos, homocedasticidade e independência dos erros necessárias para testes paramétricos. Todas as análises foram realizadas no programa R (R Core Team) - RStudio® Version 3.4.3. utilizando o pacote ExpDes.pt.

3.3.7 Inoculação de *Fusarium graminearum* em inflorescências de arabidopsis

A inoculação de inflorescências em linhagens transgênicas de arabidopsis foi realizada com suspensão de esporos. Para isso, o isolado CML3066 de *F. graminearum* foi cultivado em meio BDA nas mesmas condições descritas no item 3.3.6. Após esse período, os conídios foram suspensos em água e a concentração da suspensão foi ajustada para 5×10^4 conídios/ml. Cinco minutos antes da inoculação ser iniciada foi adicionado 0,02% (v/v) de Tween 20. A inoculação foi realizada com borrifador, até período anterior ao ponto de escorrimento. Os experimentos foram constituídos de linhagens transgênicas homozigotas/hemizigotas de arabidopsis contendo as construções gênicas RNAi-Cyp51-Tri e RNAi-Chs3b e como controle foram utilizadas linhagens transgênicas com vetor vazio e plantas não transgênicas Ler. Para o controle negativo foram utilizadas plantas Ler não transgênica borrifadas com água destilada estéril acrescida de 0,02% (v/v) de Tween 20. As inoculações foram realizadas quando as plantas transgênicas de *A. thaliana* estavam em estágio de desenvolvimento 6 (a partir da primeira inflorescência) (BOYES et al., 2001). As plantas inoculadas foram mantidas no escuro durante 24 horas, a $22 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ em câmara úmida. Após, as plantas foram mantidas durante o período de avaliação em fotoperíodo de 11 horas (11 horas de luz/ 13 horas de escuro), com temperatura de $22 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$, continuando em câmara úmida, que foi diariamente borrifada com água destilada estéril. A severidade foi quantificada aos 15

dias após a inoculação (dpi), através de escala adaptada de Nalam, Sarowar e Shah (2016) (Tabela 2).

Tabela 2 - Escala para avaliação de inflorescências inoculadas com *Fusarium graminearum*, adaptado de Nalam, Sarowar e Shah (2016).

Nota	Intensidade dos sintomas
0	Sem presença de micélio
2	Pouco micélio visível nas inflorescências
4	Micélio se alastrando pela inflorescência
6	Micélio por toda inflorescência, se alastrando para síliqua
8	Micélio por toda inflorescência e por toda síliqua
10	Constrição basal da inflorescência, presença de micélio em toda inflorescência e síliqua

Os experimentos foram compostos por linhagens transgênicas homozigotas/hemizigotas e controles conforme acima descrito, sendo inoculadas três plantas por tratamento conduzido em delineamento totalmente casualizado. Procedeu-se análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias Tukey a 5% de probabilidade de erro. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa R (R Core Team) - RStudio® Version 3.4.3. utilizando o pacote ExpDes.pt.

3.3.8 Quantificação de deoxinivalenol em inflorescências de arabisopsis

Para quantificação de deoxinivalenol (DON), foram coletadas inflorescências de linhagens transgênicas contendo a construção gênica RNAi-Cyp51-Tri inoculadas com suspensão de esporos de *F. graminearum*. As inflorescências foram coletadas 15 dias após a inoculação secas por 10 dias em estufa a 30 °C, maceradas com esferas metálicas em macerador/homogeneizador de amostras Mini-BeadBeater-96, diluídas em água destilada na proporção 1:10, material vegetal e água, respectivamente, e encaminhadas para o Laboratório de Pós-Colheita da Embrapa Trigo para serem quantificadas. Para a análise, foram seguidas orientação do fabricante do Kit AgraQuant® Deoxinivalenol ELISA, com limite de detecção de 200 ppb e de quantificação de 250 ppb. O experimento foi composto por 11 tratamentos, 3 repetições, conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Os níveis de DON foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p.<0,05$), uma vez que após tentativas de transformação os dados não atenderam

aos pressupostos de normalidade dos resíduos, homocedasticidade e independência dos erros necessárias para testes paramétricos. Todas as análises foram realizadas no programa R (R Core Team) - RStudio® Version 3.4.3. utilizando o pacote ExpDes.pt.

3.3.9 Experimentos realizados com linhagens transgênicas de trigo

Este trabalho foi feito em parceria com a instituição de pesquisa Rothamsted Research do Reino Unido, que gerou as plantas transgênicas via bombardeamento de partículas, conforme previsto no projeto bilateral Embrapa-BBSRC, códigos SEG 02.15.07.003.00.00 (Brasil) e BB/N018095/1 (Reino Unido). Parte das sementes das plantas transgênicas de trigo foram enviadas para avaliação e estudo na Embrapa Trigo. Após os trâmites legais e período de quarentena na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), as sementes chegaram na Embrapa Trigo em junho de 2019, quando foram iniciados os trabalhos.

Este estudo foi realizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Trigo, localizada na Rodovia BR 285, Km 294, Passo Fundo - RS. Foram utilizadas as instalações da instituição para fins da pesquisa, incluindo Laboratório de Biotecnologia, Fitopatologia, Pós-Colheita bem como casa-de-vegetação e câmaras de crescimento.

3.3.10 Seleção de linhagens de trigo contendo as construções RNAi-Chs3b e RNAi-Cyp51-Tri

A cultivar moderadamente resistente à giberela BRS Guamirim (KUHNE et al., 2020) foi transformada via bombardeamento de partículas pela instituição de pesquisa Rothamsted Research, o qual encaminhou sementes para Embrapa Trigo. Foram geradas plantas transgênicas com a construção gênica RNAi-Cyp51-Tri, visando o silenciamento dos genes da família *CYP51* (*Cyp51A*, *Cyp51B*, *Cyp51C*), de membros da família *TRI* de genes relacionado a produção de deoxinivalenol (DON), *Tri5* e *Tri6*, e plantas transgênicas com a construção RNAi-Chs3b, tendo como alvo o gene *Chs3b*. Estas construções gênicas são similares às das Figuras 3 e 4, no entanto, o promotor (*ubi*) e o

terminador são do gene que codifica para a ubiquitina de milho e o terminador (*nos*) da nopalina sintase de *A. tumefaciens*. O fragmento contendo as construções de RNAi foram separadas do vetor plasmidial e cada uma delas foi co-transformada com outra construção contendo o gene *bar* controlado pelo mesmo promotor ubi em adição ao terminador *nos*.

No total foram selecionadas 17 linhagens transgênicas para compor os ensaios, das quais três possuem a construção gênica RNAi-Cyp-Tri e 12 contêm a construção RNAi-Chs3b, além de duas linhagens bombardeadas com partículas sem DNA, as quais foram denominadas de nulas. As linhagens com os transgenes representam dez eventos, visto que HIGS008 e HIGS009; HIGS013 e HIGS017; HIGS023, HIGS026 e HIGS027 são do mesmo evento. As linhagens transgênicas de trigo e sua geração estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Linhagens de trigo transgênico da cultivar BRS Guamirim contendo as construções gênicas de RNAi-Chs3b e RNAi-Cyp51-Tri para HIGS de *Fusarium graminearum*, utilizados nos experimentos. Passo Fundo – RS, 2020

Código/Genótipo	Construção gênica	Geração	³ Número cópias
HIGS001	RNAi-Chs3b	T2	6
HIGS005	RNAi-Chs3b	T2	19
HIGS008	RNAi-Chs3b	T2	6
HIGS009	RNAi-Chs3b	T2	6
HIGS013	RNAi-Chs3b	T2	18
HIGS017	RNAi-Chs3b	T2	16
HIGS049	RNAi-Chs3b	T2	29
HIGS051	RNAi-Chs3b	T2	101
HIGS052	RNAi-Chs3b	T2	269
HIGS058	RNAi-Chs3b	T3	33
HIGS060	RNAi-Chs3b	T3	12
HIGS061	RNAi-Chs3b	T3	12
HIGS019	nula ¹	T2	0
HIGS023	RNAi-Cyp51-Tri	T2	30
HIGS056	RNAi-Cyp51-Tri	T3	28
HIGS057	RNAi-Cyp51-Tri	T3	27
HIGS035	nula ²	T2	0

Nota: ¹Bombardeada com partículas sem DNA, controle do experimento de transformação de RNAi-Chs3b. ²Bombardeada com partículas sem DNA, controle do experimento de transformação de RNAi-Cyp-Tri. ³Número predito de cópias na geração T1, predição feita através RT-qPCR na região do intron de adh de milho, pela instituição Rothamsted Research.

3.3.11 Condução das plantas de trigo

Foram semeados dois baldes para cada linhagem transgênica (Tabela 3), contendo cinco sementes por vaso, 4 vasos para a cultivar BRS Guamirim e 2 vasos para Bobwhite. Cada vaso de 8 litros continha uma mistura de solo acrescido de 10% de turfa de sphagnum, Pindstrup N.5, peneira 5-20 mm, 10% de vermiculita, 16 g de Osmocote® Plus 15-9-12 4 g de PG-Mix™ 14-16-18 (Yara). As sementes foram tratadas com fungicida e inseticida Standak Top® e semeadas manualmente a cerca de 1 cm de profundidade. Os vasos foram irrigados sempre que necessário. Foi realizado desbaste, permanecendo quatro plantas por vaso. Foram feitas duas aplicações de uréia (100 kg/ha), sendo aos 20 e 40 dias após semeadura. As plantas foram tutoradas para facilitar o manuseio.

3.3.12 Extração de DNA e confirmação de plantas transgênicas de trigo

O DNA genômico foi extraído pelo método CTAB (CHEN; RONALD, 1999). Para extração do DNA genômico das plantas transgênicas de trigo, uma folha jovem de cada planta, no estágio de perfilhamento, foi coletada e devidamente identificada. Os fragmentos de folhas foram cortados para cerca de 2 mm e colocadas em placas de 96 orifícios de 2 ml, contendo 3 esferas para maceração de 2,3 mm de diâmetro em cada orifício, onde foram adicionados 900 µL de tampão CTAB, conforme descrito no item 3.3.4. As amostras foram maceradas por agitação em equipamento Mini-Beadbeater-96 (BioSpec Products) durante 1 minuto, e em seguida incubadas a 65 °C por uma hora, sendo agitadas manualmente a cada 10 minutos. Adicionou-se 700 µL de solução de clorofórmio:álcool isoamílico, seguindo as etapas conforme descrito no item 3.3.4 até o término do procedimento.

Posteriormente, as amostras foram quantificadas, conforme descrito no item 3.3.4. Foram utilizados 100 ng e 200 ng do marcador de peso molecular lambda para quantificação das amostras por comparação. Uma vez quantificado, o DNA foi utilizado para efetuar a PCR para detectar os transgenes.

As etapas da termociclagem da PCR foram conforme descritas no item 3.3.3 para as construções RNAi-Cyp51-Tri e RNAi-Chs3b. Os primers usados para a reação de PCR estão descritos na Tabela 4. Para inferir o tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador 1kb ladder (Amresco).

Tabela 4 - Primers para confirmação da presença das construções RNAi-Cyp-Tri e RNAi-Chs3b nas linhagens transgênicas de trigo HIGS. Passo Fundo - RS, 2019

Nome	Sequência	Amplicon (pb ¹)
HIGS156 UbiPro4 F	5' TTTAGCCCTGCCTTCATACG 3'	RNAi-Chs3b: 1815
HIGS157 Adh2rev	5' ATCACAAATGGGATGGCTGA 3'	RNAi-Cyp51-Tri: 1419
HIGS158 Adh2fwd	5' TCAGCCATCCCATTTGTGAT 3'	RNAi-Chs3b: 1825
HIGS159 Nos5' rev	5' ATCGCAAGACCGGCAACAGG 3'	RNAi-Cyp51-Tri: 1429
CNPT UbipF	5' TTGTCGATGCTCACCTGTT 3'	RNAi-Chs3b: 1807
CNPT Adh2i-R	5' AGTCAACCGCGAGTTGTTGTA 3'	RNAi-Cyp51-Tri: 1411

Nota:¹Pares de base

3.3.13 Fenotipagem de genótipos de trigo transgênicos

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento. A data da antese foi registrada e 12 espigas selecionadas para cada tratamento, sendo duas espigas utilizadas para extração do RNA. A inoculação foi realizada no mesmo dia em todos tratamentos cujas espigas encontravam-se de 7 a 15 dias após a antese.

Para a inoculação foi utilizado o isolado de *F. graminearum* CML 3066, o cultivo e preparo da suspensão do inóculo foi conforme descrito no item 3.3.7. Como controle foi utilizada água destilada estéril acrescida de 0,02% de Tween 20. A suspensão de conídios foi preparada cerca de uma hora antes da inoculação. As espigas foram inoculadas com a colocação cuidadosa de 20 µL da solução de esporos com o auxílio de uma micropipeta, na sexta espiguetas contadas de baixo para cima (denominado inoculação de espiguetas central) (LIMA, 2014). As plantas foram cobertas com sacos plásticos pretos molhados, internamente, fazendo a câmara úmida. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 72 horas a $\sim 25 \pm 2$ °C e alta umidade relativa. Em seguida, as plantas permaneceram na câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz a 20 °C e 8 horas de escuro a 14 °C até o final das avaliações. As espigas foram avaliadas até que as do controle não inoculado trocassem

de cor, ficando com tonalidade pálea, em estado de grão em massa mole, código 85 da escala decimal de Zadoks, Chang e Konzak (1974).

Posteriormente as plantas foram levadas para casa de vegeta o e quando atingiram a maturaa o fisiológica, as espigas foram colhidas individualmente e trilhadas manualmente.

3.3.14 Avalia es em genótipos de trigo

O progresso da doença foi acompanhado através de avalia es nas espigas inoculadas, iniciadas após o término do período de escuro. A severidade foi realizada por meio de avalia es diárias até o aparecimento dos primeiros sintomas, quando foram a intervalos de 2 a 4 dias. A severidade real da doença foi obtida a partir da contagem do número de espiguetas com sintomas da doença em relao ao total de espiguetas de cada espiga inoculada. A partir dos dados de severidade foi possível obter o progresso da doença, calculando-se a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD), de acordo com a fórmula de Wilcoxson et al. (1975):

$$AACPD = \sum_{i=1}^n [(y_{i+1} + y_y)/2] [t_{i+1} - t_i]$$

Onde: y_i = percentagem da área da espiga infectada por *F. graminearum* na i -ésima observa o; t_i = tempo (dias) no momento da i -ésima observa o; n = número total de observa es.

Os gr os de cada espiga foram pesados e avaliados quanto   percentagem de grãos giberelados (com colorao rosada, esbranquiçados e chochos). A percentagem de grãos giberelados foi determinada dividindo o número de grãos sintomáticos pelo número total de grãos colhidos de cada espiga, indicando os danos causados pelo patógeno.

Após a avalia o, os grãos foram encaminhados ao Laboratório de Pós-Colheita da Embrapa Trigo para quantifica o de DON via ELISA. Para esse ensaio, os gr os de

cada tratamento foram unidos para fornecer a quantidade necessária em peso para realizar o teste com os grãos moídos. O procedimento foi conforme descrito no item 3.3.8, mas sem repetições biológicas. Esta metodologia de análise de DON em grãos foi descrita em Duffeck et al. (2017). Após a quantificação de deoxinivalenol (DON) os dados foram correlacionados com as variáveis severidade final (SF), Área Abaixo da Curva de Progresso da doença (AACPD), grãos giberelados (GG) e peso de grão (PG), para tanto procedeu-se a correlação de Spearman.

3.3.15 Expressão gênica em *Fusarium graminearum* inoculado em linhagens transgênicas de trigo contendo as construções RNAi-Chs3b e RNAi-Cyp51-Tri

Para verificar a ocorrência do HIGS em *F. graminearum* inoculados nas plantas de trigo geneticamente modificadas contendo as construções RNAi-Chs3b e RNAi-Cyp51-Tri, foi realizada a análise de expressão por RT-qPCR, pelo Laboratório de Biotecnologia, dos genes *Chs3b*, *Cy51A*, *Cy51B*, *Cy51C*, *Tri5* e *Tri6* de *F. graminearum*. Para o ensaio foram utilizadas três linhagens contendo a construção RNAi-Chs3b (HIGS005, HIGS009 e HIGS017), duas linhagens com a construção RNAi-Cyp51-Tri (HIGS023 e HIGS056), uma linhagem que foi bombardeada com partículas sem DNA (HIGS019) e como controles as cultivares Bobwhite e BRS Guamirim, inoculado e não inoculado. As amostras das espigas foram coletadas seis dias após serem inoculadas, no início do surgimento dos sintomas, e guardadas para a análise de expressão por meio de RT-qPCR. As linhagens transgênicas foram selecionadas ao final das avaliações dos sintomas da doença. Duas espigas foram coletadas por linhagem transgênica (replicatas biológicas).

O RNA foi extraído utilizando RNazol (Sigma-Aldrich), seguindo protocolo do fabricante. A quantificação e determinação da pureza das amostras foi realizada com espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific) na absorbância de A260/A280. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose TAE 1,2%. A presença de contaminação por DNA genômico foi detectada por PCR utilizando os primers que amplificam um fragmento de 92 pb do gene de trigo *TaPUROIND* e que amplificam um fragmento de 140 pb do gene da actina de *F. graminearum* (Tabela 5). A reação de PCR

constou de 0,5 μL de RNA total, 1,8 μL de MgCl_2 25 mM, 1,6 μL de dNTP 10 mM, 0,4 μL de cada primer a 10 μM , 0,1 μL de Taq polimerase GoTaq Flexi (Promega), 4 μL de tampão 5X e 11,2 μL de água Milli Q. As etapas de termociclagem foram de 94 °C por 3 min, 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 54 °C por 30 s e 68 °C por 45 s, e extensão final de 68 °C por 5 min. Para eliminar a contaminação com DNA genômico, as amostras foram tratadas com RQ1 RNase-Free DNase (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Para eliminar a enzima DNase, as amostras foram adicionadas de mesmo volume de acetato de amônio 5M, purificadas com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), precipitado com isopropanol, lavado com etanol 75% e ressuspenso em água livre de RNase. A ausência de DNA foi confirmada com a repetição da PCR com os mesmos pares de primers. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o Kit GoScript Reverse Transcription System (Promega), seguindo as instruções do fabricante, utilizando primer oligo dT para produzir cDNA a partir de RNA mensageiro, que contém cauda poli-A. Para verificar a ocorrência da síntese, foi realizada PCR utilizando os primers que amplificam um fragmento do gene *Cyp51B* do fungo, de 170 pb a partir do cDNA e 225 pb do DNA genômico (Tabela 5), devido à presença de um intron, que é retirado por splicing no mRNA maduro. A reação de PCR foi a mesma, com exceção dos primers e dentre as etapas da termociclagem, diferiu da acima citada na temperatura do anelamento, que foi de 60 °C.

A eficiência de amplificação de cada um dos primers (Tabela 5) para RT-qPCR foi determinada com base na curva padrão gerada pelo valor de C_T (ciclo que a amplificação é detectada) e log da quantidade inicial do cDNA. Nas reações de amplificação foram utilizadas diluições seriadas de 1:5 do cDNA (molécula molde), sendo elas: 1, 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125, 1/15625, utilizando cDNA de Bobwhite inoculado. A reação para RT-qPCR foi de 20 μL , contendo 10 μL de 2X PowerUp SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 0,9 μL de cada um dos primers forward e reverse (Tabela 5) na concentração de 10 μM , 5 μL de cDNA e 3,2 μL de água Milli-Q. As reações foram em duplicatas para cada diluição. A concentração da amostra não diluída (diluição 1) foi de 20 ng/ μL (relativo ao RNA total inicial). Foi utilizado o método da quantificação absoluta para determinar a curva padrão, contendo a curva de

dissociação ao final da termociclagem, no equipamento ABI 7500 Real Time PCR System, contendo o 7500 System SDS Software v.2.0.6. A eficiência da amplificação foi calculada pela fórmula Eficiência = $10^{(-1/\text{slope})} - 1$, em que slope é o coeficiente angular da curva.

Tabela 5 - Primers utilizados na análise de expressão dos genes alvo para HIGS em *Fusarium graminearum* isolado CML3066, Passo Fundo - RS, 2020

Primer	Sequência (5' - 3')	Amplicon ¹ (pb)	Referência
FgCYP51A4 F	5'CCTTTGGTGCCGGTAGACAT3'	183 / 183	
FgCYP51A4 R	5'CCCATCGAATAAACGCAGGC3'		
FgCYP51B_F	5'TCTACACCGTTTCTCACTACTCC3'	170 / 225	Koch et al. (2013)
FgCYP51B R	5'GCTTCTCTTGAAGTAATCGC3'		
FgCYP51C2 F	5'CGAGTCCCTGGCACTGAATG3'	192 / 192	
FgCYP51C2 R	5'GCTCATCACCCCAAACCGT3'		
FgChs3b789 F	5'CGACGGTATTGATAAGGCTGACA3'	145 / 145	Cheng et al. (2015)
FgChs3b933 R	5'GGTGACGGAAAGTTGGGAGG3'		
FgTri5_F	5'GATGAGCGGAAGCATTTCC3'	110 / 110	
FgTri5 R	5'CGCTCATCGTCGAATTCC3'		
FgTri6_F	5'TGTCGCTACTCAGAATGCC3'	169 / 169	Brown et al. (2011)
FgTri6 R	5'CCCTGCTAAAGACCCTC3'		
FgTubulin_F	5'TCAACATGGTGCCCTTCC3'	127 / 127	
FgTubulin_R	5'TTGGGGTCGAACATCTGC3'		
FgActin F	5'ATGGTGTCACCTCACGTTGTCC3'	141 / 141	
FgActin R	5'CAGTGGTGGAGAAGGTGTAACC3'		
RT TaPUROIND F	5'CTTTGAAATCTCGGCTACACACA3'	92	Kovalchuk et al. (2013)
RT TaPUROIND R	5'TGCGGCCAGACATGCA		

¹Amplicon em cDNA/DNA genômico.

Os primers para detectar os genes alvo em *F. graminearum* amplificam em local distinto das regiões utilizadas para as construções gênicas para RNAi, a fim de não amplificar os transcritos oriundos dos transgenes inseridos no genoma das plantas, amplificando somente o cDNA dos transcritos provenientes do fungo.

Foi utilizado o método da quantificação relativa, por meio da equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), também com a análise da curva de dissociação e o uso do mesmo equipamento e software para a geração dos dados. Todas as amostras tiveram triplicatas técnicas e duplicatas biológicas. Os genes para β -tubulina e actina foram analisados como controle endógeno, sendo selecionado o segundo. A amostra Bobwhite

não inoculado BWR2E6 foi utilizada como amostra de referência, sendo analisada em todas as placas que compunham o experimento. Os dados foram analisados utilizando as ferramentas disponíveis no site Thermo Fisher Cloud (<https://www.thermofisher.com>). As médias foram comparadas pelo teste T ao nível de significância de 5%.

3.3.16 Análise dos dados provenientes dos ensaios de inoculação em trigo

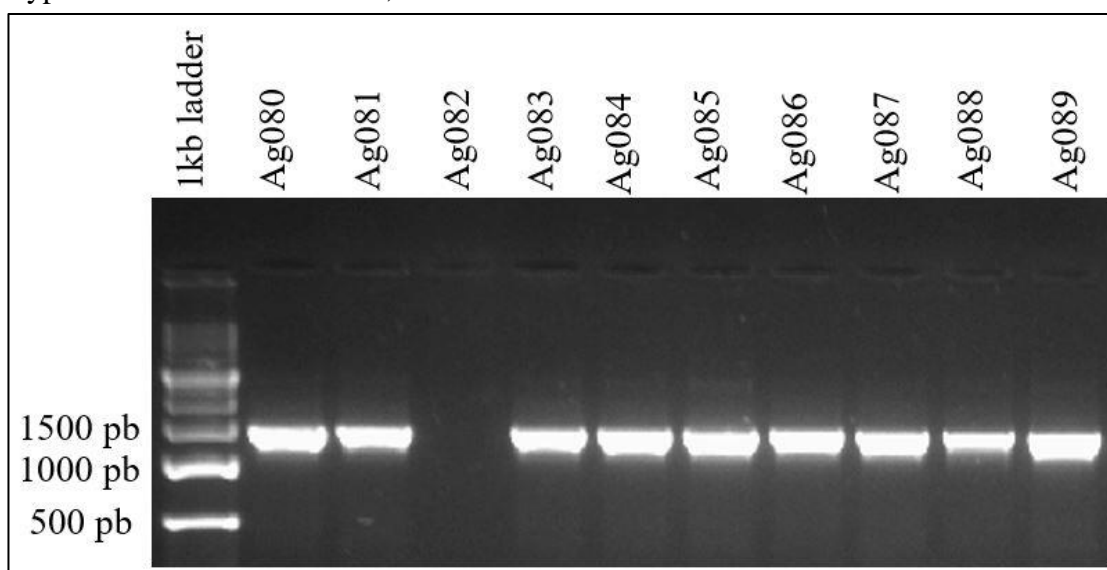
Os dados severidade, AACPD, porcentagem de grãos giberelados, peso de grãos, foram submetidos ao teste de normalidade dos erros ($p < 0,05$) e homogeneidade de variâncias. Sendo as pressuposições básicas não satisfeitas, os dados foram transformados, se não atendendo as pressuposições básicas para realização de teste paramétrico, foi realizado de teste não-paramétrico, os dados foram submetidos à análise de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), teste não paramétrico análogo ao teste F utilizado na Análise de variância. Enquanto ANOVA depende da hipótese de que todas as populações em confronto são independentes e normalmente distribuídas, o teste de Kruskal-Wallis não coloca esta restrição para a análise. Assim, efetuamos o teste de Kruskal-Wallis, onde as N observações das k amostras são ranqueadas da menor para a maior observação e considera-se os postos ocupados pelas observações. Para verificar a diferença entre as linhagens e os controles procedeu-se o teste post hoc de Wilcoxon com p . valor ajustado pelo método de Bonferroni. Todas as análises foram realizadas no programa R (R Core Team) - RStudio® Version 3.4.3. utilizando o pacote ExpDes.pt.

3.4 Resultados

3.4.1 Construção gênica RNAi-Cyp51-Tri em arabidopsis

No total foram selecionadas 13 plantas T0 com a construção RNAi-Cyp51-Tri, as quais foram confirmadas por PCR quanto à presença do transgene. Como exemplo, é mostrado o resultado da PCR para 10 plantas selecionadas *in vitro*. A amostra correspondente a planta Ag082 não teve a presença do transgene confirmada e foi descartada (Figura 6). As plantas transgênicas T0 foram avançadas de geração.

Figura 6 - PCR de plantas T0 de arabis transformadas contendo a construção RNAi-Cyp51-Tri. Passo Fundo - RS, 2017



Fonte: Imagem do Autor.

Nota: PCR de amostras de 10 plantas, selecionadas *in vitro* e aclimatadas em câmara de crescimento. Os primers RNAi3.F1 (5' CGGTTGACTTGCGCCTTCTTG 3') e OCst.R (5' ATCATGCGATCATAGGCGTCTC 3') foram usados para a detecção da sequência transgênica de 1359 pb, proveniente da construção RNAi-Cyp51-Tri.

As sementes da geração T1 foram semeadas para verificar a segregação da tolerância ao glufosinato de amônio e inferir o número de inserções. As progênies T1 de 13 eventos contendo a construção RNAi-Cyp51-Tri foram testadas para uma e duas cópias com as segregações esperadas de 3:1 e 15:1, plantas tolerantes (T): sensíveis (S) ao herbicida. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Os eventos Ag081, Ag088, Ag089, Ag092 e Ag097 ajustaram-se melhor à razão de 3:1, com $p.>0,05$ para o teste de qui-quadrado, enquanto os eventos Ag083, Ag084, Ag085, Ag086, Ag087 e Ag094 tiveram melhor ajuste para a razão de 15:1, com $p.>0,05$. Os eventos Ag080 e Ag093 não se ajustaram às segregações mendelianas testadas de uma e duas inserções ($p.<0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise da segregação de linhagens transgênicas T1 de *Arabidopsis thaliana* contendo a construção RNAi-Cyp51-Tri, quanto à tolerância ao herbicida glufosinato de amônio. Passo Fundo - RS, 2018

Evento	O (T:S)	E (T:S): 3:1		E (T:S):15:1	
		χ^2	<i>p.</i>	χ^2	<i>p.</i>
Ag037.1 ^a	26:0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Ag080	19:16	8,01	0,005	93,03	<0,001
Ag081	39:7	2,35	0,125	6,31	0,012
Ag083	22:2	3,56	0,059	0,18	0,673
Ag084	4:0	1,33	0,248	0,27	0,606
Ag085	47:1	13,44	0,000	1,42	0,233
Ag086	12:1	2,08	0,150	0,05	0,830
Ag087	13:1	2,38	0,123	0,02	0,890
Ag088	6:3	0,33	0,564	11,27	0,001
Ag089	19:9	0,76	0,383	32,04	<0,001
Ag092	18:7	0,12	0,729	20,18	<0,001
Ag093	15:31	44,09	<0,001	293,48	<0,001
Ag094	39:4	5,65	0,017	0,68	0,408
Ag097	30:6	7,26	0,248	6,67	0,010

Fonte: Dados do autor.

Nota: Proporção observada (O) de plantas tolerantes (T) e sensíveis (S) 15 dias após aplicação, proporção testada/esperada (E), valor de Qui-quadrado (χ^2), probabilidade do teste de qui-quadrado (*p.*). ^aLinhagem transgênica homocigota T2 (vetor vazio). As células sombreadas indicam o valor *p.* do padrão de segregação mais significativo.

Foram avançadas de geração 10 eventos. Na Tabela 7 estão apresentados os resultados da segregação quanto à tolerância ao herbicida glufosinato de amônio das plantas contendo a construção RNAi-Cyp51-Tri, da geração T2, onde foram testadas as proporções esperadas para uma inserção (tolerante/sensível (T:S): 1:0, 3:1 e 0:1) e duas inserções (T:S: 1:0, 15:1 e 0:1) na geração T2. A segregação apresentada é a com maior probabilidade quanto ao teste de qui-quadrado.

As linhagens provenientes dos eventos Ag088 e Ag089 não se ajustaram ao modelo inicialmente proposto de 3:1. Dentre as linhagens do evento Ag088, apenas três delas tiveram algumas poucas plantas sobreviventes e foram descartadas. Nenhuma planta do evento Ag089 sobreviveu à seleção (Tabela 7).

Tabela 7 - Análise da segregação de linhagens transgênicas T2 contendo a construção RNAi-Cyp51-Tri, quanto à tolerância ao herbicida glufosinato de amônio. Passo Fundo - RS, 2018

Linhagem	O (T:S)	E (T:S)	χ^2	<i>p</i> .	Linhagem	O (T:S)	E (T:S)	χ^2	<i>p</i> .
Ag081.1	26:11	3:1	0,44	0,506	Ag088.3	0:25	0:1	n.a.	n.a.
Ag081.2	16:18	3:1	14,16	<0,001	Ag088.4	1:28	3:1	79,18	<0,001
Ag081.3	21:4	3:1	1,08	0,299	Ag088.5	0:17	0:1	n.a.	n.a.
Ag081.4	19:14	3:1	5,34	0,021	Ag088.6	0:41	0:1	n.a.	n.a.
Ag081.5	15:0	1:0	n.a.	n.a.	Ag089.1	0:30	0:1	n.a.	n.a.
Ag081.6	26:7	3:1	0,25	0,615	Ag089.2	0:23	0:1	n.a.	n.a.
Ag083.1	18:18	3:1	12,00	<0,001	Ag089.3	0:26	0:1	n.a.	n.a.
Ag083.2	22:9	3:1	0,27	0,604	Ag089.4	0:18	0:1	n.a.	n.a.
Ag083.3	27:12	3:1	0,69	0,405	Ag089.5	0:25	0:1	n.a.	n.a.
Ag083.4	21:11	3:1	1,50	0,221	Ag089.6	0:29	0:1	n.a.	n.a.
Ag083.5	12:5	3:1	0,18	0,674	Ag092.1	28:10	3:1	0,04	0,851
Ag083.6	8:23	3:1	40,01	<0,001	Ag092.2	18:8	3:1	0,46	0,497
Ag084.1	21:11	3:1	1,50	0,221	Ag092.3	36:1	15:1	0,79	0,373
Ag084.2	20:20	3:1	13,33	<0,001	Ag092.4	19:4	3:1	0,71	0,399
Ag084.3	24:12	3:1	1,33	0,248	Ag092.5	29:4	15:1	1,94	0,164
Ag084.4	18:8	3:1	0,46	0,497	Ag092.6	20:9	3:1	0,56	0,453
Ag086.1	20:13	3:1	3,65	0,056	Ag093.1	25:12	3:1	1,09	0,296
Ag086.2	21:13	3:1	3,18	0,075	Ag093.2	0:20	0:1	n.a.	n.a.
Ag086.3	28:5	3:1	1,71	0,191	Ag093.3	30:5	3:1	2,14	0,143
Ag086.4	20:21	3:1	15,03	<0,001	Ag093.4	11:3	3:1	0,10	0,758
Ag086.5	30:0	1:0	n.a.	n.a.	Ag093.5	30:1	15:1	0,48	0,487
Ag086.6	21:3	15:1	1,60	0,206	Ag093.6	8:20	3:1	32,19	<0,001
Ag087.1	22:23	3:1	16,36	<0,001	Ag094.1	28:6	3:1	0,98	0,322
Ag087.2	21:20	3:1	12,37	<0,001	Ag094.2	18:6	3:1	0,00	1,000
Ag087.3	3:3	3:1	2,00	0,157	Ag094.3	5:10	3:1	13,89	<0,001
Ag087.4	23:18	3:1	7,81	<0,001	Ag094.4	24:2	15:1	0,09	0,761
Ag087.5	32:24	3:1	9,52	<0,001	Ag094.5	0:43	0:1	na	na
Ag087.6	25:16	3:1	4,30	0,038	Ag094.6	18:14	3:1	6,00	0,014
Ag088.1	3:31	3:1	79,41	<0,001	Ag094.7	3:20	3:1	47,09	<0,001
Ag088.2	3:34	3:1	88,30	<0,001	Ag094.8	8:24	3:1	42,67	<0,001

Fonte: Dados do autor.

Nota: Proporção observada (O) de plantas tolerantes (T) e sensíveis (S) 15 dias após aplicação, proporção testada/esperada (E), valor de Qui-quadrado (χ^2), probabilidade do teste de qui-quadrado (*p*.).

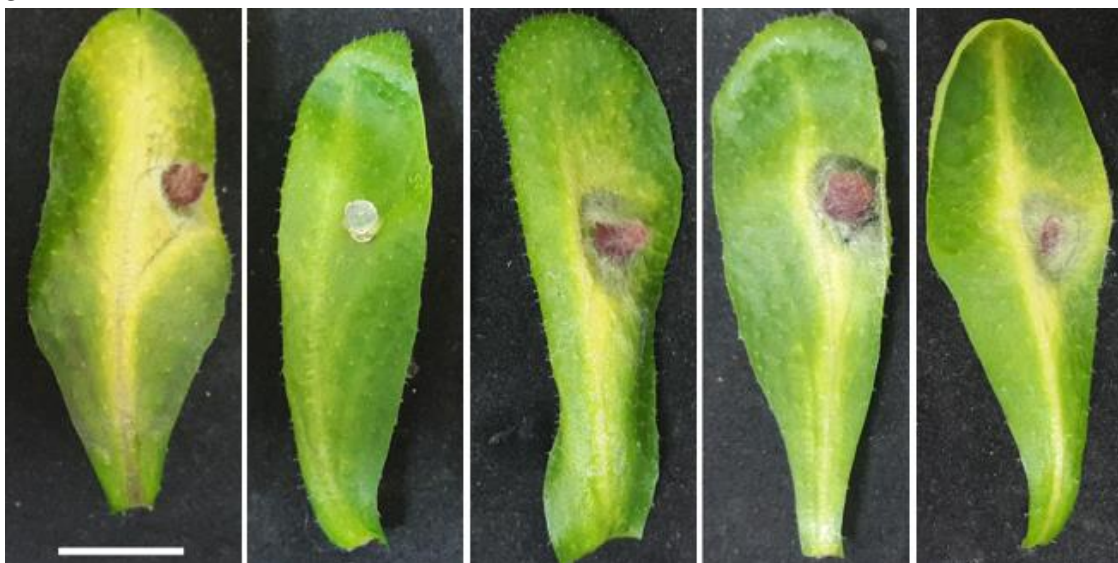
Para compor o teste de inoculação foram selecionadas as linhagens T2 transgênicas Ag081.3, Ag083.3, Ag084.3, Ag086.5, Ag087.6, Ag092.3, Ag093.5 e Ag094.1. O critério de seleção foi baseado no número predito de inserções do transgene, no número de plantas disponíveis após a seleção.

Linhagens homozigotas e hemizigotas de oito eventos transgênicos independentes contendo a construção RNAi-Cyp51-Tri, uma linhagem transgênica homozigota com o T-DNA do vetor pMLBART (evento Ag037) e controle não transgênicas foram analisadas quanto a resistência à infecção por *F. graminearum* em folhas destacadas. As linhagens T2 Ag081.3, Ag083.3, Ag084.3, Ag086.5, Ag087.6, Ag092.3, Ag093.5 Ag094.1 e os controles (Ag037.1 e genótipo silvestre - Ler) foram inoculadas com *F. graminearum*.

O aparecimento dos sintomas em folhas destacadas iniciou-se a partir de 24 horas, apresentando cloroses em torno do local inoculado, visualmente não foi observado diferença no período de incubação entre plantas contendo a construção RNAi-Cyp51-Tri e plantas controle, uma vez que os sintomas iniciaram uniformemente entre os tratamentos. Aos 3 dpi, tanto as plantas transgênicas quanto os controles inoculados (Ler inoc. e Ag037.1) apresentaram crescimento de micélio aéreo e no controle Ler não inoculado não foi observado contaminação (Figura 7).

Ao final de 3 dpi, a média de severidade em folhas destacadas de plantas transgênicas contendo a construção gênica RNAi-Cyp51-Tri variou de 24,9 a 35,1%, sendo a menor severidade média observada na linhagem Ag083.3 e a maior observada na Ag093.5. Os controles Ler inoculado (Ler inoc.) e plantas transformadas com o vetor pMLBART vazio (Ag037.1) apresentaram média de 42,9 e 30,05%, enquanto o controle Ler (sem o inóculo) não apresentou sintomas da doença, com média de 2,44% (representa a área onde se localizava o disco de meio de cultura) (Figura 7, Figura 8).

Figura 7 - Resposta em folhas destacadas de linhagens transgênicas T2 de *Arabidopsis thaliana* contendo a construção gênica RNAi-Cyp51-Tri à inoculação com *Fusarium graminearum* isolado CML3066. Passo Fundo - RS, 2019



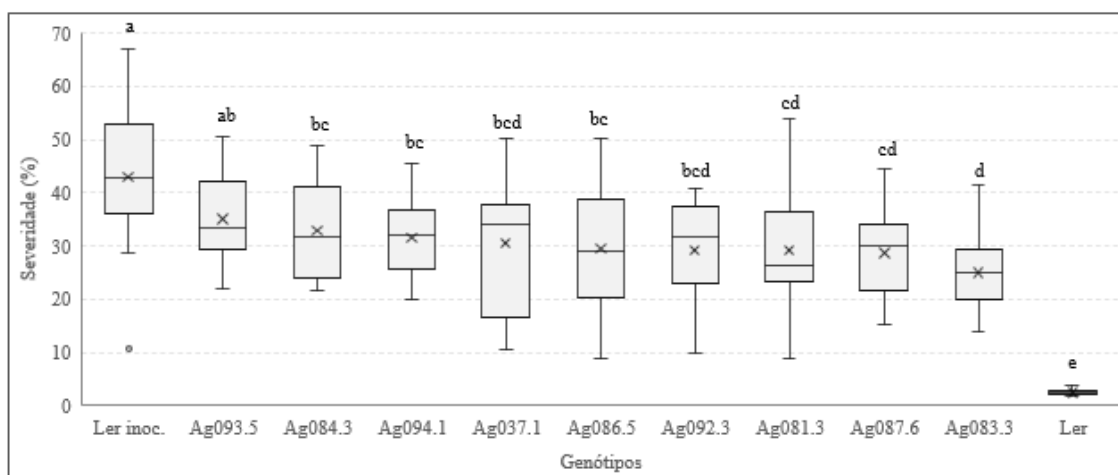
Fonte: Imagens do Autor.

Nota: Folhas representam a média de severidade quantificada via Software ImageJ três dias após a inoculação com discos de cultura de *F. graminearum* CML3066, de 3 mm de diâmetro. Da esquerda para direita: controle Ler inoculado, Ler não inoculado, Ag037.1 (vetor vazio), Ag083.3, Ag087.6. Barra = 1 cm.

Houve diferença significativa entre os tratamentos em relação à severidade ($\chi^2_{(10)}=62,172$; $p.<0,001$), sendo que apenas uma linhagem transgênica (Ag093.5) teve severidade igual ao controle Ler inoculado ($p.<0,05$). Nenhuma das linhagens transgênicas mostrou redução significativa comparada ao controle Ag037.1, sendo que apenas a linhagem Ag093.5 apresentou aumento significativo em relação ao mesmo. Todas as linhagens transgênicas foram estatisticamente diferentes do controle Ler não inoculado (Figura 8).

Inflorescências das mesmas linhagens foram inoculadas e avaliadas. Aos 15 dpi foi verificado que ambos os controles mostraram sintomas característicos, em que apresentavam uma grande quantidade de micélio aéreo de *F. graminearum* sobre suas inflorescências e siliquis.

Figura 8 - Severidade de *Fusarium graminearum* em folhas destacadas de linhagens transgênicas T2 de *Arabidopsis thaliana* Ler contendo a construção gênica RNAi-Cyp51-Tri. Passo Fundo - RS, 2019



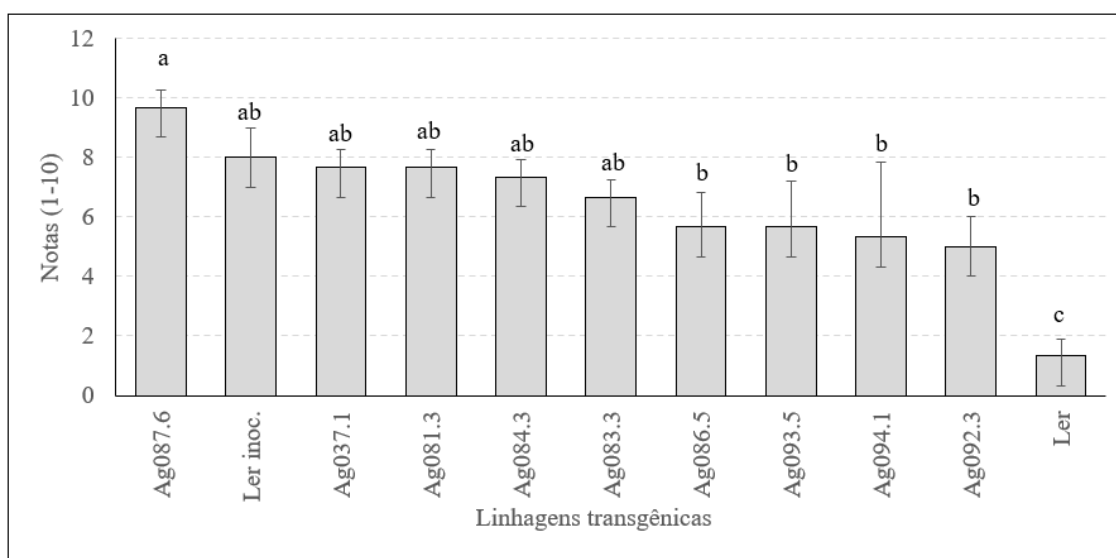
Fonte: Dados do Autor.

Nota: O símbolo “x” dentro do boxplot representa a média. Letras distintas sobre o boxplot indicam diferença significativa pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). As folhas destacadas foram inoculadas com disco de meio de cultura de 3 mm contendo *F. graminearum* e avaliadas 3 dias após a inoculação.

Tanto as plantas não transgênicas inoculadas, quanto as plantas controle com vetor vazio (Ag037.1), obtiveram notas elevadas com média de 8 e 7,66, respectivamente (Figura 9). A média das notas entre as linhagens transgênicas variou de 5 a 9,66, a linhagem transgênica que teve a menor média foi a Ag092-5, enquanto a maior média de nota foi observada na linhagem Ag087-6 (Figura 9). Embora as plantas não inoculadas (Ler) tenham ficado separadas fisicamente das plantas inoculadas, apresentaram crescimento micelial ao final do período de avaliação, o que caracterizou contaminação dessas plantas, ficando com média de 1,33.

O teste F mostrou haver diferença significativa ($F_{cal}=11,129$, $Pr > F_c = < 0,001$) entre os tratamentos inoculados com suspensão de esporos de *F. graminearum*. Nenhum genótipo transgênico mostrou diferença estatística significativa em relação aos controles Ler inoc e Ag037.1. Todos os tratamentos apresentaram diferença em relação ao controle não inoculado Ler (Figura 9).

Figura 9 - Severidade de *Fusarium graminearum* em inflorescências de linhagens transgênicas de *Arabidopsis thaliana* (Ler) contendo a construção gênica RNAi-Cyp51-Tri, inoculadas. Passo Fundo - RS, 2019



Fonte: Dados do Autor.

Nota: Letras distintas sobre as colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As inflorescências foram inoculadas com suspensão de esporos a 5×10^4 conídios/ml de *F. graminearum* e avaliadas 15 dias após a inoculação. Notas (1-10), escala adaptada de Nalam, Sarowar e Shah (2016).

Aos 15 dpi foi realizada a quantificação de DON nas inflorescências destas plantas transgênicas. A média do experimento foi de $14.905 \mu\text{g/kg}$ e a mediana de $14.437 \mu\text{g/kg}$, a média entre as linhagens transgênicas contendo a construção gênica RNAi-Cyp51-Tri variou de 8.876 a $33.141 \mu\text{g/kg}$, respectivamente para as linhagens Ag094.1 e Ag087.6. As linhagens Ag084.3, Ag093.5, Ag092.3, Ag081.3, Ag094.1 e Ag086.5 tiveram redução no acúmulo de DON em inflorescências em relação à Ler inoculado de 18,9, 29,9, 40,0, 48,6, 53,0 e 60,6%, respectivamente (Tabela 8).

Conforme constatado durante a avaliação da severidade, houve contaminação nas inflorescências no controle Ler não inoculado (Ler) com o fungo, e, de acordo com o fato, observou-se que a amostra correspondente apresentou $638 \mu\text{g/kg}$, Mesmo assim, ficou com níveis muito abaixo (3,37%) do controle inoculado (Ler inoc.) com média de $18.898 \mu\text{g/kg}$ (Tabela 8).

Tabela 8 - Quantificação de deoxinivalenol (DON) em inflorescências de linhagens transgênicas de *Arabidopsis thaliana* contendo a construção gênica RNAi-Cyp51-Tri inoculadas com *Fusarium graminearum* CML 3066. Passo Fundo - RS, 2018

Genótipo	DON (µg/kg)		
	Média (Ep)	Mediana (IQR)	
Ag087.6	33.141 (4,400)	34.171 (7,570)	a
Ag037.1	20.967 (1,632)	21.333 (2,810)	ab
Ag083.3	23.882 (5,446)	20.893 (9,072)	ab
Ler inoc.	18.898 (3,376)	17.542 (5,730)	abc
Ag084.3	15.322 (4,228)	12.768 (6,982)	bcd
Ag093.5	13.241 (5,918)	18.961 (8,974)	bcd
Ag092.3	11.331 (3,360)	10.361 (5,759)	cd
Ag081.3	9.718 (635)	9.669 (1,100)	cde
Ag094.1	8.876 (4,520)	5.442 (7,242)	de
Ag086.5	7.440 (1,689)	6.989 (2,808)	de
Ler	638 (86)	681 (146)	e
MÉDIA	14,905	14,427	

Fonte: Dados do Autor.

Nota: Ep (Erro padrão), IQR (Intervalo interquartilico), tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p.<0,05$). As inflorescências foram inoculadas com suspensão de esporos a 5×10^4 conídios/ml de *F. graminearum* e coletadas 15 dias após a inoculação.

Foi identificada diferença significativa entre os tratamentos em relação a quantidade de DON ($\chi^2_{(10)}=22,495$; $p.=0,012$). As linhagens transgênicas contendo a construção gênica RNA-Cyp51-Tri Ag094.1 e Ag086.5 apresentaram diferença estatisticamente significativa com relação aos níveis de DON do controle à Ler inoculado com *F. graminearum* CML3066. As linhagens Ag081.3, Ag094.1, Ag086.5 não apresentaram diferença significativa em relação ao controle não inoculado (Ler) (Tabela 8).

3.4.2 Construção gênica RNAi-Chs3b em arabidopsis

Foram selecionadas 26 plantas T0, as quais foram confirmadas por PCR quanto à presença do transgene RNAi-Chs3b e avançadas de geração. As progênies T1 dos eventos contendo a construção RNAi-Chs3b (Ag017, Ag025, Ag098, Ag099, Ag101, Ag105, Ag107, Ag109) foram analisadas quanto a segregação do transgene para uma e duas

cópias com as segregações esperadas de 3:1 e 15:1, os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Análise da segregação de linhagens transgênicas T1 de *Arabidopsis thaliana* contendo a construção RNAi-Chs3b, quanto à tolerância ao herbicida glufosinato de amônio. Passo Fundo - RS, 2018

Evento	O (T:S)	E (T:S): 3:1		E (T:S):15:1	
		χ^2	<i>p</i> .	χ^2	<i>p</i> .
Ag037	27:0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Ag017	32:9	0,20	0,652	17,25	<0,000
Ag025	36:4	4,80	0,028	0,96	0,327
Ag098	38:7	2,14	0,143	6,65	0,010
Ag099	26:13	1,44	0,229	48,82	<0,000
Ag101	25:12	1,09	0,296	43,29	<0,000
Ag105	38:12	0,03	0,870	26,89	<0,000
Ag107	28:12	0,53	0,465	38,51	<0,000
Ag109	12:30	48,29	<0,000	304,51	<0,000

Fonte: Dados do autor.

Nota: Proporção observada (O) de plantas tolerantes (T) e sensíveis (S) 15 dias após aplicação, proporção testada/esperada (E), valor de Qui-quadrado (χ^2), probabilidade do teste de qui-quadrado (*p*). As células sombreadas indicam o valor *p*. do padrão de segregação mais significativo.

A segregação dos eventos Ag017, Ag098, Ag099, Ag101, Ag105, Ag107, ajustou-se melhor a 3:1, enquanto o evento Ag025 teve melhor ajuste para a segregação de 15:1. O evento Ag109 não se ajustou às hipóteses testadas de uma e duas inserções (Tabela 9).

O avanço de geração foi realizado e as linhagens foram analisadas quanto a segregação do transgene. Na Tabela 10 são apresentados os resultados da segregação das linhagens contendo a construção RNAi-Chs3b, na geração T2, onde foram testadas as proporções esperadas para uma inserção (tolerante/sensível (T:S): 1:0, 3:1 e 0:1) e duas inserções (tolerante/sensível (R:S): 1:0, 15:1 e 0:1). A segregação apresentada é a com maior probabilidade quanto ao teste de qui-quadrado.

Tabela 10 - Análise da segregação de linhagens transgênicas T2 contendo a construção RNAi-Chs3b, quanto à tolerância ao herbicida glufosinato de amônio. Passo Fundo - RS, 2018

Linhagem	O (T:S)	E (T:S)	χ^2	<i>p</i> .	Linhagem	O (T:S)	E (T:S)	χ^2	<i>p</i> .
Ag098.1	24:17	3:1	5,93	0,015	Ag105.6	26:15	3:1	2,93	0,087
Ag098.2	17:12	3:1	4,15	0,042	Ag105.7	38:6	3:1	3,03	0,082
Ag098.3	28:4	15:1	2,13	0,144	Ag105.8	30:13	3:1	0,63	0,428
Ag098.4	20:13	3:1	3,65	0,056	Ag107.1	19:17	3:1	9,48	0,002
Ag098.5	26:0	1:0	n.a.	n.a.	Ag107.2	23:13	3:1	2,37	0,124
Ag098.6	33:9	3:1	0,29	0,593	Ag107.3	16:15	3:1	9,04	0,003
Ag098.7	25:8	3:1	0,01	0,920	Ag107.4	2:24	3:1	62,82	<0,000
Ag098.8	14:8	3:1	1,52	0,218	Ag107.5	0:42	0:1	n.a.	n.a.
Ag099.1	18:3	3:1	1,29	0,257	Ag107.6	5:40	3:1	97,96	<0,000
Ag099.2	33:15	3:1	1,00	0,317	Ag107.7	0:39	0:1	n.a.	n.a.
Ag099.3	22:9	3:1	0,27	0,604	Ag107.8	0:47	0:1	n.a.	n.a.
Ag099.4	20:21	3:1	15,03	<0,000	Ag109.1	10:17	3:1	20,75	<0,000
Ag099.5	21:10	3:1	0,87	0,351	Ag109.2	26:14	3:1	2,13	0,144
Ag099.6	28:11	3:1	0,21	0,644	Ag109.3	20:8	3:1	0,19	0,663
Ag099.7	35:2	15:1	0,05	0,832	Ag109.4	28:14	3:1	1,56	0,212
Ag099.8	30:7	3:1	0,73	0,393	Ag109.5	19:23	3:1	19,84	<0,000
Ag101.1	21:7	3:1	0,00	1,000	Ag109.6	20:16	3:1	7,26	0,007
Ag101.2	20:9	3:1	0,56	0,453	Ag017.4.1	28:14	3:1	1,56	0,212
Ag101.3	28:4	15:1	2,13	0,144	Ag017.4.2	0:41	0:1	n.a.	n.a.
Ag101.4	19:13	3:1	4,17	0,041	Ag017.4.3	27:14	3:1	1,83	0,176
Ag101.5	23:13	3:1	2,37	0,124	Ag017.7.1	11:16	3:1	16,90	<0,000
Ag101.6	20:2	15:1	0,30	0,582	Ag017.7.2	35:3	15:1	0,18	0,675
Ag101.7	14:7	3:1	0,78	0,378	Ag017.7.3	23:5	3:1	0,76	0,383
Ag101.8	15:18	3:1	15,36	<0,000	Ag025.5.1	42:6	15:1	3,20	0,074
Ag105.1	15:6	3:1	0,14	0,705	Ag025.5.2	39:4	15:1	0,68	0,408
Ag105.2	38:5	15:1	2,12	0,145	Ag025.5.3	38:5	15:1	2,12	0,145
Ag105.3	30:13	3:1	0,63	0,428	Ag025.8.1	14:13	3:1	7,72	0,005
Ag105.4	26:11	3:1	0,44	0,506	Ag025.8.2	22:20	3:1	11,46	0,001
Ag105.5	36:9	3:1	0,60	0,439	Ag037.6	30:0	1:0	n.a.	n.a.

Fonte: Dados do autor.

Nota: Proporção observada (O) de plantas tolerantes (T) e sensíveis (S) 15 dias após aplicação, proporção testada/esperada (E), valor de Qui-quadrado (χ^2), probabilidade do teste de qui-quadrado (*p*.).

Oito eventos transgênicos independentes (Ag017, Ag025, Ag098, Ag099, Ag101, Ag105, Ag107, Ag109), uma linhagem transgênica homozigota com o T-DNA do vetor

pMLBART (evento Ag037) e plantas controle não transgênicas foram submetidas à inoculação em folhas destacadas para verificar se a construção gênica RNAi-Chs3b confere resistência à *F. graminearum*. As linhagens Ag017.7.2 e Ag025.5.2 e os controle Ag037.6 são da geração T3 e as outras linhagens são T2.

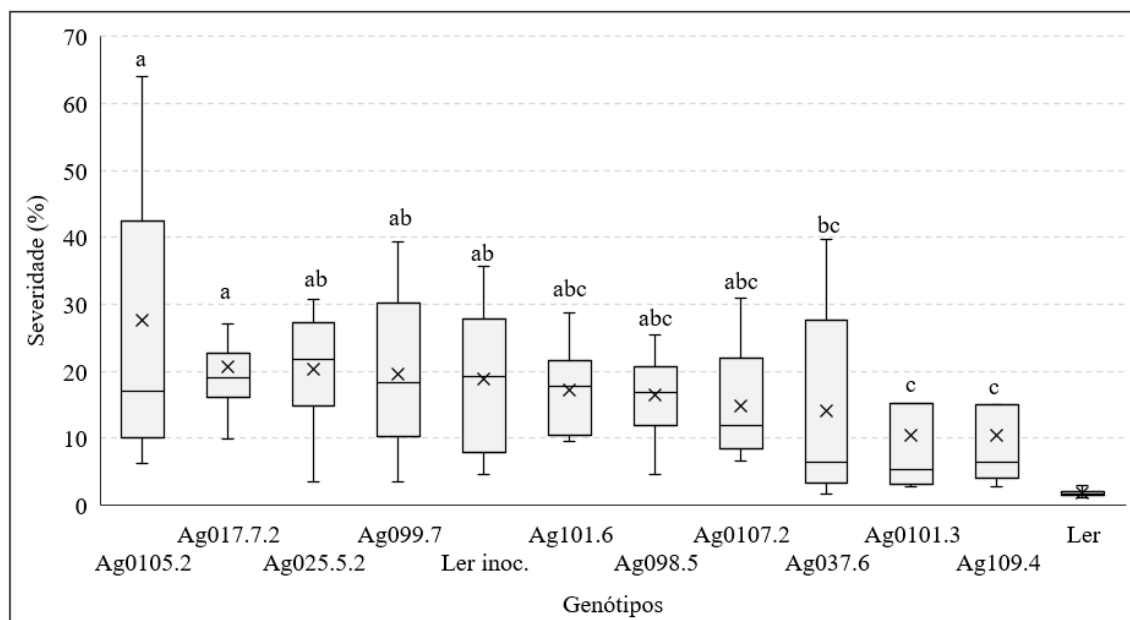
. Os sintomas em folhas destacadas iniciaram-se a partir de 24 horas após a inoculação, apresentando cloroses em torno do local inoculado. Os sintomas não foram uniformes dentro de cada genótipo. Ao final de 3 dpi a média de severidade em folhas destacadas de plantas transgênicas contendo a construção gênica RNAi-Chs3b variou de 10,4 a 27,7%, sendo a menor severidade média observada na linhagem Ag109.4 e a maior observada na Ag105.2. Os controles do experimento Ler inoculado (Ler inoc.) e plantas transformadas com o vetor pMLBART vazio (Ag037-6) apresentaram média de 18,9 e 14,2%, enquanto que o controle Ler (sem o inóculo) não apresentou sintomas da doença, com média de 1,83%, apenas quantificado a área em contato com o disco.

Diferença significativa foi verificada entre os genótipos em relação a severidade ($\chi^2_{(11)}=44,863$; $p.<0,001$). As linhagens transgênicas Ag109.4 e Ag101.3 apresentaram redução significativa em relação controle Ler inoc. (Figura 10). Os genótipos Ag105.2 e Ag017.7.2 apresentaram maior suscetibilidade em relação ao controle Ag037.6. Nenhum dos genótipos transgênicos mostrou diferença significativa para o controle Ag037.6. Todas as linhagens transgênicas foram estatisticamente diferentes do controle não inoculado (Ler).

Inflorescências das mesmas linhagens e controles foram inoculadas. Aos 15 dias após a inoculação, as inflorescências do controle Ag037.6 apresentaram sintomas característicos, com micélio de *F. graminearum* por toda inflorescência, e por toda siliqua, com uma grande quantidade de micélio aéreo. O controle Ag037.6 apresentou média de notas de 9,33, enquanto no controle Ler inoculado a média foi de 6,6. Neste último, uma das três repetições obteve nota 4, apresentado micélio por toda inflorescência, e alastrando para as síliquas, diminuindo a média (Figura 11). A média das notas entre as linhagens transgênicas variou de 6,66 a 9,33, a linhagem transgênica

que teve a menor média foi a Ag017.7.2, enquanto a maior média de nota foi observada na linhagem Ag098-5 (Figura 11).

Figura 10 - Severidade de *Fusarium graminearum* em folhas destacadas de linhagens transgênicas T2 de *Arabidopsis thaliana* Ler contendo a construção gênica RNAi-Chs3b. Passo Fundo - RS, 2019

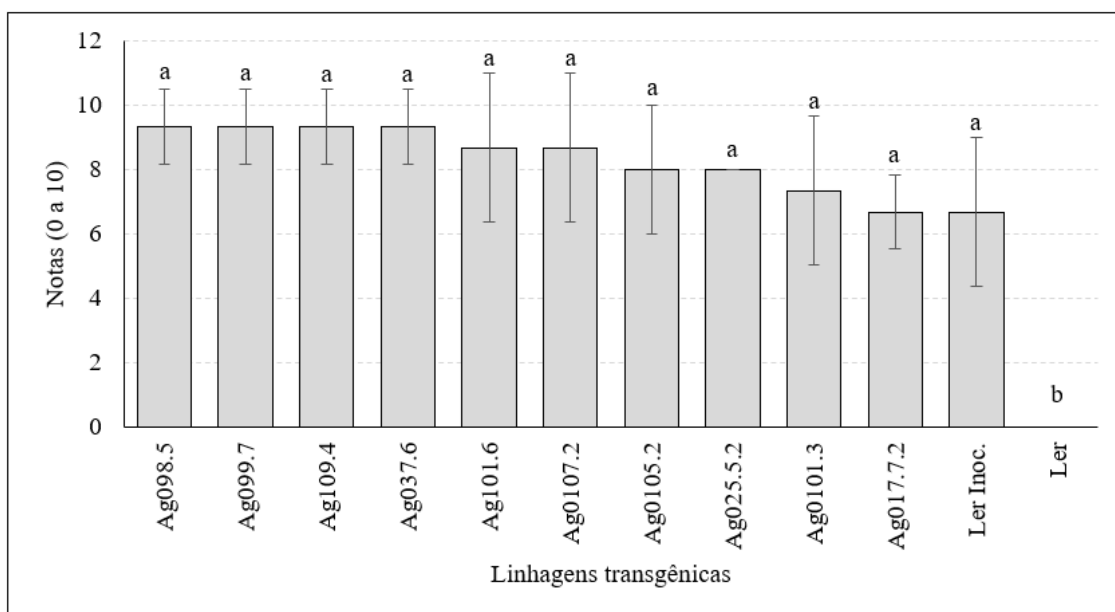


Fonte: Dados do Autor.

Nota: O símbolo “x” dentro do boxplot representa a média. Letras distintas sobre o boxplot indicam diferença significativa pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). As folhas destacadas foram inoculadas com disco de meio de cultura de 3 mm contendo *F. graminearum* e avaliadas 3 dias após a inoculação.

O teste F mostrou haver diferença significativa entre os tratamentos ($F_{cal}=7,5871$, $Pr > F_c = < 0,001$). Nenhum genótipo transgênico mostrou diferença estatística significativa para ambos os controles Ler inoc. e Ag037.6 pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Todos os tratamentos foram diferentes do controle não inoculado Ler (Figura 11).

Figura 11 - Notas de severidade de *Fusarium graminearum* em inflorescências de linhagens transgênicas de *Arabidopsis thaliana* (Ler) contendo a construção gênica RNAi-Chs3b, inoculadas. Passo Fundo - RS, 2019



Fonte: Dados do Autor.

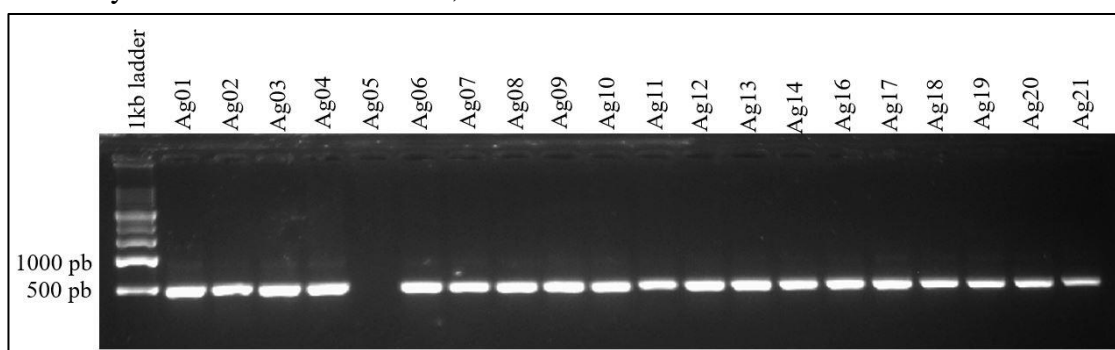
Nota: Letras distintas sobre as colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As inflorescências foram inoculadas com suspensão de esporos a 5×10^4 conídios/ml de *F. graminearum* e avaliadas 15 dias após a inoculação.

3.4.3 Construção gênica RNAi-Synchit2 em arabidopsis

No total, 21 plantas transformadas com a construção RNAi-Synchit2 (Figura 5) para expressar moléculas de dsRNA correspondentes ao gene parcial da quitina sintase de *F. verticillioides* foram selecionadas *in vitro* e aclimatadas em câmara de crescimento. Todas elas apresentaram fenótipos normais quando comparadas às plantas não GM. Uma planta (Ag015) morreu no processo de aclimação. A análise de PCR revelou a presença da construção em 19 eventos (plantas T0) (Figura 12).

Essas 19 plantas transgênicas foram autofecundadas para produzir a geração T1. Sementes de todos os eventos foram colocadas para germinar em meio MS sem seleção e uma vez germinadas transferidas para meio MS adicionado do agente seletivo higromicina e avaliadas quanto à segregação da tolerância em cada progênie.

Figura 12 - PCR de plantas T0 de *Arabidopsis thaliana* transformadas com a construção RNAi-Synchit2. Passo Fundo - RS, 2018



Fonte: Dados do Autor.

Nota: Os primers ChirnaiF (5'-AGGGCCCGGTACCTTCAGCGTATGCC-3') e ChirnaiR (5'-AGAGCTCTCTAGAGGCCAATCGAGGG-3') foram usados para a detecção da sequência transgênica de 521 pb proveniente da construção RNAi-Synchit2.

Devido a ausência de germinação e contaminação por fungos, apenas sete eventos (Ag07, Ag08, Ag10, Ag12, Ag13, Ag17, Ag21) tiveram plantas T1 que sobreviveram e produziram sementes, as quais foram selecionadas *in vitro*, aclimatadas e avançadas de geração. A análise de segregação foi possível em número limitado de progênes T1, sendo consideradas apenas aquelas com mais de 20 plantas para serem avaliadas (Tabela 11).

Tabela 11 - Análise da segregação de eventos transgênicos na geração T1 de *Arabidopsis thaliana* contendo a construção RNAi-Synchit2, quanto à tolerância ao agente seletivo higromicina. Passo Fundo - RS, 2018

Evento	O (T:S)	E (T:S): 3:1		E (T:S):15:1	
		χ^2	<i>p.</i>	χ^2	<i>p.</i>
Ag07	14:12	6.21	0.013	70.66	<0.001
Ag08	32:10	0.03	0.859	22.10	<0.001
Ag10	1:3	5.33	0.021	32.27	<0.001
Ag12	5:0	1.67	0.197	0.33	0.564
Ag13	20:13	3.65	0.056	61.87	<0.001
Ag17	31:3	4.75	0.029	0.38	0.535
Ag21	6:5	2.45	0.117	28.85	<0.001

Fonte: Dados do autor.

Nota: Proporção observada (O) de plantas tolerantes (T) e sensíveis (S) 15 dias após aplicação, proporção testada/esperada (E), valor de Qui-quadrado (χ^2), probabilidade do teste de qui-quadrado (*p.*).

Os eventos Ag08 e Ag13 ajustaram-se melhor à razão 3:1, com $p.> 0,05$ pelo teste do qui-quadrado. O evento Ag07 não se ajustou às segregações mendelianas testadas para uma e duas inserções do transgene ($p.<0,05$). O evento Ag17 ajustou-se para a proporção de 15:1 ($p. = 0,535$) (Tabela 11).

Linhagens transgênicas na geração T2 contendo o transgene RNAi-Synchit2 foram avaliadas quanto a segregação do transgene. Na Tabela 12 estão apresentados os resultados de segregação *in vitro*, onde foram testados para cada genótipo as proporções esperadas para uma inserção, com proporção tolerante/sensível (T:S): 3:1; e duas inserções, com proporção T:S: 15:1, na geração T2.

Tabela 12 - Análise da segregação de linhagens transgênicas T2 contendo a construção RNAi-Synchit2, quanto à tolerância ao herbicida higromicina. Passo Fundo - RS, 2019

(Continuação)

Linhagem	O (T:S)	E (T:S)	χ^2	$p.$	Linhagem	O (T:S)	E (T:S)	χ^2	$p.$
Ag07.1	24:1	15:1	0,216	0,642	Ag12.2	20:5	3:1	0,333	0,564
Ag07.2	25:0	1:0	n. a	n. a	Ag12.3	20:5	3:1	0,333	0,564
Ag07.3	17:8	3:1	0,653	0,419	Ag13.1	10:15	3:1	16,333	<0,001
Ag07.5	18:7	3:1	0,120	0,729	Ag13.2	12:7	3:1	1,421	0,233
Ag07.6	18:7	3:1	0,120	0,729	Ag13.3	0:17	0:1	n. a	n. a
Ag07.7	23:2	15:1	0,131	0,718	Ag13.4	3:22	3:1	52,920	<0,001
Ag07.8	25:0	1:0	n. a	n. a	Ag13.5	5:10	3:1	13,889	<0,001
Ag07.9	20:5	3:1	0,333	0,564	Ag13.6	25:0	1:0	n. a	n. a
Ag08.1	17:8	3:1	0,653	0,419	Ag13.7	4:21	3:1	46,413	<0,001
Ag08.2	21:4	3:1	1,080	0,299	Ag13.8	25:0	1:0	n. a	n. a
Ag08.3	17:4	3:1	0,397	0,529	Ag13.9	0:13	0:1	n. a	n. a
Ag08.4	16:9	3:1	1,613	0,204	Ag13.10	0:25	0:1	n. a	n. a
Ag08.5	15:10	3:1	3,000	0,083	Ag13.11	15:11	3:1	4,154	0,042
Ag08.6	14:9	3:1	2,449	0,118	Ag13.12	5:20	3:1	40,333	<0,001
Ag08.7	19:0	1:0	n. a	n. a	Ag13.13	11:14	3:1	12,813	<0,001
Ag08.8	14:9	3:1	2,449	0,118	Ag13.14	8:17	3:1	24,653	<0,001

Tabela 12 - Análise da segregação de linhagens transgênicas T2 contendo a construção RNAi-Synchit2, quanto à tolerância ao herbicida higromicina. Passo Fundo - RS, 2019
(Conclusão)

Linhagem	O (T:S)	E (T:S)	χ^2	<i>p.</i>	Linhagem	O (T:S)	E (T:S)	χ^2	<i>p.</i>
Ag08.9	16:9	3:1	1,613	0,204	Ag17.1	8:2	3:1	0,133	0,715
Ag08.10	21:4	3:1	1,080	0,299	Ag17.2	20:4	3:1	0,889	0,346
Ag08.11	17:8	3:1	0,653	0,419	Ag17.3	12:6	3:1	0,667	0,414
Ag08.12	13:9	3:1	2,970	0,085	Ag17.5	24:1	15:1	0,216	0,642
Ag08.13	21:4	3:1	1,080	0,299	Ag17.6	21:4	3:1	1,080	0,299
Ag08.14	20:5	3:1	0,333	0,564	Ag17.7	18:7	3:1	0,120	0,729
Ag08.15	21:4	3:1	1,080	0,299	Ag17.8	25:0	1:0	n.a	n.a
Ag08.16	9:3	3:1	0,000	1,000	Ag17.9	19:6	3:1	0,013	0,908
Ag10.1	18:7	3:1	0,120	0,729	Ag17.10	24:2	15:1	0,092	0,761
Ag12.1	15:10	3:1	3,000	0,083	Ag21.2	16:9	3:1	1,613	0,204

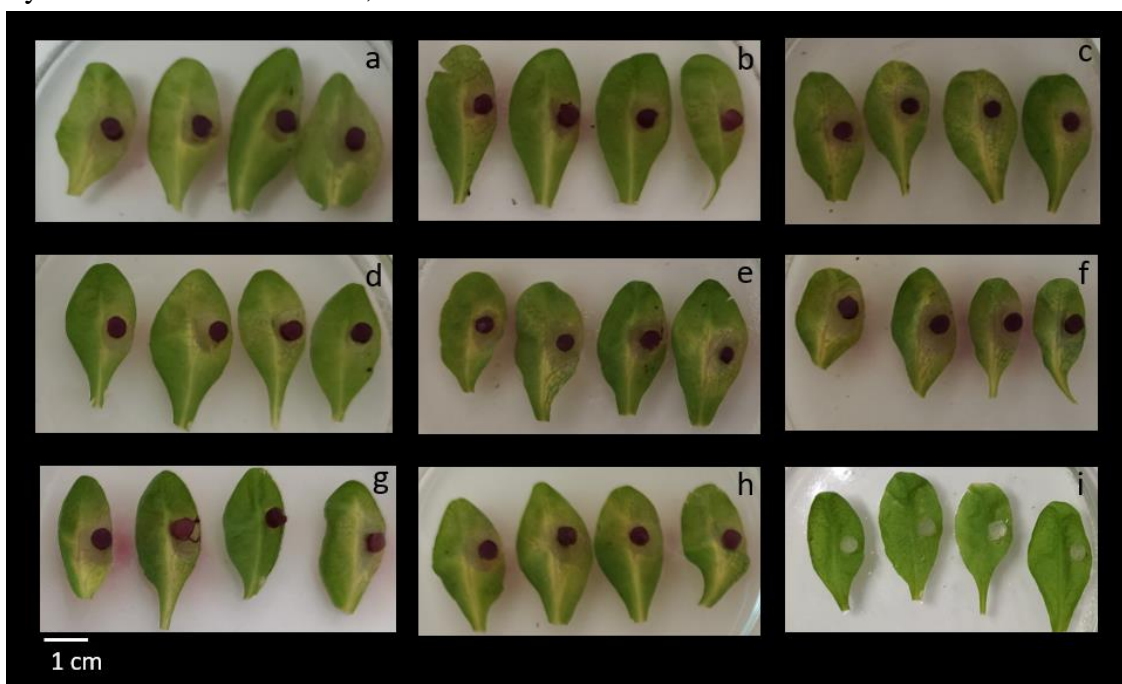
Fonte: Dados do autor.

Nota: Proporção observada (O) de plantas tolerantes (T) e sensíveis (S) 15 dias após seleção *in vitro* em meio MS contendo higromicina, proporção testada/esperada (E), valor de Qui-quadrado (χ^2), probabilidade do teste de qui-quadrado (*p.*). As células sombreadas indicam as linhagens T2 selecionadas para o ensaio de inoculação com *Fusarium graminearum*.

Linhagens transgênicas de *A. thaliana* contendo a construção gênica RNAi-Synchit2 provenientes de quatro eventos transgênicos independentes (Ag07, Ag08, Ag013, Ag017), e plantas controle não transgênicas (Ler) foram submetidas à *F. graminearum* e analisadas quanto a resistência ao patógeno.

Sintomas representativos em folhas destacadas de cada genótipo inoculado com disco de micélio de *F. graminearum* CML3066 aos 3 dpi são mostrados na Figura 13. Aos 3 dpi, a média de severidade em folhas destacadas de plantas transgênicas contendo a construção gênica RNAi-Synchit2 foi elevada, sendo superior a 50%, com médias entre 54,9 e 65,7%. (Figura 14), enquanto o controle inoculado (Ler inoc.) apresentou média de 60,4%. A média do controle não inoculado foi de 2,1%, não apresentando quaisquer sintomas da doença.

Figura 13 - Severidade de *Fusarium graminearum* em folhas destacadas de linhagens transgênicas T2 de *Arabidopsis thaliana* Ler contendo a construção gênica RNAi-Synchit2. Passo Fundo - RS, 2019

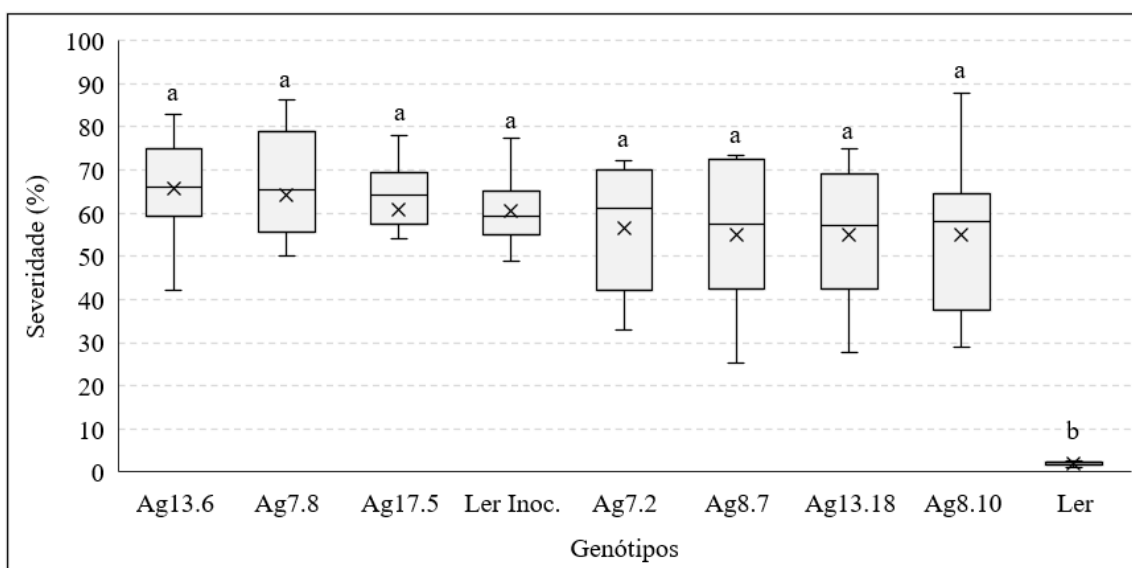


Fonte: Imagem do Autor.

Nota: Sintomas de *Fusarium graminearum* CML3066 em folhas destacadas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas com disco de micélio de 3 mm. Amostra representativa de cada genótipo aos 3 dias após inoculação. a) Controle não GM inoculado; (b) a (h) linhas transgênicas RNAi-Synchit2; b) Ag07.2, c) Ag07.8; d) Ag08,7, e) Ag08,10; f) Ag13.6, g) Ag13.8; h) Ag17.5; i) controle não GM não inoculado.

Foi identificada diferença significativa entre os genótipos em relação a severidade ($\chi^2_{(8)}=36,029$; $p.<0,001$). Não foi observada diferença entre as linhagens transgênicas contendo a construção gênica RNA-Synchit2 e Ler inoculado (Ler inoc.) quanto severidade em folhas destacadas. Todas as linhagens mostraram diferença significativa em relação ao controle não inoculado (Ler) (Figura 14).

Figura 14 - Severidade de *Fusarium graminearum* em folhas destacadas de linhagens transgênicas T2 de *Arabidopsis thaliana* Ler contendo a construção gênica RNAi-Synchit2. Passo Fundo - RS, 2019



Fonte: Dados do Autor.

Nota: O símbolo “x” dentro do boxplot representa a média. Letras distintas sobre o boxplot indicam diferença significativa pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p.<0,05$). As folhas destacadas foram inoculadas com disco de meio de cultura de 3 mm contendo *F. graminearum* e avaliadas 3 dias após a inoculação.

3.4.4 Trigo BRS Guamirim transgênico contendo as construções gênicas RNAi-Cyp51-Tri e RNAi-Chs3b

Foram selecionadas 17 linhagens transgênicas de trigo para compor os ensaios de inoculação, três linhagens possuem a construção gênica RNAi-Cyp-Tri, 12 contêm a construção RNAi-Chs3b e duas linhagens bombardeadas com partículas sem DNA, as quais foram denominadas de nulas (Tabela 3). A confirmação da presença do transgene nas plantas foi realizada via PCR (Anexo I), plantas que não mostraram amplificação do transgene foram excluídas dos ensaios de inoculação.

3.4.5 Resultados dos genótipos transgênicos de trigo inoculados com *Fusarium graminearum* isolado CM3066

Linhagens transgênicas de trigo BRS Guamirim contendo as construções gênicas RNAi-Chs3b e RNAi-Cyp-Tri foram expostas ao isolado CML3066 de *F. graminearum*. Os sintomas de giberela foram observados aos 4 dpi, com exceção de duas linhagens (HIGS009 RNAi-Chs3b e HIGS057 RNAi-Cyp51-Tri), nas quais os sintomas somente foram visíveis aos 5 dpi. No controle BRS Guamirim não inoculado, não foram observados sintomas durante o período avaliado e nos controles inoculados Bobwhite, BRS Guamirim, HIGS019 e HIGS035 os sintomas estavam presentes de maneira consistente (Figura 15).

Figura 15 - Espigas de trigo aos 24 dias após a inoculação com *Fusarium graminearum*. Passo Fundo - RS, 2020

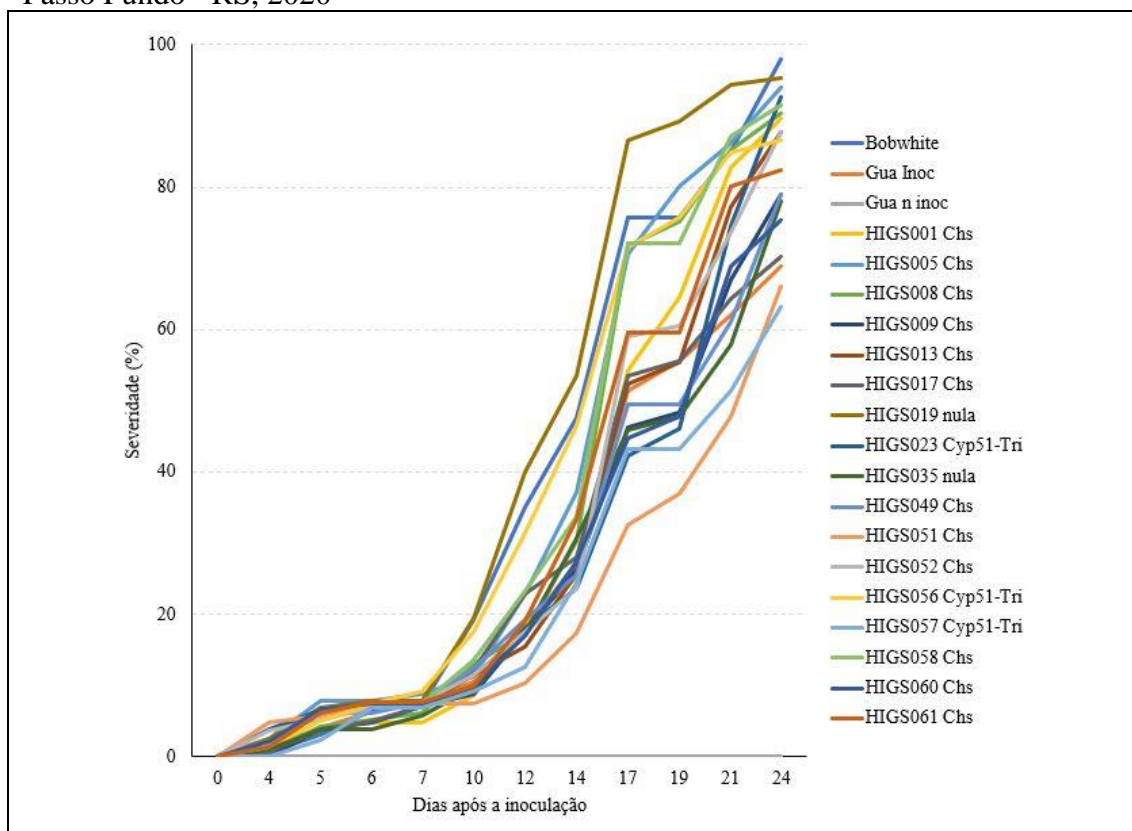


Fonte: Imagens do Autor. Espigas de trigo inoculadas com isolado CML3066 de *Fusarium graminearum*. A) Bobwhite, B) BRS Guamirim não inoculado, C) BRS Guamirim, D) Linhagem HIGS019 (nula) E) Linhagem HIGS035 (nula).

O progresso da severidade da doença para cada tratamento pode ser observado na Figura 16. Foi observada alta severidade aos 24 dpi nos controles Bobwhite e BRS

Guamirim (98 e 72,9%), respectivamente. A média da severidade final do experimento foi de 74,83% e coeficiente de variação foi de 41,11%. As linhagens transgênicas contendo a construção RNAi-Chs3b apresentaram severidade final entre 63,2 a 86,6%, enquanto nas linhagens contendo a construção RNAi-Cyp51-Tri foi verificado uma severidade final entre 54,1 a 94,8% (Tabela 13).

Figura 16 - Progresso de giberela (%) durante o período de avaliação de 25 dias de linhagens transgênicas inoculadas com o isolado de *Fusarium graminearum* CML3066. Passo Fundo - RS, 2020



Fonte: Dados do autor

Os valores para AACPD para os controles inoculados foram de 763,9,3 e 593,8 para Bobwhite e BRS Guamirim, respectivamente. A média do experimento foi de 610,61 enquanto o coeficiente de variação foi de 46,15%. As linhagens contendo a construção gênica RNAi-Chs3b apresentaram AACPD entre 357,2 e 767,8, enquanto nas linhagens com RNAi-Cyp51-Tri a AACPD variou de 458,2 a 837,3. Os menores valores de AACPD foram observados para as linhagens HIGS051 (RNAi-Chs3b) e HIGS035 (nula), com 357,2 e 458,2, respectivamente. Os maiores valores de AACPD foram observados nas

linhagens HIGS056 (RNAi-Cyp51-Tri) e HIGS061 (RNAi-Chs3b), com 840,5 e 770,8, respectivamente (Tabela 13).

Tabela 13 - Quantificação dos efeitos da inoculação de *Fusarium graminearum* CML3066 em linhagens transgênicas de trigo BRS Guamirim contendo as construções gênicas RNAi-Cyp51-Tri e RNAi-Chs3b. Passo Fundo - RS, 2020

Genótipo	N ¹	SF ² (%)	AACPD ²	GG ² (%)	PG ² (g)
HIGS001 Chs	8	89,5 ± 5,5	751,4 ± 68,1	61,9 ± 2,5	0,617 ± 0,03
HIGS005 Chs	9	94,8 ± 3,3	744,8 ± 50,9	68,3 ± 5,0	0,379 ± 0,04
HIGS008 Chs	10	82,0 ± 9,8	707,0 ± 96,3	59,8 ± 8,4	0,517 ± 0,09
HIGS009 Chs	10	71,8 ± 9,0	594,5 ± 85,8	45,4 ± 6,2	0,747 ± 0,07
HIGS013 Chs	9	69,8 ± 12,5	554,2 ± 105,8	46,3 ± 8,5	0,603 ± 0,08
HIGS017 Chs	10	70,1 ± 7,6	612,1 ± 78,0	46,8 ± 4,6	0,730 ± 0,09
HIGS049 Chs	10	79,0 ± 6,4	661,2 ± 71,1	42,7 ± 2,8	0,678 ± 0,05
HIGS051 Chs	10	54,1 ± 11,6	394,9 ± 85,8	64,2 ± 9,9	0,513 ± 0,11
HIGS052 Chs	9	87,6 ± 5,1	710,4 ± 57,8	66,8 ± 4,6	0,705 ± 0,05
HIGS058 Chs	10	91,5 ± 3,7	723,1 ± 82,1	65,1 ± 3,0	0,443 ± 0,04
HIGS060 Chs	10	75,2 ± 6,0	625,1 ± 68,8	43,6 ± 3,6	0,635 ± 0,05
HIGS061 Chs	10	82,4 ± 4,2	770,8 ± 47,9	48,5 ± 3,2	0,561 ± 0,04
HIGS019 (nula)	10	86,6 ± 9,6	624,1 ± 66,8	72,0 ± 6,6	0,419 ± 0,05
HIGS023 Cyp-Tri	7	77,1 ± 12,3	577,4 ± 96,6	42,5 ± 6,9	0,771 ± 0,11
HIGS056 Cyp-Tri	10	86,5 ± 6,3	840,5 ± 71,5	68,3 ± 4,9	0,426 ± 0,10
HIGS057 Cyp-Tri	7	63,2 ± 8,0	507,7 ± 39,1	56,0 ± 4,3	0,578 ± 0,10
HIGS035(nula)	10	66,6 ± 9,4	459,8 ± 63,6	53,6 ± 8,1	0,757 ± 0,09
Bobwhite	10	98,0 ± 2,0	763,9 ± 73,8	75,6 ± 2,6	0,689 ± 0,05
BRS Guamirim	10	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,532 ± 0,09
BRS Gua Inoc	10	72,9 ± 9,2	593,8 ± 84,4	48,8 ± 3,6	0,627 ± 0,07
Média Geral		74,83	610,61	53,82	0,647
CV (%)		41,11	46,15	43,10	51,03

Fonte: Dados do autor.

Notas: ¹Número de repetições de cada tratamento. ²Médias ± erro padrão de severidade final (SF), Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), porcentagem de grãos giberelados (GG) e peso de grãos por espiga (PG). Em negrito estão os dois maiores e menores valores.

Em relação a porcentagem de grãos giberelados (GG), a média foi de 53,82% com coeficiente de variação de 43,10%. O genótipo controle Bobwhite apresentou 75,6% de grãos giberelados, enquanto a cultivar BRS Guamirim apresentou 48,8 % de grãos com sintomas (Tabela 13). Na Figura 17 é possível observar os danos causados pelo patógeno causador da giberela nos tratamentos controles do experimento.

Figura 17 - Danos causados em grãos de trigo pelo fungo *Fusarium graminearum*. Passo Fundo - RS, 2020



Fonte: Elene Yamazaki Lau.

Nota: Fotos são representativas da média de cada tratamento. A) BRS Guamirim não inoculado, B) BRS Guamirim e C) Bobwhite, ambos inoculados com o isolado CML3066 de *F. graminearum*.

As linhagens HIGS049 (42,7%) e HIGS005 (68,3%) obtiveram a menor e a maior média de GG entre as linhagens com a construção RNAi-Chs3b. A linhagem HIGS019 (nula) obteve média de 72,0%. Dentre as linhagens transgênicas com a construção RNAi-Cyp51-Tri, destacou-se a HIGS23 com média de 42,5%, enquanto a pior foi HIGS056, com média de 68,3% (Tabela 13).

O peso de grãos por espiga foi extremamente afetado pela giberela, chegando a 75% de redução na linhagem HIGS005 (RNAi-Chs3b) e 72% em HIGS019 (nula) e HIGS056 (RNAi-Cyp51-Tri) em relação ao controle BRS Guamirim não inoculado (média de 1,532 g). BRS Guamirim inoculado teve redução de 59% em relação ao não inoculado. A linhagem menos afetada foi a HIGS023 (RNAi-Chs3b) com 0,771 g. No entanto, a redução ainda foi alta, de cerca de 49% (Tabela 13).

Em vista dos testes de normalidade e homocedasticidade não terem sido atendidos, procedeu-se a análise não-paramétrica através do teste de Kruskal-Wallis. Ao nível de significância de 5% para todos parâmetros analisados rejeitou-se a hipótese nula, indicando que ao menos um dos tratamentos difere dos demais (Tabela 14).

Tabela 14 - Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para as variáveis relacionadas à resposta de linhas transgênicas de trigo BRS Guamirim inoculadas com *Fusarium graminearum* CML3066. Passo Fundo - RS, 2020

Variáveis	Grau de liberdade	χ^2	<i>p</i> .
Severidade Final	19	65,497	0,00000005069
Área Abaixo da curva de progresso da doença	19	60,989	0,0000002697
Porcentagem de grãos giberelados	19	88,248	0,0000000000676
Peso de grãos	19	70,617	0,00000000726

Fonte: Dados do autor.

Para severidade final e AACPD foram encontradas diferenças significativas entre o controle BRS Guamirim não inoculado e todos os outros genótipos. Além disso, todos os outros genótipos não diferiram de BRS Guamirim inoculado nestas duas variáveis (Tabela 15).

Para a porcentagem de grãos giberelados, BRS Guamirim inoculado só foi diferente de BRS Guamirim não inoculado (Tabela 15). Três linhagens (HIGS049, HIGS060 e HIGS61, todas RNAi-Chs3b), além de BRS Guamirim não inoculado, apresentaram ser diferentes do genótipo suscetível Bobwhite inoculado. As linhagens HIGS008 e HIGS009 (ambas RNAi-Chs3b) e a linhagem HIGS035 (nula) não mostraram diferença em relação ao controle BRS Guamirim não inoculado (Tabela 15).

Quanto ao peso de grãos, nenhuma linhagem foi diferente das cultivares Bobwhite e BRS Guamirim inoculados. As linhagens RNAi-Chs3b HIGS001 e HIGS09, e RNAi-Cyp51-Tri HIGS23 e HIGS57 foram iguais ao controle BRS Guamirim não inoculado (Tabela 15).

Tabela 15 - Análise das variáveis relacionadas à resposta de linhas transgênicas de trigo BRS Guamirim inoculadas com *Fusarium graminearum* CML3066. Passo Fundo - RS, 2020

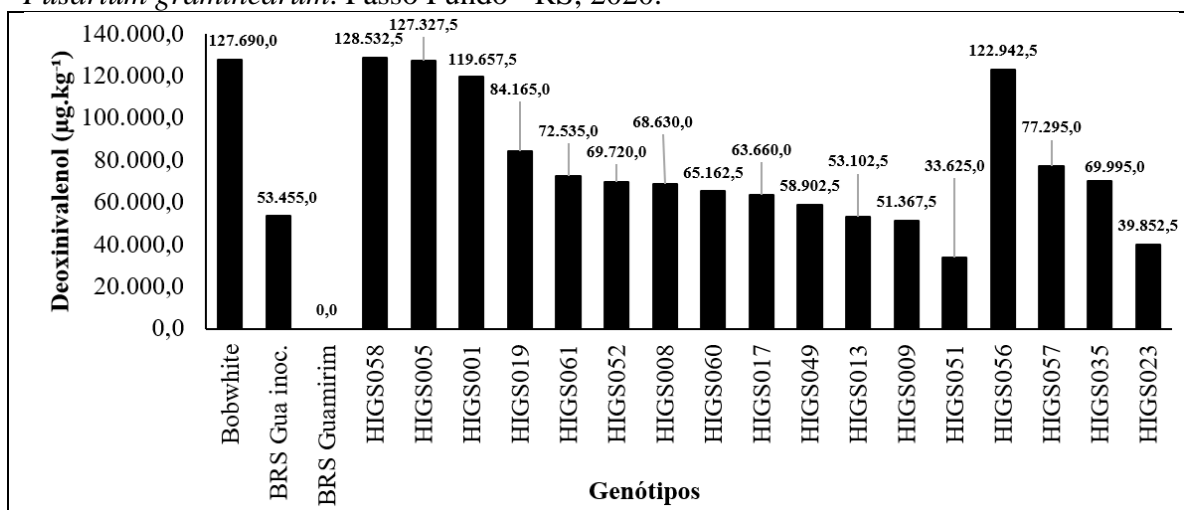
Genótipo	SF (%)	BW	Gua	Gua In	AACPD	BW	Gua	Gua In	GG (%)	BW	Gua	Gua In	PG (g)	BW	Gua	Gua In
		<i>p.</i>				<i>p.</i>				<i>p.</i>				<i>p.</i>		
Bobwhite Inoc.	100 (0,0)	-	-	-	858 (309)				77 (13,5)	-	-	-	0,658 (0,150)	-	-	-
BRS Guamirim	0,0 (0,0)	0,005	-	-	0(0)	0,012	-	-	0 (0)	0,017	-	-	1,600 (0,404)	0,002	-	-
BRS Guamirim Inoc.	79,5 (49,4)	ns	0,011	-	556 (250)	ns	0,012	-	46,1 (18,7)	ns	0,017	-	0,644 (0,200)	ns	0,004	-
HIGS001	96,2 (12,0)	ns	0,020	ns	790 (240)	ns	0,022	ns	60,7 (10,9)	ns	0,034	ns	0,672 (0,150)	ns	ns	ns
HIGS005	100 (7,7)	ns	0,012	ns	688 (165)	ns	0,016	ns	68,2 (11,6)	ns	0,023	ns	0,376 (0,189)	ns	0,004	ns
HIGS008	96,4 (13,5)	ns	0,011	ns	835 (419)	ns	0,012	ns	61,6 (21,7)	ns	ns	ns	0,401 (0,260)	ns	0,008	ns
HIGS009	84,6 (36,5)	ns	0,012	ns	593 (403)	ns	0,012	ns	53,9 (25,7)	ns	ns	ns	0,738 (0,427)	ns	ns	ns
HIGS013	85,7 (35,7)	ns	0,016	ns	553 (252)	ns	0,016	ns	50,0 (13,5)	ns	0,023	ns	0,668 (0,445)	ns	0,004	ns
HIGS017	75,0 (40,0)	ns	0,012	ns	527 (375)	ns	0,012	ns	43,2 (15,8)	ns	0,017	ns	0,673 (0,376)	ns	0,008	ns
HIGS019	100 (0,0)	ns	0,006	ns	640(82)	ns	0,012	ns	76,6 (23,3)	ns	0,017	ns	0,398 (0,158)	ns	0,034	ns
HIGS023	85,7 (27,4)	ns	0,030	ns	536 (360)	ns	0,031	ns	48,6 (13,6)	ns	0,051	ns	0,691 (0,204)	ns	ns	ns
HIGS035	73,1 (37,2)	ns	0,012	ns	509 (208)	ns	0,012	ns	57,1 (20,6)	ns	ns	ns	0,771 (0,290)	ns	0,014	ns
HIGS049	80,2 (15,0)	ns	0,012	ns	668 (331)	ns	0,012	ns	40,7 (13,5)	0,035	0,017	ns	0,676 (0,200)	ns	0,002	ns
HIGS051	53,6 (65,4)	ns	0,012	ns	240 (385)	ns	0,012	ns	67,5 (29,7)	ns	0,023	ns	0,537 (0,285)	ns	0,008	ns
HIGS052	92,3 (7,0)	ns	0,016	ns	670 (214)	ns	0,016	ns	64,7 (14,9)	ns	0,023	ns	0,720 (0,133)	ns	0,004	ns
HIGS056	92,0 (16,7)	ns	0,011	ns	896 (126)	ns	0,012	ns	66,7 (26,5)	ns	0,017	ns	0,312 (0,153)	ns	0,004	ns
HIGS057	61,5 (16,8)	Ns	0,031	ns	496 (105)	ns	0,031	ns	55,6 (13,5)	ns	0,051	ns	0,521 (0,085)	ns	ns	ns
HIGS058	92,9 (8,1)	ns	0,011	ns	754 (461)	ns	0,012	ns	63,8 (10,0)	ns	0,017	ns	0,462 (0,170)	ns	0,002	ns
HIGS060	81,6 (31,1)	ns	0,012	ns	556 (271)	ns	0,012	ns	41 (14,7)	0,047	0,017	ns	0,642 (0,318)	ns	0,002	ns
HIGS061	88,1 (13,7)	ns	0,012	ns	751 (179)	ns	0,012	ns	49,1 (8,2)	0,047	0,017	ns	0,540 (0,150)	ns	0,002	ns

Nota: Mediana, intervalo inter quartílico, *p.* valor ajustado pelo método de Bonferroni para o teste de Wilcoxon, ns = não significativo a 0,05, Severidade final (SF), Área Abaixo da Curva de Progresso da doença (AACPD), Porcentagem de grãos giberelados (GG) e Peso de grão (PG)

3.4.6 Análise de micotoxinas em genótipos de trigo inoculados com *Fusarium graminearum* isolado CML3066

Após a avaliação das sementes quanto a quantidade de grãos giberelados, as sementes os grãos provenientes de BRS Guamirim transgênico contendo as construções gênicas RNAi-Chs3b e RNAi-Cyp51-Tri foram encaminhadas para quantificação de deoxinivalenol (DON) via ELISA. Elevados níveis de DON foram observados entre os genótipos transgênicos, com média de 74.380,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Figura 18). Para as linhagens transgênicas contendo a construção gênica RNAi-Chs3b, os níveis de DON variaram entre 33.625 a 128.532,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Para as linhagens contendo a construções gênica RNAi-Cyp51-Tri, foi observado níveis variando entre 39.852,5 a 122.942,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Já os controles Bobwhite e BRS Guamirim apresentaram 127.690 e 53.455 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. (Figura 18).

Figura 18 - Quantificação de deoxinivalenol via teste de ELISA em grãos provenientes da inoculação de espigas de linhagens transgênicas de trigo com o isolado CML3066 de *Fusarium graminearum*. Passo Fundo - RS, 2020.



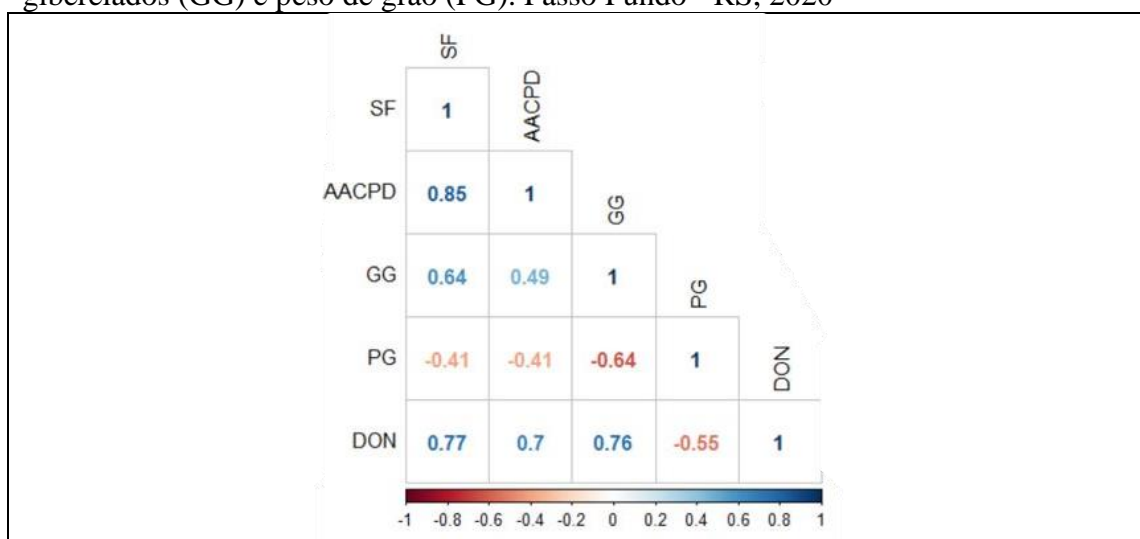
Fonte: Dados do autor

As linhagens com o transgene RNAi-Chs3b HIGS013, HIGS009 e HIGS051 tiveram concentrações de 53.102,5, 51.367,5 e 33.625 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente, sendo inferiores ao controle BRS Guamirim inoculado, enquanto apenas a linhagem RNAi-Cyp51-Tri HIGS023 apresentou quantidade de DON inferior ao mesmo. A linhagem

HIGS058 apresentou nível de DON de 128.532,5 µg/kg, acima do nível de DON da cultivar Bobwhite. As demais linhagens transgênicas apresentaram níveis intermediários entre os controles Bobwhite e BRS Guamirim inoculado. Para o controle BRS Guamirim não inoculado, o nível de DON foi inferior ao limite de quantificação pelo método de ELISA que é de 150 ppb (150 µg/kg) (Figura 18).

A alta quantidade de DON verificada nesse estudo, típica de ensaios de inoculação, foi relacionada com as demais variáveis analisadas (Figura 19). A correlação foi significativa ($p. <0,01$) para todas as variáveis. As variáveis severidade final, AACPD, e porcentagem de grãos giberelados tiveram correlação positiva com os níveis de DON para ambos os experimentos (0,70 a 0,77), enquanto a variável peso de grãos teve correlação negativa moderada (-0,55) (Figura 19).

Figura 19 - Correlação de Spearman entre as variáveis deoxinivalenol (DON), severidade final (SF), Área Abaixo da Curva de Progresso da doença (AACPD), grãos giberelados (GG) e peso de grão (PG). Passo Fundo - RS, 2020



Fonte: Dados do autor

Nota: Todas as correlações foram significativas ($p. <0.01$).

3.4.7 Análise de expressão dos genes *Chs3b*, *Cyp51A*, *Cyp51B*, *Cyp51C*, *Tri5* e *Tri6* em *Fusarium graminearum* isolado CML3066 inoculado em linhagens transgênicas de trigo

Para verificar a ocorrência do silenciamento gênico em *F. graminearum* inoculados nas plantas de trigo geneticamente modificadas contendo as construções RNAi-Chs3b e RNAi-Cyp51-Tri, foram selecionadas linhagens transgênicas ao final das avaliações. Os genes alvo destas construções gênicas são *Chs3b*, *Cyp51A*, *Cyp51B*, *Cyp51C*, *Tri5* e *Tri6*. Inicialmente foram obtidas as equações, coeficiente de determinação (R^2), eficiência de amplificação bem como as diluições das reações de amplificação para cada gene-alvo (Tabela 16).

A eficiência de amplificação para os primers para detecção dos respectivos genes variou ente 92,99 a 148,148%, respectivamente para os primers que detectam os genes Cyp51B e Tri6. A eficiência aceitável varia entre 90 a 110%, sendo, portanto, eliminado o que acarretou na não utilização do par de primer para detecção do gene Tri6, bem como o par de primer para detecção do gene Cyp51C, o qual não teve produto amplificado no RT- qPCR (Tabela 16).

Tabela 16 - Equação de regressão, R-quadrado (R^2), das reações de amplificação de cada gene-alvo. Passo Fundo - RS, 2020

Gene	Equação de regressão ^a	R^2	Eficiência ^b (%)	Diluições ^c						
				1	2	3	4	5	6	7
Actina	$y = -3,322x + 21,396$	0,990	100,001	x ^d	x	x	x	x	x	x
Tubulina	$y = -3,384x + 22,996$	0,992	97,477	x	x	x	x	x	x	
FgCyp51A	$y = -3,396x + 28,829$	0,964	97,011	x	x	x	x	x		
FgCyp51B	$y = -3,502x + 27,180$	0,979	92,997	x	x	x	x			
FgChs3b	$y = -3,396x + 27,217$	0,985	97,003	x	x	x	x			
FgTri5	$y = -3,337x + 21,981$	0,996	99,362	x	x	x	x	x		
FgTri6	$y = -2,533x + 31,238$	0,884	148,148	x	x	x	x			
FgCyp51C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

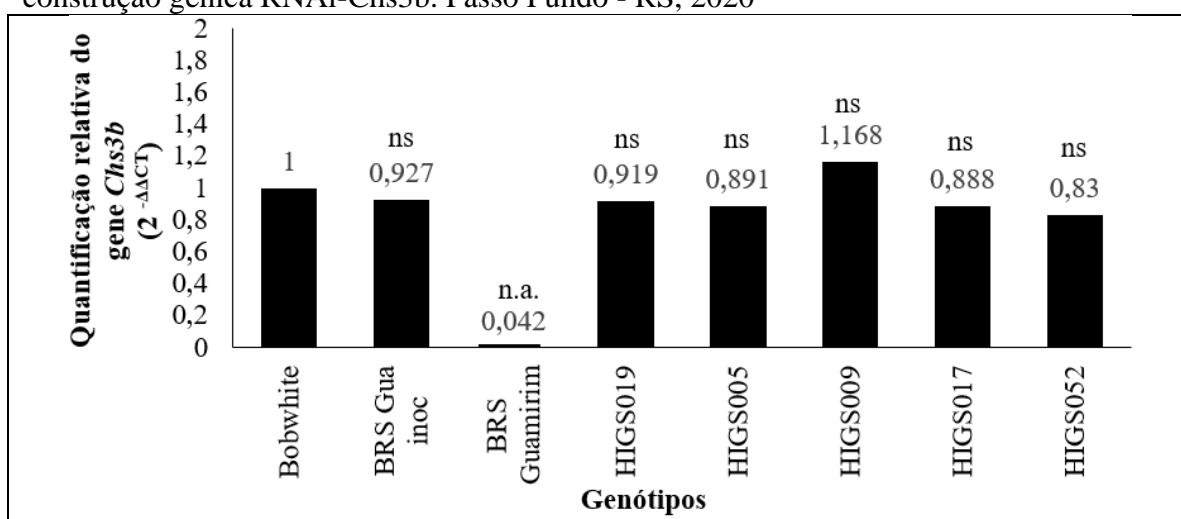
Fonte: Dados do autor.

Nota: ^aEquação linear ($y = ax + b$), onde a = coeficiente angular (Slope) e b = intercepto. ^b Eficiência de amplificação. ^cDiluições seriadas de 1:5 utilizando cDNA (molécula molde) de Bobwhite inoculado, sendo: 1 = 1 e 7 = 1/15625). ^dPontos de diluição considerados.

Quanto aos resultados de expressão relativa (Figura 20), foi verificado um aumento de 16,8% na expressão do gene *Chs3b* na linhagem HIGS009 (RNAi-Chs3b) em relação ao controle Bobwhite inoculado, enquanto os demais tratamentos apresentaram diminuição da expressão variando de 7,3% a 17%, respectivamente no

controle BRS Guamirim inoculado e HIGS052 (RNAi-Chs3b). Nenhum tratamento apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle Bobwhite. Foi detectada uma pequena expressão do gene *Chs3b* e dos controles actina e tubulina em uma repetição biológica de BRS Guamirim não inoculado (BRS Guamirim), o que acarretou uma quantificação relativa de 0,042. Essa expressão possivelmente é devido às plantas não inoculadas estarem próximas de plantas inoculadas na câmara de crescimento (Figura 20). Não houve a detecção dos outros genes analisados neste trabalho em BRS Guamirim não inoculado.

Figura 20 - Quantificação relativa por RT-qPCR do gene *Chs3b* de *Fusarium graminearum* isolado CML3066 inoculado em linhagens de BRS Guamirim transgênicas contendo a construção gênica RNAi-Chs3b. Passo Fundo - RS, 2020

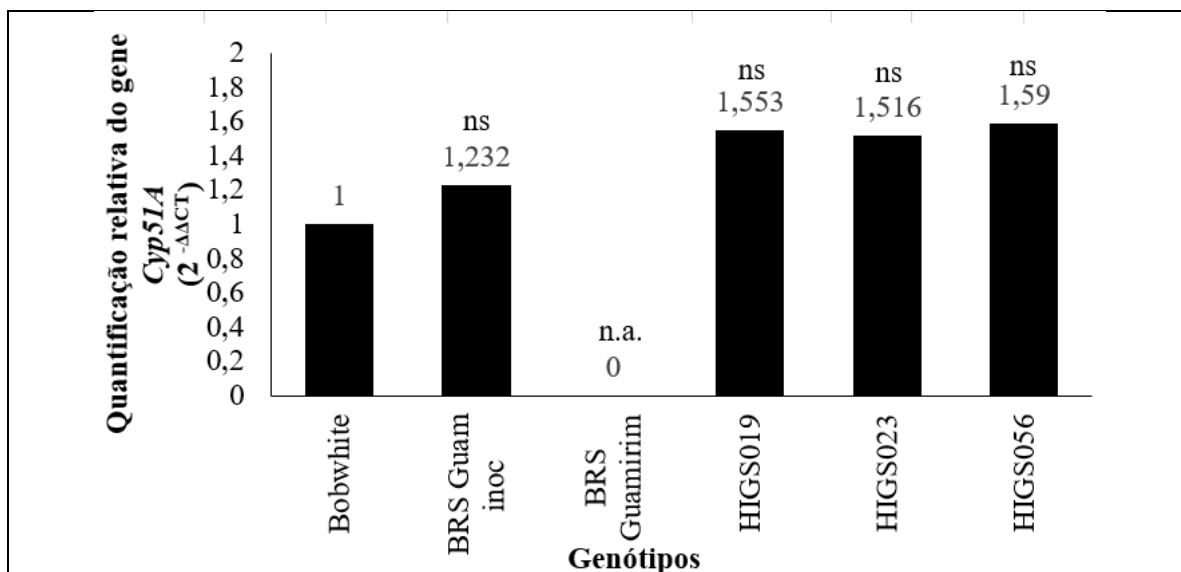


Fonte: Dados do autor.

Nota: Teste T de Student: * ($p.<0,05$), ** ($p.<0,01$), ns (não significativo $p.>0,05$), n.a. (não se aplica). A amostra calibradora foi Bobwhite inoculado e o controle endógeno foi actina. Os dados de quantificação relativa foram obtidos pela equação $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Foi observado aumento na expressão do gene *Cyp51A* em relação ao controle Bobwhite inoculado, variando de 23,2 a 59,0% para BRS Guamirim inoculado e HIGS056 (RNAi-Cyp51-Tri), respectivamente. as linhagens HIGS019 (nula) e HIGS023 (RNAi-Cyp51-Tri) apresentaram aumento da expressão de 55,3 e 51,6%, respectivamente. O aumento de expressão não foi estatisticamente significativo para todos os tratamentos (Figura 21).

Figura 21 - Quantificação relativa por RT-qPCR do gene *Cyp51A* de *Fusarium graminearum* isolado CML3066 inoculado em linhagens de BRS Guamirim transgênicas contendo a construção gênica RNAi-Cyp51-Tri. Passo Fundo - RS, 2020



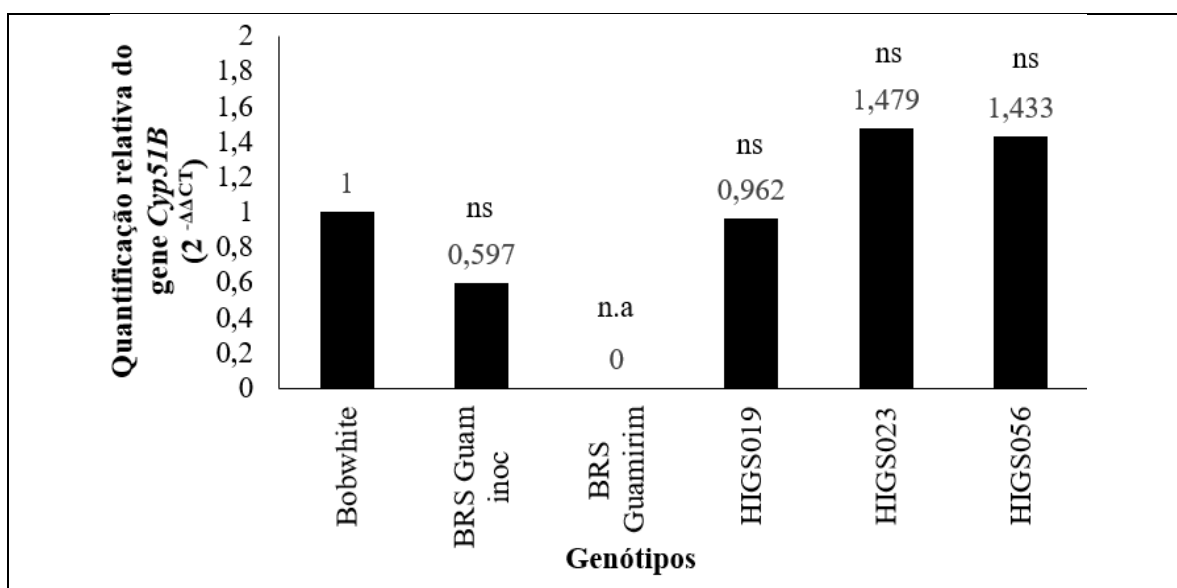
Fonte: Dados do autor.

Nota: Teste T de Student: * ($p.<0,05$), ** ($p.<0,01$), ns (não significativo $p.>0,05$), n.a. (não se aplica). A amostra calibradora foi Bobwhite inoculado e o controle endógeno foi actina. Os dados de quantificação relativa foram obtidos pela equação $2^{-\Delta\Delta CT}$.

A expressão do gene *FgCyp51B* foi reduzida em dois tratamentos, linhagem HIGS019 (nula) (3,8%) e BRS Guamirim inoculado (40,3%) em relação ao controle Bobwhite inoculado, as linhagens HIGS023 (RNAi-Cyp51-Tri) e HIGS056 (RNAi-Cyp51-Tri) apresentaram aumento na expressão, respectivamente de 47,9 e 43,3%. Os tratamentos não diferiram do controle Bobwhite inoculado (Figura 22).

Para o gene *Tri5*, constatou-se redução de 67,1% no controle BRS Guamirim inoculado em relação a Bobwhite inoculado, foi observado reduções de 10,3 e 7,4 %, respectivamente nas linhagens HIGS019 e HIGS023, enquanto a linhagem HIGS056 apresentou incremento de 7,6% em relação a Bobwhite inoculado. Os tratamentos não diferiram estatisticamente do controle Bobwhite inoculado (Figura 23).

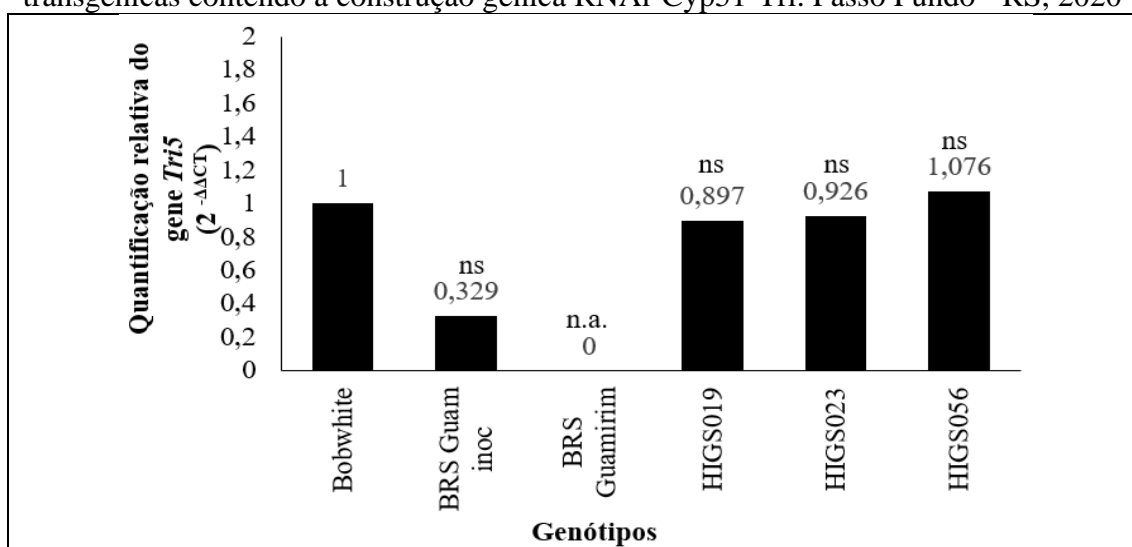
Figura 22 - Quantificação relativa por RT-qPCR do gene *Cyp51B* de *Fusarium graminearum* isolado CML3066 inoculado em linhagens de BRS Guamirim transgênicas contendo a construção gênica RNAi-Cyp51-Tri. Passo Fundo - RS, 2020



Fonte: Dados do autor.

Nota: Teste T de Student: * ($p.<0,05$), ** ($p.<0,01$), ns (não significativo $p.>0,05$), n.a. (não se aplica). A amostra calibradora foi Bobwhite inoculado e o controle endógeno foi actina. Os dados de quantificação relativa foram obtidos pela equação $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Figura 23 - Quantificação relativa por RT-qPCR do gene *Tri5* de *Fusarium graminearum* isolado CML3066 inoculado em linhagens de BRS Guamirim transgênicas contendo a construção gênica RNAi-Cyp51-Tri. Passo Fundo - RS, 2020



Fonte: Dados do autor.

Nota: Teste T de Student: * ($p.<0,05$), ** ($p.<0,01$), ns (não significativo $p.>0,05$), n.a. (não se aplica). A amostra calibradora foi Bobwhite inoculado e o controle endógeno foi actina. Os dados de quantificação relativa foram obtidos pela equação $2^{-\Delta\Delta CT}$.

3.5 Discussão

A giberela causada pelo fungo ascomiceto *F. graminearum* é uma das grandes ameaças da cultura do trigo, especialmente nas regiões com condições ambientais favoráveis à doença, por interferir na produção e na qualidade pela contaminação dos grãos por micotoxinas principalmente do tipo tricotecenos, inclusive DON (DEL PONTE et al., 2004).

Esforços são necessários para continuar a busca do controle desta doença e novas tecnologias podem oferecer importantes oportunidades. Nesse sentido, o silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro - HIGS vem como uma alternativa para o controle de doenças causadas por fungos (NIBLETT; BAILEY, 2012; PANWAR MCCALLUM; BAKKEREN, 2013; KOCH et al., 2013; GHAG; SHEKHAWAT; GANAPATHI, 2014; ARIAS; DANG; SOBOLEV, 2015; CHENG et al., 2015; HU et al., 2015; MASANGA et al., 2015; ZHANG et al., 2016; HE et al., 2019).

HIGS ocorre quando o silenciamento de genes-alvo no patógeno é desencadeado por RNA de fita dupla produzido pelo hospedeiro, podendo impedir/minimizar a infecção e também o desenvolvimento da doença. Entre as dificuldades está o fato de que a aplicação da estratégia requer a identificação de genes-alvo dentro de uma ampla gama de candidatos, sendo preciso buscar opções para realizar estudo funcional desses genes de maneira mais ágil e em maior escala possível. Como a eficiência da produção de plantas transgênicas de trigo na maioria das vezes é baixa e o custo é alto, a planta modelo *A. thaliana* pode ser utilizada para indicar as construções gênicas mais promissoras a serem testadas em trigo.

Diversos estudos sugerem que testes preliminares de genes candidatos para HIGS de *F. graminearum* possam ser realizados em *A. thaliana* auxiliando estudos que almejam resistência à giberela em trigo e outras espécies de plantas de interesse por meio desta tecnologia (URBAN et al., 2002; CHEN et al., 2006; KOCH et al., 2013; NALAM et al., 2015). Uma das vantagens desta tecnologia é que permite buscar tanto um alvo específico quanto vários membros de uma família gênica ou diversos genes alvo, que podem estar relacionados com a patogenicidade, virulência ou outro fator importante para o desenvolvimento e sobrevivência. A concatenação de várias sequências é uma vantagem

por permitir ter mais de um gene alvo também especialmente no caso de melhoramento genético visto que a característica segrega como gene único, facilitando a introgressão em genótipos superiores.

Nesse sentido, o trabalho objetivou avaliar o potencial de duas construções gênicas múltiplas em *A. thaliana*, tendo como alvo genes essenciais de *F. graminearum*: RNAi-Cyp51-Tri, RNAi-Chs3b, em adição de RNAi-Synchit2. Além disso, as construções gênicas RNAi-Cyp51-Tri e RNAi-Chs3b foram também avaliadas em linhagens transgênicas de trigo. As construções foram montadas com a finalidade de que, após a transcrição dentro das plantas, resultassem em um RNA fita dupla (dsRNA) (do inglês, *double stranded RNA*) com estrutura de grampo (do inglês, *hairpin*).

Os genes *Cyp51*, em que dois (*Cyp51A* e *Cyp51B*) dos genes codificam e um (*Cyp51C*) tem impacto na produção de citocromo P450 lanosterol C-14 α demetilase (FAN et al., 2013), e são essenciais para biossíntese de ergosterol, que é constituinte da membrana celular dos fungos, já foram alvo de estudo em HIGS. Koch et al. (2013) verificam *in vitro* que a exposição de *F. graminearum* ao dsRNA CYP3RNA (dsRNA de 791 nt) complementar aos genes *Cyp51A*, *Cyp51B* e *Cyp51C* resultou na inibição do crescimento do fungo bem como sua morfologia alterada, semelhante ao observado em tratamento com fungicida tebuconazol (onde a enzima Cyp51 é o alvo). A expressão deste mesmo dsRNA em arábida e cevada tornou plantas suscetíveis em altamente resistentes à infecção fúngica. Os níveis relativos de expressão dos genes *Cyp51a*, *Cyp51B* e *Cyp51C* em *F. graminearum* foram reduzidos em média em 92, 89 e 77%, respectivamente, nas linhagens de arábida transgênicas expressando CYP3RNA comparadas com o controle (vetor vazio). A formação de micélio de *F. graminearum* foi restrita ao local inoculado em folhas que expressam CYP3RNA. Além disso, sementes de cevada inoculada apresentaram-se livres de hifas do fungo. A inibição do crescimento fúngico se correlacionou com a produção *in planta* de siRNAs correspondentes as sequências Cyp51, bem como com o silenciamento altamente eficiente dos genes no fungo.

A construção gênica RNAi-Cyp51-Tri do presente trabalho objetivou silenciar cinco genes importantes de *F. graminearum*, sendo eles *Cyp51A*, *Cyp51B* e *Cyp51C*, além de dois genes que estão envolvidos na produção de desoxynivalenol (DON) (*Tri5* e *Tri6*). Um fragmento de 250 pares de bases de cada gene foi concatenado e este conjunto foi montado em sentido senso pareado com o do sentido antisenso e invertidas em uma construção gênica. Cada braço da construção (senso e antisenso) continha no total 1250 pb. Plantas transgênicas de arábida contendo RNAi-Cyp51-Tri foram avaliadas quanto ao potencial de controle de *F. graminearum*. Em ensaio de inoculação em folhas destacadas nenhuma linhagem transgênica mostrou severidade reduzida em relação ao controle com vetor vazio. Aos 3 dpi, a severidade variou entre 24,9 a 35% nas linhagens transgênicas enquanto no controle com o vetor vazio apresentou 30,05%.

A construção RNAi-Chs3b visa ao silenciamento do gene *Chs3b* de *F. graminearum* que codificam para quitina sintase e tem papel importante na biossíntese de quitina que é componente estrutural da parede celular dos fungos. É constituída por três partes do gene *Chs3b* que foram concatenadas e invertidas em uma mesma construção gênica, sendo as mesmas sequências de Cheng et al. (2015), mas diferem pelo fato de que as sequências para RNAi do gene *Chs3b* foram co-transformadas em trigo, ou seja, as três construções de RNAi foram inseridas separadamente, em locais diferentes do genoma, nas mesmas plantas. Neste trabalho, utilizando a construção concatenada RNAi-Chs3b, a severidade entre genótipos transgênicos variou de 10,4 a 27,7%, sendo similares aos das plantas com RNAi-Cyp51-Tri. As severidades das linhagens não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao controle com vetor vazio, que apresentou média de 14,2%.

Em inflorescências de plantas transgênicas contendo as construções RNAi-Cyp51-Tri e RNAi-Chs3b inoculadas com suspensão de esporos, sintomas característicos foram observados nas plantas controles, assim como nas linhagens transgênicas, que não diferiram estatisticamente dos controles não GM e com vetor vazio. Para verificar se as linhagens transgênicas contendo a construção RNAi-Cyp51-Tri eram capazes de reduzir a quantidade de micotoxinas, a concentração de DON foi quantificada em inflorescências inoculadas. Dois linhagens transgênicas apresentaram redução significativa nos níveis de

DON em relação ao controle não transgênico Ler, as reduções foram de 53,0 e 60,6% respectivamente para as linhagens Ag094.1 e Ag086.5.

Em relação às linhagens transgênicas de trigo contendo as construções gênicas RNAi-Cyp51-Tri e RNAi-Chs3b, os resultados de AACPD, severidade final, porcentagem de grãos giberelados e peso de grãos não foram promissores, visto que nenhuma redução significativa foi observada para tais parâmetros em relação aos genótipos controle BRS Guamirim e Bobwhite inoculados. Os sintomas observados no genótipo controle Bobwhite (suscetível à giberela), foram bem característicos desde o início até o fim do experimento. Para este genótipo controle houve elevada severidade, AACPD, porcentagem de grãos giberelados e diminuição acentuada no peso de grãos em decorrência da doença, o que demonstra confiabilidade nos dados gerados.

Diferentemente dos nossos resultados, Cheng et al. (2015) observaram uma redução de 74-76% nos sintomas da doença em espigas de trigo transgênico variedade Yangmai15 contendo as três construções únicas tendo como alvo para HIGS o gene de virulência quitina sintase *Chs3b* de *F. graminearum*. Em outro estudo conduzido por Chen et al. (2016), utilizando trigo transgênico superexpressando hpRNAs contra o gene *FcGls1*, que codifica uma β -1, 3-glucano sintase em *F. culmorum*, demonstraram aumento da resistência à giberela (redução de 50 a 75% nos sintomas da doença), em ensaios de inoculação de folha e espiga realizados em condições de estufa e campo.

Quantidades altíssimas de DON foram verificadas nos grãos dos genótipos inoculados, chegando a 127.690 e 53.455 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em Bobwhite e BRS Guamirim. Nas linhagens transgênicas contendo a construção gênica RNAi-Cyp51-Tri, uma linhagem (HIGS023) apresentou redução de 25,44% em relação ao genótipo BRS Guamirim inoculado, e duas linhagens (HIGS009 e HIGS051) com a construção RNAi-Chs3b apresentaram redução de 3,9 e 37,0%, respectivamente, embora não testadas estatisticamente pela ausência de repetições. As reduções significativas observadas na concentração de DON em arabidopsis contendo esta construção, na ordem de 53,0 e 60,6% respectivamente para as linhagens Ag094.1 e Ag086.5, corroboram para a ocorrência da diminuição real da concentração desta micotoxina nas plantas transgênicas

de trigo contendo RNAi-Cyp51-Tri. Apesar da redução elevada nos grãos das linhagens de trigo, a quantidade verificada é ainda muito acima dos níveis permitidos pela legislação vigente. Deve-se ressaltar que as quantidades foram obtidas em experimento controlado em que são disponibilizadas as melhores condições para o desenvolvimento do patógeno, o que pode ter levados a níveis exorbitantes de micotoxina como aqui observados.

Para determinar se as plantas de trigo transgênicas visando ao silenciamento do gene *Chs3b* exibem resistência tipo III, Cheng et al. (2015) utilizaram cromatografia gasosa - espectrometria de massa para analisar as quantidades de micotoxinas do tipo tricotecenos em grãos de linhagens transgênicas de trigo na geração T5. Os grãos derivados de experimento de inoculação nas linhas transgênicas L1 e L3 continham 8,6 e 9,5 µg/g de deoxinivalenol (DON), com reduções significativas de 62% e 58%, respectivamente, em comparação com o genótipo suscetível não transgênico Yangmai15 (Y15). Em condição de campo, essas linhagens transgênicas (L1 e L3) tiveram reduções no conteúdo de DON de 85% e 78%, respectivamente, em relação ao controle Y15. A expressão das moléculas de RNAi em trigo transgênico de forma estável acarretou na redução do acúmulo de micotoxinas em grãos, exibindo assim uma resistência tipo III.

DON é visto como necessário para o patógeno na supressão da defesa vegetal, sendo necessário para a sua disseminação dos tecidos adjacente (JANSEN et al., 2005; AYUMI; MANICKAVELU, 2015). Essa informação é corroborada quando correlacionamos DON à severidade e AACPD, nesse sentido foi verificada correlação positiva forte de DON com essas variáveis (acima de 0,7). A obtenção de genótipos que apresentem menores quantidade de DON pode ser vantajoso, mesmo sem redução de severidade, mas é necessário ponderar que a vantagem precisa ser expressiva visto as grandes dificuldades para lançar um trigo transgênico no mercado.

Os dados de severidade, AACPD e porcentagem de grãos giberelados sugeriam que os genes alvos a serem silenciados em *F. graminearum* via HIGS dos genes não estavam sendo suprimidos pelas plantas transgênicas contendo as construções gênicas RNAi-Cyp51-Tri e RNAi-Chs3b. A análise de expressão gênica, reforçou a hipótese, pois não foi verificada diferença na expressão relativa dos genes *Chs3b*, *Cyp51A*, *Cyp51B* e

Tri5 de *F. graminearum* submetido às linhagens transgênicas de trigo, diferentemente dos resultados de outros trabalhos onde a resistência foi positivamente correlacionada com a redução na expressão dos genes do patógeno (KOCH et al., 2013, CHENG et al., 2015, ANDRADE et al., 2016).

Outro exemplo de obtenção de resistência por meio de HIGS dos genes *Cyp51* é demonstrado por He et al. (2019), que visaram ao silenciamento dos genes *Cyp51* (*Cyp51A*, *Cyp51B*, *Cyp51C*) em *Brachypodium distachyon*. Para isso os autores geraram plantas transgênicas contendo a construção gênica *CYP51-RNAi*, trata-se do empilhamento de fragmentos dos genes *Cyp51* (fragmento de 220 pb de *Cyp51B*, 294 pb de *Cyp51A* e 238 pb do gene *Cyp51C*) no sentido senso e antisense espaçados entre si por uma sequência ligante do gene *gus*. Nesse trabalho foi verificado que os níveis de transcritos foram reduzidos em 78, 77 e 70% respectivamente dos genes *Cyp51A*, *Cyp51B* e *Cyp51C* em *F. graminearum* inoculado em espiguetas da linhagem L3 de *B. distachyon*, enquanto na linhagem L4, reduções de 75, 78 e 67% foram constatadas. Todas as linhagens transgênicas exibiram forte resistência à *F. graminearum*.

A eficiência de absorção dependente do tamanho de dsRNAs pelo fungo invasor é um componente importante das abordagens de controle baseadas em RNAi como o HIGS. Em fungos, vários estudos demonstraram a absorção ativa de dsRNAs longos e curtos, resultando no silenciamento de genes-alvo (KHATRI; RAJAM, 2007; JOCHL et al., 2009; KALLEDA; NAOREM; MANCHIKATLA, 2013). Bolognesi et al. (2012) em estudo com larva da raiz do milho (*Diabrotica virgifera*) observaram que um dsRNA de 240 pb acarretou o subsequente silenciamento do gene alvo enquanto siRNAs de 21 pb não tiveram êxito. Ainda, foi observada a eficiência dependente do tamanho do dsRNA, onde quanto maior o tamanho resultou no aumento do silenciamento. Segundo Majumdar, Rajasekaran e Cary (2017), o aumento pode ser devido ao fato de que dsRNAs maiores podem resultar em um número maior de espécies de siRNA eficazes visando aos transcritos do gene de interesse. Em fungos, tanto dsRNAs longos quanto curtos são relatados como igualmente internalizados e induzem o RNAi a silenciar os genes alvo (MAJUMDAR; RAJASEKARAN; CARY, 2017).

Em trabalho recente, feito por Koch et al. (2019) foram comparadas as estratégias de HIGS e SIGS (do inglês, spray-induced gene silencing), onde moléculas de RNA que têm o potencial de desencadear RNAi são aplicadas de maneira exógena. Nesse trabalho, onde foram projetadas construções de dsRNA almejando um ou dois genes *FgCYP51*, os autores verificaram que a construção tendo como alvo dois genes *FgCYP51* inibiu o crescimento de *F. graminearum* de forma mais eficiente do que a construção simples, embora que ambas tenham reduzido a infecção pelo fungo. Segundo esse estudo, as construções que têm como alvo dois genes em paralelo foram mais eficientes devido ao maior número de siRNAs, sugerindo que o silenciamento está correlacionado como o número de siRNAs gerados a partir do precursor dsRNA.

Em trabalho posterior, para provar a hipótese de que a eficiência de silenciamento está correlacionada com o número de siRNAs processados originou do dsRNA precursor, Höfle et al. (2019) testaram o aumento do comprimento de precursores de dsRNA em abordagens de HIGS e SIGS. Nesse trabalho foram testados tamanhos variando entre 400 a 1500 nucleotídeos para avaliar a eficiência de silenciamento de genes *Cyp51* de *F. graminearum*. Em relação à eficiência de controle da doença mediada por HIGS, não foi verificada correlação entre o comprimento do precursor dsRNA e a redução da infecção por *F. graminearum* em plantas transgênicas de arábidoopsis expressando as construções gênicas dsRNA-CYP51. Em contraste com os resultados de HIGS, foi verificado que a diminuição na resistência *F. graminearum* mediada por SIGS se correlaciona significativamente com o comprimento da construção dsRNA que foi pulverizada nas folhas.

A quitina, é um importante componente estrutural de estruturas morfológicamente distintas montadas durante várias fases de crescimento e desenvolvimento e é responsável pela rigidez da parede celular. Como dito anteriormente, proteínas responsáveis pela sua síntese são um alvo atraente para a obtenção de plantas resistentes via HIGS por essas razões e, devido a quitina estar ausente em plantas, reduz a probabilidade de qualquer efeito de alvo errôneo (*offtarget*) (ANDRADE et al., 2016).

Foram obtidas plantas transgênicas do ecótipo Ler de arábida com construção RNAi-Synchit2, contendo um fragmento de 494 pb do gene *Chs7* de *F. verticillioides*, tendo como alvo o gene *Chs* de *F. graminearum* por HIGS. Os padrões de segregação observados para tolerância à higromicina, que co-segrega com RNAi-Synchit2, foram 3:1 e 15:1 na maioria das linhagens transgênicas, correspondendo à presença de um e dois sítios de inserção do transgene. Sete linhagens transgênicas originadas de quatro eventos foram inoculadas com *F. graminearum* CML3066 e a severidade não foi diferente do controle não GM, variando de 57 a 66% em 3 dpi.

A construção RNAi-Synchit2 é a mesma usada por Andrade et al. (2016), onde foi relatado que as plantas transgênicas do tabaco melhoraram a resistência à *S. sclerotiorum*, caracterizada pelo menor tamanho das lesões, 3 dpi. A redução na área da lesão variou de 55,5 a 86,7% em comparação com as linhas não GM. A resistência a doenças e o silenciamento do gene *Chs* do fungo foram positivamente correlacionados com a presença de siRNA nas linhagens transgênicas. Ao comparar a sequência do fragmento de construção com as de *S. sclerotiorum* e *F. graminearum*, pelo algoritmo Blastn no GenBank, eles apresentaram semelhanças com os cDNAs de XM_001584969.1 (como mostrado em Andrade et al. 2016) e XM_011319518.1, respectivamente de cada um dos fungos, e a um gene *Chs* localizado na posição semelhante no cromossomo 1 de *F. graminearum* CML3066. O primeiro corresponde à sequência parcial de um gene que codifica uma hipotética proteína quitina sintase classe VI do cromossomo 10, com 67% de identidade, o segundo e o terceiro correspondem à parte do gene que codifica para uma quitina sintase 6, localizada no cromossomo 1, com 83% e 82% de identidade, respectivamente (Anexo II). Este fragmento de *FvChs7* também tem algumas semelhanças com outros membros da família de genes *Chs* de *F. graminearum*, como *Chs1* e *Chs4*, mas não se sabe se são suficientes para causar silenciamento fora do alvo. A ruptura de *Chs1* está relacionada à redução da virulência, redução da atividade da quitina sintase e mudanças nas estruturas da parede celular (XU et al., 2010). A exclusão de *Chs4* não afetou significativamente suas características em comparação com a estirpe selvagem (CHENG et al., 2015). Por outro lado, Liu et al. (2016) apresentaram indicações

de que os genes *Chs* co-regulam vários processos celulares. Portanto, silenciar mais de um membro dessa família de genes pode ser promissor no controle da doença.

Os resultados deste trabalho, com um número reduzido de eventos transgênicos desafiados com o fungo, estão alinhados com os obtidos por Cheng et al. (2015), em que não houve mudança na severidade em espigas de trigo de mutantes *F. graminearum* para *Chs6*. Cheng et al. (2015) também relataram que a mutação *Chs6* não alterou a proporção de quitina no fungo e que seus níveis de expressão não foram influenciados quando inoculada em espigas de plantas de trigo suscetíveis e resistentes. Os níveis de expressão dos oito genes *Chs* são semelhantes entre plantas suscetíveis e resistentes 12 horas após a inoculação (hai), com *Chs3b* tendo níveis de expressão maiores do que os outros (CHENG et al., 2015). A maior diferença nos níveis de expressão ocorreu a 24 hai, quando houve aumento na expressão de sete genes *Chs* nas plantas suscetíveis, com exceção do *Chs6*, e houve ligeira redução da expressão destes nas plantas resistentes. Diferentemente, em *Brassica oleracea* inoculada com *S. sclerotiorum*, os níveis de expressão de 11 genes *Chs*, incluindo XM_001584969.1, foram menores em plantas resistentes do que em plantas suscetíveis a 12 hpi, mas não em 24 hpi (DING et al., 2019). Essas informações mostram que genes semelhantes podem ter efeitos diferentes sobre a resistência em patossistemas diferentes.

Os dados reforçam que este gene não deve ser importante para sua infecção em arabidopsis; no entanto, uma vez que nenhuma análise de expressão foi realizada para verificar HIGS de *Chs6* em *F. graminearum* CML3066, estudos adicionais são necessários. Nesse sentido, deve-se fazer a análise da expressão gênica dos genes *Chs* do fungo quando expostos ao hospedeiro transgênico. Um maior número de eventos deve ser testado, avaliando a infecção em folhas destacadas inoculadas com discos de micélio, bem como em inflorescências inoculadas com suspensão de esporos.

Desde a sua descoberta, há mais de 20 anos, o RNA de interferência (RNAi) tem sido amplamente utilizado em plataformas de proteção de culturas. Até agora, as abordagens de RNAi têm convencionalmente se baseado no uso de plantas transgênicas que expressam RNAs de fita dupla contra alvos selecionados (DALAKOURAS et al.,

2020). Esses métodos baseados em RNAi têm se mostrado uma estratégia eficaz para proteger as plantas contra doenças causadas por patógenos (TINOCO et al., 2010; KOCH et al., 2013; GHAG et al., 2014; CHENG et al., 2015; HU et al., 2015; ANDRADE et al., 2016; CHEN et al., 2016).

Por fim, em vista do número limitado de eventos e de alvos estudados, mais eventos dos alvos avaliados e mais alvos para HIGS devem ser testados para implementar a tecnologia em espécies de valor agrônômico como trigo e outros cereais, principalmente agora que o *F. graminearum* CML 3066 teve seu genoma completo sequenciado (MACHADO et al. 2020). Por outro lado, como o isolado CML3066 é muito agressivo, a inoculação com diferentes isolados deve ser considerado como opção para estudar melhor as construções para HIGS de *F. graminearum* em arábido e trigo transgênicos já disponíveis.

3.6 Conclusão

Foi possível a obtenção de plantas geneticamente modificadas de arábido contendo as construções gênicas RNAi-Chs3b, RNAi-Cy51-Tri, e RNAi-Synchit2 para HIGS de *F. graminearum*, no entanto quando linhagens transgênicas contendo os eventos foram submetidos ao patógeno, foram incapazes de promover maior resistência ao este fungo. Foi verificada redução significativa nos níveis de DON para duas linhagens transgênicas contendo a construção RNAi-Cyp51-Tri.

Linhagens transgênicas de BRS Guamirim contendo construções HIGS RNAi-Ch3b e RNAi-Cyp51-Tri foram expostas à *F. graminearum*, mas não foi verificada maior resistência. Uma linhagem transgênica com a construção RNAi-Cyp51-Tri mostrou redução nos níveis de DON. Os genes *Chs3b*, *Cyp51A*, *Cyp51B* e *Tri5* de *F. graminearum* submetidos às linhagens transgênicas de trigo não tiveram expressão reduzida.

4 CAPÍTULO II

Investigação de genes candidatos ao Silenciamento Gênico Induzido pelo Hospedeiro em *Arabidopsis thaliana* visando a resistência à *Fusarium graminearum*

4.1 Resumo

O Silenciamento Gênico Induzido pelo Hospedeiro (*host induced gene silencing*, HIGS) é uma alternativa promissora visando ao controle da giberela, causada principalmente por *Fusarium graminearum*, importante doença que acomete a cultura do trigo. Diversos estudos sugerem fazer testes preliminares de genes candidatos para HIGS em *Arabidopsis thaliana*. Os genes, *Fgl1*, *Hog1*, *Lae1*, *Sid1*, *Snf1*, *Top1* são candidatos a serem testados, pois recentemente foi demonstrado seu efeito na patogenicidade ou virulência de *F. graminearum*. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial das construções gênicas RNAi-Hog1, RNAi-Flg1, RNAi-Lae1, RNAi-Sid1, RNAi-Snf1 e RNAi-Top1 em *Arabidopsis thaliana* para o controle de *F. graminearum*. Plantas de *A. thaliana* Ler foram transformadas com essas construções gênicas RNAi para silenciamento dos respectivos genes do fungo. A seleção das plantas transformadas foi feita pela fluorescência derivada da expressão do gene repórter DsRed. O número de sítios de inserção do transgene foi inferido na geração T1 e T2 eventos foram selecionados para verificar a resposta ao patógeno. Folhas destacadas de plantas T1 homozigotas e hemizigotas foram inoculadas com discos de meio de cultura com *F. graminearum*. Os eventos transgênicos (Hog1.3, Hog1.5, Lae1.3, Lae1.4, Lae1.7, Lae1.10, Sid1.1, Sid1.7, Snf1.1, Snf1.4, Snf1.9 e Top1.4) apresentaram segregação mendeliana de 3:1 e 15:1, sugerindo uma e duas inserções, respectivamente. Foi observada elevada severidade para genótipos homozigotos quanto para hemizigotos. As médias desconsiderando a zigosidade variaram de 60 a 80%, nenhum evento apresentou redução significativa em relação ao controle DsRed.9 (vetor vazio) e ao genótipo silvestre. A análise de PCR revelou a integridade da construção nos genótipos Snf1.1, Snf1.4, Snf1.9 e Top1.4, diferentemente dos demais genótipos, que amplificaram apenas um ou nenhum dos braços da construção. Até o momento não foram obtidos resultados satisfatórios quanto à resistência à *F. graminearum* via HIGS dos alvos avaliados e linhagens homozigotas deverão ser avaliadas futuramente.

Palavras-chave: 1. Giberela. 2. HIGS. 3. RNA de interferência. 4. *Arabidopsis*. 5 Trigo.

4.2 Introdução

A giberela causada pelo fungo ascomiceto *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch, forma assexuada *Fusarium graminearum* Schwabe, é considerada, dentre as doenças,

uma das mais importantes em todo o mundo. A doença é altamente destrutiva, causando reduções na produtividade e na qualidade dos grãos (DWEBA et al., 2017). Outra consequência é a contaminação dos grãos por micotoxinas, que representam um risco à saúde humana e animal por serem tóxicas quando ingeridas (DARWISH et al., 2014).

O manejo integrado é fundamental para reduzir os riscos em anos favoráveis à ocorrência de giberela, incluindo a aplicação de fungicidas, uso de cultivares resistentes além da rotação de culturas e o plantio escalonado (LIMA, 2010). As estratégias atuais de proteção de plantas dependem da aplicação de fungicidas tanto para o controle da doença quanto para limitar o acúmulo de micotoxinas (HÖFLE et al., 2019). O uso de cultivares resistentes é a melhor alternativa para o controle de doenças, inclusive giberela; entretanto, apesar dos esforços dos programas de melhoramento, ainda não existem cultivares suficientemente resistentes e capazes de resistir a uma epidemia. Uma alternativa em potencial para o controle da giberela é o desenvolvimento de plantas resistentes por meio de estratégias de engenharia genética.

O silenciamento de genes induzido pelo hospedeiro (do inglês, *Host induced gene silencing* - HIGS) é um método biotecnológico promissor baseado na expressão de RNAs de fita dupla (do inglês *double-stranded RNA* - dsRNAs) e dsRNAs em grampo (do inglês, *harpin RNAs* - hpRNAs), que são complementares aos genes de patógenos direcionados, na planta hospedeira (YIN; HULBERT, 2015; MACHADO et al., 2017a; MOROZOV et al., 2019). Esses dsRNAs / hpRNAs endógenos são processados em pequenos RNAs de interferência (do inglês, *small interference RNAs* - siRNAs) que podem espalhar-se localmente e sistemicamente na planta, entrar em microorganismos patogênicos e induzir resistência mediada por RNA em plantas (MOROZOV et al., 2019).

Portanto, pode-se gerar plantas transgênicas para produzir dsRNA que induzem o silenciamento de transcritos de genes alvo do patógeno durante a infecção. HIGS tem se mostrado uma alternativa viável e eficiente para o controle de doenças fúngicas (TINOCO et al., 2010; KOCH et al., 2013; GHAG; SHEKHAWAT; GANAPATHI, 2014; CHENG et al., 2015; HU et al., 2015; ANDRADE et al., 2016; CHEN et al., 2016).

Devido à relevância dos problemas causados por *F. graminearum*, extensos estudos têm sido feitos nas últimas décadas para identificar e entender seus fatores de patogenicidade e virulência e identificar os genes fundamentais desse patógeno. (RAUWANE et al., 2020). Inúmeros genes são potenciais candidatos alvo para HIGS de *F. graminearum*, e estes estão envolvidos diretamente em processos relacionados à sua sobrevivência como o metabolismo primário e secundário, desenvolvimento sexual, virulência e patogenicidade (CHUNTAO; HULBERT, 2015). Genes candidatos a alvo para HIGS podem ser inferidos tanto por comparação com estudos prévios em outros fungos quanto com a identificação em estudos funcionais.

Um dos candidatos é o gene que codifica para a proteína LaeA (Loss of aflR-expression A que faz parte do complexo Velvet, que consiste em no mínimo dez proteínas, e coordena a biossíntese de metabólitos secundários, o desenvolvimento morfológico em resposta a luz, assim como regula a reprodução de *F. graminearum* (BAYRAM et al., 2008; BAYRAM; BRAUS, 2012; KIM et al., 2013).

Outros potenciais alvos fazem parte das vias de proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês, mitogen-activated protein kinase – MAPK), que estão envolvidas em diversos processos fisiológicos em respostas a estímulos ambientais pelos fungos como: resposta a estresse, virulência, sinalização celular, interação com outros organismos etc. (MARTÍNEZ-SOTO; RUIZ-HERRERA, 2017). Em *F. graminearum* não é exceção, sendo as proteínas quinases importantes em vários aspectos de crescimento, desenvolvimento e processos infecciosos (WANG et al., 2011). Uma destas vias é a do glicerol de alta osmolaridade (do inglês, High osmolarity glycerol – HOG), o gene *Hog1* (MAPK) é o principal componente desta via e está envolvido na resposta ao estresse por hiperosmolaridade, síntese de glicerol e estresse oxidativo (PAREEK; RAJAM, 2017). Em alguns fungos fitopatogênicos *Hog1* mostra-se importante na patogenicidade por afetar a reprodução sexual, formação de apressório e penetração no tecido hospedeiro (ZHENG et al., 2012). As proteínas quinases inicialmente conhecidas como sendo importantes para reprodução (LEE et al., 2009) e na infecção de plantas por *F. graminearum* são Mgv1, Gpmk e GzSnf1 (HOU et al., 2002; JENCZMIONKA et al., 2003; URBAN et al., 2003; RAMAMOORTHY et al., 2007). Um grande avanço foi

realizado por Wang et al., (2011), que caracterizaram mutantes para genes quinases putativos quanto ao defeito no crescimento, formação de esporos, morfologia de colônias e conídios, germinação, respostas ao estresse, infecção na planta, produção de DON e reprodução sexual, reafirmando que as quinases são importantes para vários processos de desenvolvimento, infecção, virulência e patogenicidade em *F. graminearum*.

Outras proteínas envolvidas na patogenicidade são as lipases, seu papel não está completamente elucidado, mas os resultados iniciais indicam que elas podem ser um alvo promissor para o controle de doenças fúngicas. As lipases são enzimas que hidrolisam as ligações dos ésteres carboxílicos dos triacilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol. Acredita-se que várias lipases secretadas por fungos patógenos de plantas estejam envolvidas na penetração de fungos em barreiras vegetais, como ceras e cutículas (SUBRAMONI; SUÁREZ-MORENO; VENTURI, 2010). Estudos têm mostrado que essas enzimas são fatores associados à virulência e patogenicidade em patógenos de plantas, incluindo *Fgl1* que codifica para uma lipase em *F. graminearum* (VOIGT; SCHAFER; SALOMON, 2005), tornando-o um alvo interessante para HIGS.

A capacidade dos fungos de sobreviver em muitos ambientes está ligada à sua capacidade de adquirir nutrientes essenciais. Por exemplo, para realizar os processos biológicos essenciais os eucariotos precisam de micronutrientes, incluindo o ferro (GREENSHIELDS et al., 2007). Sistemas altamente específicos para a aquisição de ferro foram desenvolvidos pelos fungos, como a produção e a absorção de sideróforos quelantes de ferro, importantes para certos patógenos bacterianos humanos, bem como para fungos fitopatogênicos, como *F. graminearum*, para adquirir ferro do hospedeiro (POWER et al., 2006). Sideróforos são compostos orgânicos de baixo peso molecular com forte atividade quelante de ferro biossintetizados por peptídeos sintetases não ribossomais (NRPSs) (OIDE et al., 2006). Geralmente estão envolvidos em processos de desenvolvimento reprodutivo e patogênico e podem fornecer um mecanismo antioxidante protetor contra espécies reativas de oxigênio (EROs). Em estudo feito por Oide et al. (2006) foi demonstrado que a deleção do gene NPS6, necessário para a biossíntese do sideróforo extracelular triacetil fusarinina C, não afetou a reprodução sexual, mas causou

aumento da sensibilidade à falta de ferro e estresse oxidativo, levando à redução da virulência.

Ainda, os processos celulares de transcrição, replicação e recombinação do DNA são básicos para os organismos eucariotos, incluindo *F. graminearum*. Nesses processos atuam diversas enzimas como as topoisomerases que relaxam o DNA superenovelado, permitindo que estes processos ocorram (WANG, 2002). Baldwin et al. (2010) estudaram o papel da topoisomerase 1 – Top1 em espécies de *Fusarium* e verificaram seu envolvimento na virulência e reprodução.

Por ter função em processos relacionados à sua sobrevivência como metabolismo primário e secundário, desenvolvimento sexual, virulência e patogenicidade em *F. graminearum* os genes *Fgl1*, *Hog1*, *Lae1*, *Snf1*, *Sid1* e *Top1*, tornam-se fortes candidatos para HIGS de *F. graminearum*, pelas evidências apresentadas em estudos anteriores (Tabela 17).

Tabela 17 - Genes envolvidos na virulência de *Fusarium graminearum*, candidatos a HIGS

Gene	Função	ID-PHI / ID - gene	Referência
<i>Hog1</i>	Sinalização via MAP quinase	1005 / FG09612, 2327 / FGSG_09612	Ramamoorthy et al. (2007) Oide et al. (2010)
<i>Fgl1</i>	Lipase	432 / AAQ23181	Voigt et al. (2005)
<i>Snf1</i>	Metabolismo de carbono	1197 / FGSG_02795	Wang et al. (2011)
<i>Sid1</i>	Sideróforo secretado TAFC	1007 / FG03747	Oide et al. (2006)
<i>Top1</i>	Topoisomerase tipo 1	1291 / FGSG_06874	Baldwin et al. (2010)
<i>Lae1</i>	Regulação do metabolismo secundário	7193 / ESU06761	Kim et al. (2013)

Fonte: *PHI: Base de dados Pathogen-Host Interaction, www.phi-base.org

Uma das limitações para confirmar a viabilidade do uso de genes candidatos é a capacidade de estudos funcionais em grande escala. Para isso, o uso da planta modelo *Arabidopsis thaliana* pode ser uma opção para análises mais céleres de potenciais genes alvo para HIGS, ao invés de plantas cultivadas como o trigo. Além disso, a eficiência da produção de plantas transgênicas de trigo é baixa e o custo é alto, assim *arabidopsis* pode ser utilizado para indicar as construções gênicas mais promissoras a serem testadas em trigo. Diversos estudos sugerem que testes preliminares de genes candidatos para HIGS de *F. graminearum* possam ser realizados em *A. thaliana*, auxiliando estudos que

almejam resistência à giberela em trigo e outras espécies de interesse através desta tecnologia (URBAN et al., 2002; CHEN et al., 2006; KOCH et al., 2013; NALAM et al., 2015).

Baseado nesses pressupostos, o objetivo do trabalho foi gerar e avaliar eventos transgênicos em arábido com construções gênicas de RNAi tendo como alvo os genes de *F. graminearum* *Fgl1*, *Hog1*, *Lae1*, *Snf1*, *Sid1* e *Top1*, quanto ao potencial de controle da doença.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Local de realização dos experimentos

A trabalho foi desenvolvido na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Trigo, localizada na Rodovia BR 285, Km 294, Passo Fundo - RS. Foram utilizadas as instalações da instituição para fins desta pesquisa, incluindo o Laboratório de Biotecnologia, de Fitopatologia, bem como casa-de-vegetação e câmaras de crescimento.

As construções HIGS RNAi-*Fgl1*, RNAi-*Hog1*, RNAi-*Lae1*, RNAi-*Sid1*, RNAi-*Snf1*, RNAi-*Top1*, RNAi-*Fgl1* inseridos no T-DNA do vetor plasmidial binário pBinRed e o vetor pBinRed vazio (sem construção HIGS) com o gene *DsRed* somente foram feitas pela instituição de pesquisa Rothamsted Research, no Reino Unido, em projeto colaborativo, e enviadas para a Embrapa Trigo para continuidade dos estudos.

4.3.2 Construções gênicas HIGS

Para esse estudo foram utilizadas seis construções gênicas RNAi (RNAi-*Fgl1*, RNAi-*Hog1*, RNAi-*Lae1*, RNAi-*Sid1*, RNAi-*Snf1* e RNAi-*Top1*) visando ao silenciamento dos genes correspondentes de *F. graminearum* (*Fgl1*, *Hog1*, *Lae1*, *Sid1*, *Snf1*, *Top1*). Cada construção contém um fragmento senso e um antisenso de parte de um destes genes, separados pelos íntrons *Pdk* e *Cat1*, a fim de produzir uma estrutura em

forma de grampo (*hairpin*) após a transcrição. Cada construção teve um único gene alvo, e foram inseridas individualmente no vetor plasmidial binário pBinRed. As sequências dos fragmentos utilizados neste trabalho, no sentido senso, com base no isolado modelo de *F. graminearum* PH-1 estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Sequência dos fragmentos parciais senso do cDNA dos genes *Fgl1*, *Hog1*, *Lae1*, *Sid1*, *Snf1*, *Top1* de *Fusarium graminearum*. Passo Fundo - RS, 2020

(Continua)

Fragmento	Sequência ¹
<i>Fgl1</i>	CCGAGTTGGAAACACACAGCTCGCTGCCTTTGTCTCGAACCAGGCTGGTGGAGAG TTCCGCGTTACGAACGCCAAGGACCCCGTGCCTCGTCTCCCCCTCTGATCTTTGG ATACCGACACACATCCCCGAGTACTGGCTGTCTGGCAGCGGAGGTGACAAGATC GACTACACCATCAACGATGTCAAAGTCTGTGAGGGTGCCGCCAACCTCCGGTGCA ACGGTGGAACTCGGATTGGATATCGATGCCCATCTCCACTACTTCCAGGCAAC CGATGCTTGCTCTGCTGGCGGCAT
<i>Hog1</i>	CTCGGCACCCCCCTGATGATGTTATCAACACCATCGCCAGTGAGAACAACACTCTTCG GTTTGTCAAGTCGCTACCCAAGCGCGAGAGACAGCCCTCCGTAACAAGTTCAAG AACGCAGACGACTCAGCCATTGACCTTCTCGAACGCATGCTTGTCTTTGACCCCAA GAAGCGAATAACTGCCACTGAGGCTCTCGCTCACGACTACCTTCTCCCTACCATG ACCCTACAGACGAGCCTGTGGCTGAGGAAAAATTGACTGGAGTTTCAACGACGC CGATCTGCCTGTTGATACATGGAA
<i>Lae1</i>	TTCCACAAGGTTTTTCTTCTCGCTAGAGATAACAAGCCGTTCCAAGCACCAATTCA ACGAAAAGCGCCAGGATGATGGATATTGGTACCGGAACAGGCATATGGCCGATC AACGTGGCAGAAGAATGCTTACAGACGCCAGATAATGGCTGTGATCTAAACC AGATCTTGCCAGCATGATCCCTCCAGGAGTATTGCCAAAGCAATATGATATAGA GGAACCCACATGGGACTCATTATACACAGATTGCGATTTTATACACATGCGGATGT TATTGGGAAGTATCCAAACAGAC
<i>Sid1</i>	CAGACTCTGCAGGTCGTGCTTGATGACTTGAAGGTGCCTGTTACGGAGCAGAATG TTGAGGGCTCAATTGACGCCGCTGCCAAGCAGCTCGCTGTATCGGATATAAACAG CAGCATCGATCTTACCCATGGATCCTCATTATCCGCTTGTTTGTCTTCGTGGCGA GAGTGAGAATGCTTTAGTCATCCGAATCTCGCACGCTCAGTATGATGGTGTCTC TACCCGAGCTCCTCCGCCAACTCGAGCTTCGATACCGTGGCCTAGAGATTCCATCC TCTGAGCCTTTTCGAGACCTACATTCAGCATCTTTCCGCCG
<i>Snf1</i>	GGCGCTGCAGGCTGCCGAGCCGTCGCCATCAAGGATGCCTACATGATTGTGAGG GAAAACAAAATGATGCAAGTGAACCATAACTCCGAAGCACTGCTAGCAGAGCCA GAAGGGTCAAGTCCCATGCTCAGCATGTCATCAGCCCGTTCAACAATCTCGCAGG CCACTACCACCCCTCGGCCATATGTGAGCAAGGTTGGTATCCTGCCTTCTAGCTTA CCGGCCTATCATAAGGACTATATGGAGCGTGAGAAAGCTGGTAGTGTGAAAAC CGCCGCCAAGGTCCTTATCAACGATGAGCCTCAA

Tabela 18 - Sequência dos fragmentos parciais senso do cDNA dos genes *Fgl1*, *Hog1*, *Lae1*, *Sid1*, *Snf1*, *Top1* de *Fusarium graminearum*. Passo Fundo - RS, 2020

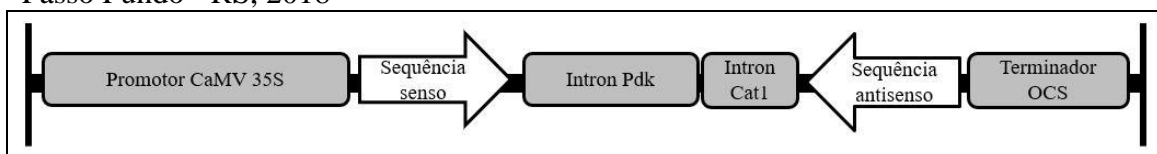
(Conclusão)

Fragmento	Sequência ¹
Top1	CAGCCGCCAATGGTACAACGAAACGCAAATCACGCAATTCCATCACCAAAGTCAA CTACAAGGACGATGAGTCAAGCGACGAAGGTGTTCCACTGGCCAAACGCCAGAA GAAGCAGATAACCAAAGTTGCCGAATCCGATTCCGATGACGAGCCAATCATGAAG GCACGAGGAAAGAAGCTTCCACCGTCTTATAAGGAGACCGCGCTTCCCGAGTCCT CGGACGACGACGACGAGCCTCTCGGTGTGAAACTTGCGCAGAAGAAGGCCAACA TTGAGAAGAAGGCTGAGAAGGAAGCCAAGGCGATTTCGAT

Nota: ¹Sequência com base no isolado modelo de *F. graminearum* PH-1

Cada construção gênica contém o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV), a sequência senso para cada alvo, seguido dos introns Pdk de *Flaveria trinervia* e Cat1 modificado de *Ricinus communis*, a sequência antisense para cada alvo e o terminador OCS da octopina sintase (Figura 24). Além disso, no T-DNA encontra-se o gene repórter DsRed, sob orientação do promotor CaMV 35S e terminador NOS.

Figura 24 - Estrutura básica das construções gênicas RNAi-*Fgl1*, RNAi-*Hog1*, RNAi-*Lae1*, RNAi-*Sid1*, RNAi-*Snf1*, e RNAi-*Top1* para HIGS em *Fusarium graminearum*. Passo Fundo - RS, 2018

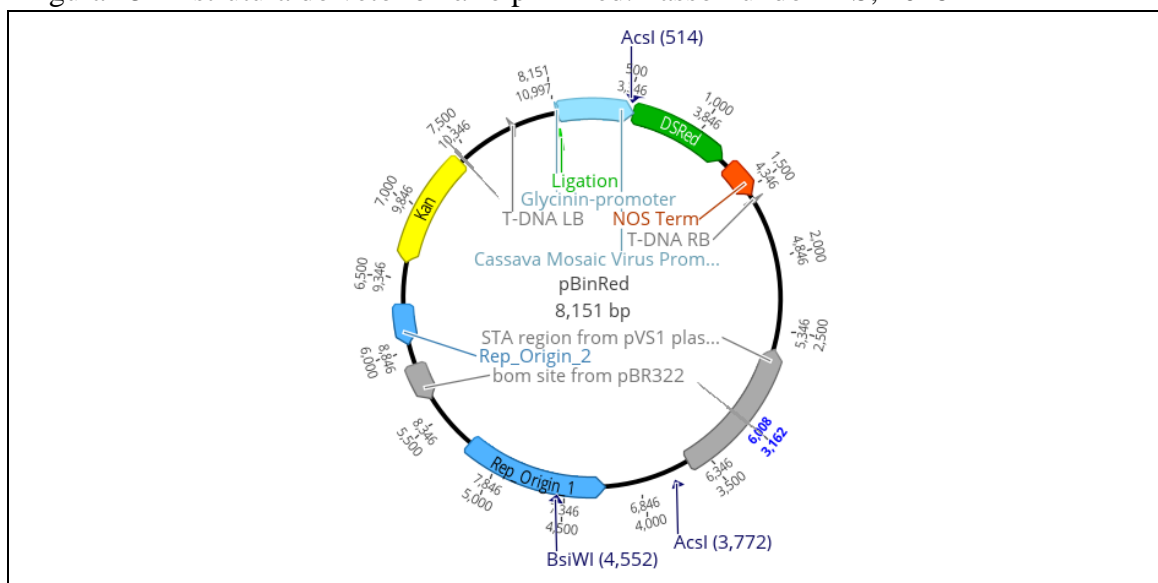


Fonte: Imagem do autor.

Nota: Cada construção gênica contém o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV), a sequência senso para cada alvo, seguido dos introns Pdk de *Flaveria trinervia* e Cat1 modificado de *Ricinus communis*, a sequência antisense para cada alvo e o terminador OCS da octopina sintase.

As construções gênicas foram inseridas no sítio de restrição *AscI* no vetor binário pBinRed que contém o gene que confere resistência a canamicina para seleção *in vitro* de bactérias transformadas. No T-DNA encontra-se o gene repórter DsRed sob controle do promotor do vírus do mosaico da mandioca e terminador NOS (Figura 25).

Figura 25 - Estrutura do vetor binário pBinRed. Passo Fundo - RS, 2018



Fonte: Imagem do Autor.

Nota: O vetor binário pBinRed contém o gene reporter DsRed, sob o controle do promotor do vírus do mosaico da mandioca e terminador do gene da nopalina sintase de *Arabidopsis thaliana*, além do gene NPTII (Kan) que confere tolerância ao antibiótico canamicina para seleção de bactérias contendo estes plasmídeos. Imagem obtida com o programa Geneious Prime.

4.3.3 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

No Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo, os vetores plasmidiais pBinRed (vazio), pBinRed-Fgl1, pBinRed-Hog1, pBinRed-Lae1, pBinRed-Sid1, pBinRed-Snfl e pBinRed-Top1 foram inseridos em *A. tumefaciens* da estirpe AGL1 através de eletroporação, conforme mencionado no item 3.3.3. Para seleção das construções, foi utilizado 50 µg/mL canamicina além de 50 µg/mL de rifampicina e 100 µg/mL de carbenicilina. Para confirmação de que as bactérias foram transformadas foi realizada a extração de plasmídeos conforme descrito no item 3.3.3.

A confirmação da presença dos plasmídeos nas bactérias deu-se por PCR usando dois pares de primers específicos para as construções RNAi (HIGS176 35promoter_F e HIGS177 pdkintron_R) e (HIGS178 cat1intron_F, HIGS179 ocsterm_R) e para o vetor vazio, o par de primer (DsRED F.73 e DsRed R.590) (Tabela 19). A reação da PCR foi feita em reação de 20 µL conforme descrito no item 3.3.3. A reação consistiu em

desnaturação inicial a 94 °C por 1 min, seguida de 40 ciclos (94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s, 68 °C por 1 min), e elongação final de 5 min a 68 °C para as construções RNAi, enquanto para a detecção do vetor pBinRed a temperatura de anelamento foi de 53 °C, de acordo com as características de cada par de primers utilizado.

Tabela 19 - Primers utilizados para a confirmação da presença das construções RNAi e do T-DNA do vetor vazio em *Agrobacterium tumefaciens* e *Arabidopsis thaliana*. Passo Fundo – RS, 2018

Construção	Primer	Sequência	Amplicon (pb)
RNAi-Fgl1	HIGS176 35promoter_F	5' TTTGGAGAGGACACGCTCGA 3'	511
	HIGS177 pdkintron_R	5' TCTTCGTCCTTACACATCACTTGTC A 3'	
	HIGS178 catlintron_F	5' TTTGCGCCATAACCAATCAAT 3'	
RNAi-Hog1	HIGS176 35promoter_F	5' TTTGGAGAGGACACGCTCGA 3'	513
	HIGS177 pdkintron_R	5' TCTTCGTCCTTACACATCACTTGTC A 3'	
	HIGS178 catlintron_F	5' TTTGCGCCATAACCAATCAAT 3'	
RNAi-Lae1	HIGS176 35promoter_F	5' TTTGGAGAGGACACGCTCGA 3'	511
	HIGS177 pdkintron_R	5' TCTTCGTCCTTACACATCACTTGTC A 3'	
	HIGS178 catlintron_F	5' TTTGCGCCATAACCAATCAAT 3'	
RNAi-Sid1	HIGS176 35promoter_F	5' TTTGGAGAGGACACGCTCGA 3'	531
	HIGS177 pdkintron_R	5' TCTTCGTCCTTACACATCACTTGTC A 3'	
	HIGS178 catlintron_F	5' TTTGCGCCATAACCAATCAAT 3'	
RNAi-Snf1	HIGS176 35promoter_F	5' TTTGGAGAGGACACGCTCGA 3'	521
	HIGS177 pdkintron_R	5' TCTTCGTCCTTACACATCACTTGTC A 3'	
	HIGS178 catlintron_F	5' TTTGCGCCATAACCAATCAAT 3'	
RNAi-Top1	HIGS176 35promoter_F	5' TTTGGAGAGGACACGCTCGA 3'	523
	HIGS177 pdkintron_R	5' TCTTCGTCCTTACACATCACTTGTC A 3'	
	HIGS178 catlintron_F	5' TTTGCGCCATAACCAATCAAT 3'	
pBinRed	DsRED F.73	5' CACGAGTTCGAGATCGAGGG 3'	518
	DsRed R.590	5' GCGTCCACGTAGTAGTAGCC 3'	

4.3.4 Transformação de *Arabidopsis thaliana*

Para a transformação genética de *A. thaliana* utilizou-se o ecótipo Landsberg erecta (Ler), seguido os procedimentos descritos no item 4.3.4. No entanto, foram utilizadas colônias de *A. tumefaciens* AGL1 contendo o vetor vazio pBinRed. Vetores plasmidiais contendo as construções RNAi foram crescidas, individualmente, em meio MG/L líquido, acrescido de 1 µg/L de biotina, além de 50 µg /mL de rifampicina e 100

$\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbenicilina para selecionar AGL1, e $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ de canamicina para selecionar o vetor pBinRed com e sem as construções gênicas. Seguido dos procedimentos até obtenção das sementes.

4.3.5 Seleção de sementes expressando o gene DsRed

A seleção de sementes transgênicas T0 foi realizada em microscópio de epifluorescência possuindo o filtro Fs15, que permitiu detectar a fluorescência emitida pelo gene repórter DsRed. As sementes com fluorescência intensa foram separadas manualmente e semeadas para o avanço de geração nas mesmas condições previamente descritas. Foram selecionadas 20 sementes das plantas transformadas com RNAi- Hog1, -Fgl1, e vetor vazio com DsRes; e 40 sementes de RNAi-Top1, -Snf1, -Sid1 e -Lae1.

4.3.6 Confirmação de plantas transgênicas via PCR

Foi realizada a extração de DNA genômico de plantas T0 dos eventos gerados para confirmar a presença do transgene. Foi utilizado o método CTAB conforme descrito no item 4.3.4. As amostras foram quantificadas conforme descritos no item 3.3.4. A confirmação da presença do transgene nas plantas foi feita por PCR nas mesmas condições anteriormente descritas, utilizando os primer descritos na Tabela 19.

As plantas transgênicas T0 foram tutoradas e manejados para o avanço de geração. As sementes T1 provenientes destas plantas foram coletadas, identificadas e armazenadas em geladeira.

4.3.7 Análise de segregação e avanço de geração

Para analisar a segregação do transgene e avançar a geração, cerca de 30 a 55 sementes provenientes de plantas T1, ou o número total de sementes geradas, quando poucas, foram avaliadas em microscópio de epifluorescência com filtro Fs15 (excitação 546 nm / emissão 590 nm) para detecção da fluorescência proveniente da expressão do

gene DsRed, presente em todos os transformantes. Foram contados o número de sementes fluorescentes (F) o de não fluorescentes (SF). A aderência dos modelos genéticos foi conforme descrita no item 3.3.5.

Após a análise de segregação, as sementes fluorescentes (homozigotas/hemizigotas) de eventos selecionados com predição de uma e duas inserções do transgene foram separadas para compor o experimento de inoculação em folhas destacadas. A segregação da fluorescência nos grãos de pólen de plantas T1 foi verificada em microscópio de epifluorescência com a finalidade de identificar as plantas hemizigotas e homozigotas para as construções RNAi, indiretamente, e fazer a correlação com os sintomas de *F. graminearum*. As possíveis homozigotas foram cultivadas até o final do ciclo para obtenção de sementes.

4.3.8 Inoculação com discos de *F. graminearum* em folhas destacadas de *arabidopsis*

A avaliação da resistência ao fungo das linhagens transgênicas foi feita utilizando discos de meio de cultura contendo micélio de *F. graminearum*, conforme descrito no item 3.3.6. A severidade foi quantificada aos 3 dias após a inoculação (dpi), através da análise das imagens utilizando software ImageJ (v. 1.8.0_112).

Os experimentos foram compostos por folhas destacadas de plantas dos eventos transgênicos RNAi-Hog1, RNAi-Lae1, RNAi-Sid1, RNAi-Snf1, e RNAi-Top1 e controles DsRed e Ler não transgênico, sendo que foram inoculadas 16 folhas por linhagens alocadas em 4 repetições, o delineamento adotado foi inteiramente casualizado. Os dados analisados conforme descrito no item 3.3.6.

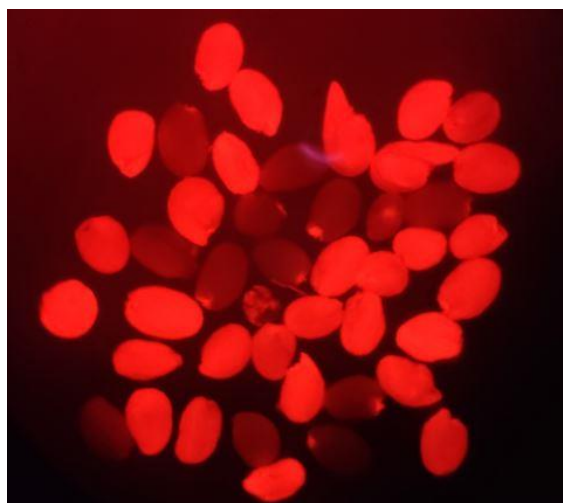
4.4 Resultados

A partir da transformação de *A. thaliana* via *A. tumefaciens* foram geradas sementes T0, as quais foram selecionadas em microscópio, com base na fluorescência emitida pelo DsRes. No total, sobreviveram plantas de três eventos DsRed (vetor vazio),

dez eventos RNAi-Fgl1, dois eventos RNAi-Hog1, nove eventos RNAi-Lae1, sete eventos RNAi-Sid1, 14 eventos RNAi-Snf1 e cinco eventos RNAi-Top1, totalizando 50 eventos selecionados. A detecção das construções gênicas por PCR não foi satisfatória, possivelmente pela baixa qualidade do DNA extraído. Apenas as plantas Snf1.4 e Fgl1.4 tiveram a amplificação dos dois braços (fragmentos senso e antisenso). Hog1.3 amplificou somente o braço senso. As três plantas transformadas com o vetor vazio apresentaram a amplificação de DsRed.

Sementes T1 de 48 dos eventos citados foram analisadas quanto a segregação da fluorescência com a finalidade de estimar o número de insertos, sendo testadas hipóteses para uma e duas inserções, correspondendo às proporções 3:1 e 15:1, respectivamente, de sementes com fluorescência (F) para sementes sem fluorescência (SF) (Tabela 20). Na Figura 26, é possível observar a segregação na progênie Sid1.1, havendo 30 sementes com expressão do gene DsRed e 13 sem expressão tendo, portanto, a proporção 30F:13SF.

Figura 26 - Sementes transgênicas da geração T1 de planta transformada com a construção gênica RNAi-Sid1, visualizadas em microscópio de epifluorescência com filtro Fs15. Passo Fundo - RS, 2020



Fonte: Imagem do autor.

Nota: Sementes T1 da planta 1 (Sid1.1). O T-DNA também possui o gene *DsRed*, além da construção gênica para RNAi.

As plantas geradas com o vetor vazio (DsRed) apresentaram segregações compatíveis para uma cópia (DsRed.9, $\chi^2=0,79$, $p.=0,373$) e duas cópias (DsRed.4, $\chi^2=0,44$, $p.=0,495$) (Tabela 20). Para plantas geradas com a construção RNAi-Fgl1, quatro se ajustaram à proporção 3:1 esperada para uma cópia ($p.>0,05$), uma se ajustou a proporção 15:1 para duas cópias (Fgl1.6, $\chi^2=2,40$, $p.=0,121$). O evento Hog1.5 se ajustou a proporção de 3:1 de sementes F:SF ($\chi^2=0,07$, $p.=0,787$). Cinco eventos da construção RNAi-Lae1 apresentaram ajuste para uma cópia ($p. >0,05$), os demais não apresentaram fluorescência. Dois eventos RNAi-Sid1, se ajustaram a proporção esperada de 3:1 ($p.>0,05$). Dos 14 eventos gerados com RNAi-Snf1, apenas três ajustaram-se à proporção de 3:1 ($p.> 0,05$), e um teve ajuste para duas inserções (Snf1, $\chi^2=0,68$, $p.=0,408$). Dois eventos com a construção RNAi-Top1, se ajustaram à proporção 3:1 (F:SF) (Tabela 20).

Tabela 20 - Análise da segregação da fluorescência proveniente do gene *DsRed* de plantas transgênicas T1 transformadas com as construções RNAi-Fgl1, RNAi-Hog1, RNAi-Lae1, RNAi-Sid1, RNAi-Snf1, RNAi-Top1 e plantas geradas com o vetor vazio (DsRed). Passo Fundo - RS, 2020

(Continua)					
Evento	O (F:SF)	E (F:SF): 3:1		E (F:SF):15:1	
		χ^2	<i>p.</i>	χ^2	<i>p.</i>
DsRed.4	7:0	2,33	0,127	0,47	0,495
DsRed.9	29:13	0,79	0,373	43,74	<0,001
DsRed.11	0:47	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Fgl1.1	21:12	2,27	0,132	51,07	<0,001
Fgl1.2	4:9	13,56	<0,001	88,01	<0,001
Fgl1.3	17:6	0,01	0,904	15,45	<0,001
Fgl1.4	4:30	72,51	<0,001	390,03	<0,001
Fgl1.5	23:16	5,34	0,021	80,49	<0,001
Fgl1.6	36:0	12,00	0,001	2,40	0,121
Fgl1.7	18:12	3,60	0,058	58,32	<0,001
Fgl1.9	24:14	2,84	0,092	60,69	<0,001
Fgl1.10	16:22	21,93	<0,001	172,98	<0,001
Fgl1.11	0:49	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Hog1.3	53:0	17,67	<0,001	3,53	0,060
Hog1.5	30:11	0,07	0,787	29,63	<0,001
Lae1.1	0:45	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lae1.3	30:12	0,29	0,593	35,71	<0,001

Tabela 20 - Análise da segregação da fluorescência proveniente do gene *DsRed* de plantas transgênicas T1 transformadas com as construções RNAi-Fgl1, RNAi-Hog1, RNAi-Lae1, RNAi-Sid1, RNAi-Snf1, RNAi-Top1 e plantas geradas com o vetor vazio (DsRed). Passo Fundo - RS, 2020

(Conclusão)

Evento	O (F:SF)	E (F:SF): 3:1		E (F:SF):15:1	
		χ^2	<i>p.</i>	χ^2	<i>p.</i>
Lae1.4	28:15	2,24	0,134	60,17	<0,001
Lae1.5	0:41	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Lae1.7	37:7	1,94	0,164	7,01	0,008
Lae1.8	98:67	21,43	<0,001	332,38	<0,001
Lae1.10	27:16	3,42	0,064	70,34	<0,001
Lae1.11	32:13	0,36	0,547	39,36	<0,001
Sid1.1	30:13	0,63	0,428	42,21	<0,001
Sid1.2	0:38	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Sid1.4	0:45	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Sid1.5	0:41	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Sid1.6	0:45	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Sid1.7	18:4	0,55	0,460	5,35	0,021
Snf1.1	24:14	2,84	0,092	60,69	<0,001
Snf1.2	30:6	1,33	0,248	6,67	0,010
Snf1.3	2:34	92,59	<0,001	477,90	<0,001
Snf1.4	27:15	2,57	0,109	62,23	<0,001
Snf1.5	0:50	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Snf1.6	0:34	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Snf1.7	0:37	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Snf1.8	0:55	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Snf1.9	39:4	5,65	0,017	0,68	0,408
Snf1.10	0:36	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Snf1.11	0:42	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Snf1.13	0:45	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Snf1.15	0:39	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Snf1.16	0:41	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Top1.1	0:43	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Top1.3	8:24	42,67	<0,001	258,13	<0,001
Top1.4	33:10	0,07	0,792	21,22	<0,001
Top1.6	3:38	100,17	<0,001	522,75	<0,001
Top1.8	0:41	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Fonte: Dados do Autor.

Nota: Proporção observada (O) de sementes com fluorescência (F) e sem fluorescência (SF) em microscópio de epifluorescência com filtro Fs15, proporção testada/esperada (E), valor de Qui-quadrado (χ^2), probabilidade do teste de Qui-quadrado (*p.*). Em negrito estão os genótipos selecionados para compor o experimento de inoculação e os respectivos valores de *p.*

Com base nas segregações estimadas foram selecionados 18 eventos para compor o experimento de inoculação, sendo selecionados os eventos DsRed.9, Fgl1.7, Fgl1.9, Fgl1.10, Hog1.3, Hog1.5, Lae1.3, Lae1.4, Lae1.7, Lae1.10, Sid1.1, Sid1.7, Snf1.1, Snf1.2, Snf1.4, Snf1.9, Top1.3 e Top1.4. Plantas dos eventos contendo a construção RNAi-Fgl1 não germinaram, assim como poucas sementes do evento Snf1.2 e Top1.3 germinaram; portanto, não participaram do ensaio de inoculação.

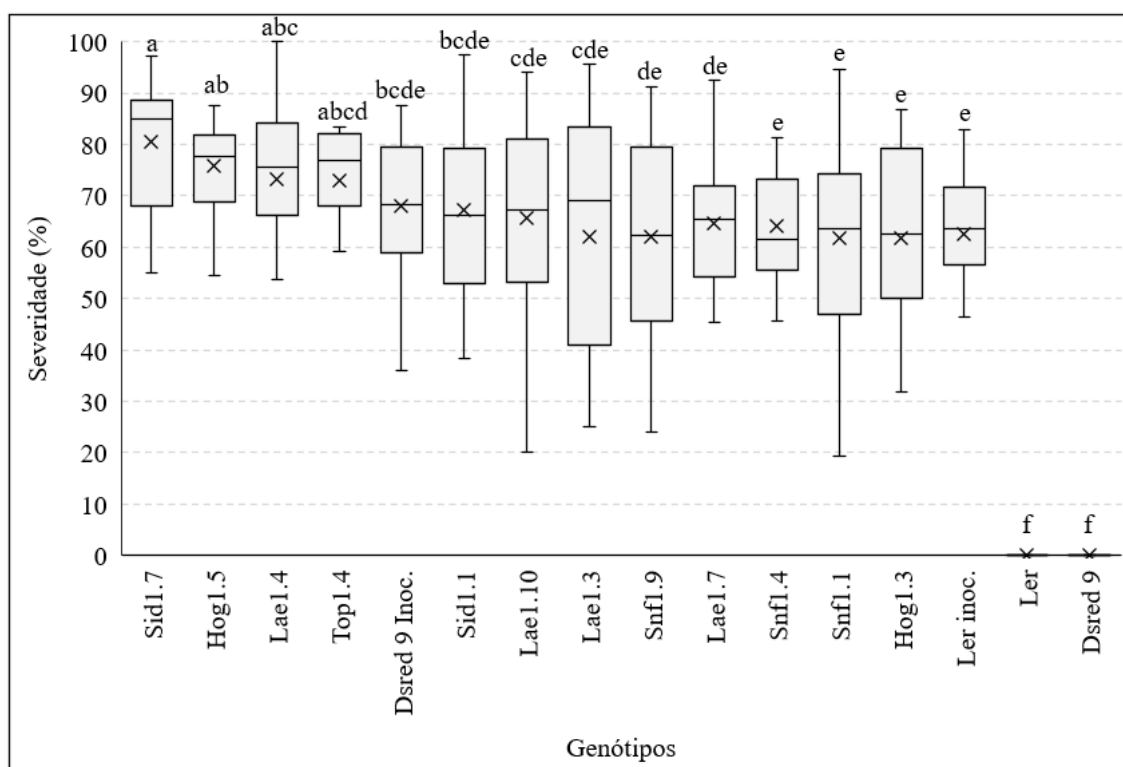
Para verificar se *A. thaliana* transformadas com as construções gênicas RNAi-Hog1, RNAi-Lae1, RNAi-Sid1, RNAi-Snf1, e RNAi-Top1 para HIGS exibiram resistência à *F. graminearum*, 12 eventos transgênicos RNAi foram submetidos a ensaio de inoculação e analisadas quanto a resistência à infecção, uma linhagem transgênica com o vetor DsRed vazio (evento DsRed.9) e plantas controle não transgênicas.

O aparecimento dos sintomas iniciou-se a partir de 24 horas, apresentando sintomas como clorose no limbo foliar, próximo à lesão da inoculação, seguido da disseminação dos sintomas a partir do local inoculado, e posteriormente houve surgimento de necrose. Os sintomas para todos os tratamentos iniciaram de maneira uniforme, não foi observado diferença no período de incubação entre plantas contendo as construções e as plantas controle Ler. Aos 3 dpi, a severidade foi elevada, acima de 60%, as folhas inoculadas apresentaram crescimento de micélio abundante. Não foi observada contaminação nos controles Ler e DsRed.9 não inoculados (Figura 27).

Ao final de 3 dpi, a média de severidade em folhas destacadas de plantas transgênicas contendo as construções gênicas variou de 61,6 a 80,5%, sendo a menor severidade média observada no evento Snf1.1 e a maior foi observada no evento Sid1.7 (Figura 27). Os controles Ler inoculado (Ler inoc.) e plantas transformadas com o vetor DsRed vazio (DsRed.9) apresentaram média de 62,6 e 68,1% respectivamente, enquanto os mesmos, sem o inóculo, não apresentaram sintomas da doença. A média do experimento foi de 67,30%. A severidade média dos eventos para cada construção RNAi-Hog1, -Lae1, -Sid1, -Snf1 e -Top1 foi de 68,8%, 66,4%, 73,8, 62,6 e 72,9, respectivamente.

Foi identificada diferença significativa entre os tratamentos inoculados com discos de *F. graminearum* CML3066 ($\chi^2_{(15)}=105,464$; $p.<0,001$), mas nenhuma linhagem contendo as construções gênicas RNAi apresentou redução significativa na severidade em relação ao controle Ler inoc. pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p.<0,05$) (Figura 27).

Figura 27 - Severidade em folhas destacadas de linhagens transgênicas de *Arabidopsis thaliana* (Ler) contendo as construções gênicas RNAi Hog1, Lae1, Sid1, Snf1, Top1 e DsRed (vetor vazio), inoculadas com *Fusarium graminearum*. Passo Fundo - RS, 2020



Fonte: Dados do Autor.

Nota: O inóculo foi um disco de 3 mm de diâmetro de meio de cultura contendo micélio de *Fusarium graminearum* CML3066. A avaliação ocorreu 3 dias após a inoculação. O símbolo “x” dentro do boxplot representa a média. Letras distintas sobre o boxplot indicam diferença pelo teste de não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p.<0,05$).

Severidade significativamente superiores aos de Ler inoc. foi constatado nos eventos Sid1.7, Hog1.5, Lae1.4 e Top1.4. Nenhum evento transgênico apresentou redução na severidade quando comparado com o controle DsRed9. Os genótipos controle

não inoculados não apresentaram sintomas da doença, sendo diferentes dos demais tratamentos, pelo teste realizado (Figura 27).

As plantas foram verificadas quanto à zigosidade em relação ao transgene DsRed (e indiretamente quanto às construções RNAi), no decorrer do experimento, iniciado antes e terminado após a inoculação, conforme a floração foi ocorrendo. Para isso, os grãos de pólen foram visualizados em microscópio de epifluorescência contendo filtro Fs15, e a zigosidade foi associada à severidade em cada evento (Tabela 21). Para algumas plantas não foi possível determinar a zigosidade (Não determinado) uma vez que as plantas já estavam passadas para tal avaliação.

Elevada severidade, acima de 50%, foi observada em todos os genótipos inoculados, independente da zigosidade. Plantas dos eventos Lae1.7, Hog1.3, Hog1.5, Snf1.9, Sid1, Snf1.1 e DsRed (vetor vazio) apresentaram severidades com valores superiores em plantas homocigotas em comparação às plantas hemizigotas. A severidade foi menor em plantas homocigotas em relação às hemizigotas somente em plantas dos eventos Lae1.4 e Lae1.10 (Tabela 21).

Tabela 21 - Zigosidade de plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* determinada com base na emissão de fluorescência proveniente do gene repórter DsRed e relação com a severidade. Passo Fundo - RS, 2020

(Continua)			
Genótipo ¹	Identificação das plantas ²	Zigosidade	Severidade ³
Lae1.3	3(2), 5, 8(2), 9(2), 10(4), 11, 15 (3), 17	Hemizigoto	62,08
	1, 7, 9, 10, 14(3), 15, 17(3), 18, 19	Hemizigoto	74,62
Lae1.4	5	Homozigoto	67,03
	2(2)	Não determinado	66,77
Lae1.7	3, 7(2), 8(2), 9(3), 10, 14, 15(3)	Hemizigoto	62,19
	11, 16(2)	Homozigoto	66,57
Lae1.10	1, 2(2), 3, 5(2), 6, 10, 11(3), 13, 15(2)	Hemizigoto	66,67
	16(2)	Homozigoto	59,06
Hog1.3	6, 9(3), 13, 18, 20(4)	Hemizigoto	59,96
	12(4)	Homozigoto	66,48
	7, 17	Não determinado	61,51
Hog1.5	7, 10(2), 14, 15, 16(2), 17(2), 18	Hemizigoto	73,46
	1(3), 2(2), 9(4)	Homozigoto	78,80
	8	Não determinado	72,49
Snf1.4	1(3), 2(4), 5(3), 7(2), 8(2)	Hemizigoto	62,58
	9(2)	Não determinado	74,86

Tabela 21 - Zigosidade de plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* determinada com base na emissão de fluorescência proveniente do gene repórter DsRed e relação com a severidade. Passo Fundo - RS, 2020

Genótipo ¹	Identificação das plantas ²	(Conclusão)	
		Zigosidade	Severidade ³
Snf1.9	13, 14	Hemizigoto	54,54
	8(2), 12(2)	Homozigoto	63,47
	x(6), 19(4)	Não determinado	63,13
Sid1.1	1, 4(2), 10, 15(4), 16, 18, 20(2)	Hemizigoto	66,20
	13, 14(2)	Homozigoto	70,58
	x	Não determinado	68,00
Sid1.7	1(3), 4(2)	Hemizigoto	72,85
	6, 7(2), 9, 11(3)	Não determinado	85,95
Top1.4	5, 11(2), 15	Hemizigoto	73,09
	3(2), 7(2), 14(2), 16(2), x(4)	Não determinado	72,84
Snf1.1	2(2), 11(2)	Hemizigoto	60,10
	4	Homozigoto	65,88
	3(3), 12, 16, a, b(2), x, y(2)	Não determinado	61,84
DsRed.9 Inoc.	2(2), 10(2)	Hemizigoto	58,81
	23(3)	Homozigoto	73,88
	5, 6(3), 9(2), 24(3)	Não determinado	70,94
DsRed.9	2(4), 12(5), 16, 18	Hemizigoto	0,00
	15(2), 21(3)	Não determinado	0,00

Fonte: Dados do autor.

Notas: Os grãos de pólen foram visualizados em microscópio de epifluorescência contendo filtro Fs15.

¹ Eventos transgênicos de *Arabidopsis thaliana* (Ler) contendo as construções gênicas RNAi Hog1, Lae1, Sid1, Snf1, Top1 e DsRed (vetor vazio).

² Os números entre parênteses representam o número de folhas inoculadas desta planta. Os números sem parênteses associados indicam uma folha inoculada desta planta.

³ A severidade foi avaliada em folhas destacadas inoculadas com discos de *Fusarium graminearum* CML3066, 3 dpi. A severidade representa a média para as folhas inoculadas.

Algumas plantas de cada evento foram selecionadas para detecção do transgene via PCR após a realização da inoculação em folhas destacadas (Tabela 22). Nem todas as plantas verificadas por PCR foram inoculadas e o contrário é verdadeiro também.

A análise da detecção dos transgenes por PCR mostrou que os eventos Snf1.4, Snf1.9, Top1.4 e Snf1.1 apresentaram amplificação de maneira consistente dos dois braços (senso e antisenso) da construção gênica nas progênes T1 amostradas (Tabela 22).

Tabela 22 - Detecção dos transgenes em plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas com o gene repórter DsRed e construções gênicas para HIGS em *Fusarium graminearum*. Passo Fundo - RS, 2020

Genótipo ¹	Fragmento amplificado		Genótipo	Fragmento amplificado	
	Senso ²	Antisense ³		Senso	Antisense
Lae1.3.5	- ⁴	+ ^{5?}	Snf1.4.7	+	+
Lae1.3.11	-	+ [?]	Snf1.4.8	+	+
Lae1.3.16	+	-	Snf1.9.8	+	+
Lae1.4.5	+	-	Snf1.9.12	+	+
Lae1.4.7	+	-	Snf1.9.20	+	+
Lae1.4.10	+	-	Sid1.1.7	-	-
Lae1.7.8	-	-	Sid1.1.13	+	+ [?]
Lae1.7.11	-	+	Sid1.1.14	-	-
Lae1.7.16	-	-	Sid1.1.18	+	+ [?]
Lae1.10.1	-	-	Sid1.7.1	-	-
Lae1.10.16	-	-	Sid1.7.2	+	-
Hog1.3.10	+	-	Sid1.7.4	+	+ [?]
Hog1.3.12	+ [?]	+	Top1.4.5	+	+
Hog1.3.15	+	-	Top1.4.6	+	+
Hog1.5.1	+ [?]	-	Top1.4.11	+	+
Hog1.5.2	-	+	Snf1.1.4	+	+
Hog1.5.9	-	-	Snf1.1.11	+	+
Snf1.4.2	+	+	Snf1.1.16	+	+

Fonte: Dados do autor.

Notas: ¹Plantas transgênicas T1 de *Arabidopsis thaliana* ecótipo Ler contendo as construções gênicas RNAi Hog1, Lae1, Sid1, Snf1 e Top1.

² Detecção do fragmento senso da construção gênica por meio de PCR utilizando os primers HIGS176 35promoter_F e HIGS177 pdkintron_R.

³ Detecção do fragmento antisense da construção gênica por meio de PCR utilizando os primers HIGS178 cat1intron_Fe HIGS179 ocsterm_R.

⁴ Presença do produto amplificado.

⁵ Ausência do produto amplificado.

[?] Produto amplificado apresentando banda fraca.

Nas progênies Lae1.7.16, La1.10.1, La1.10.16, Hog1.5.9, Sid1.1.14, e Sid1.7.1, nenhum dos braços da construção amplificou, enquanto as demais progênies, pelo menos um dos lados foi amplificado (Tabela 22). A amplificação dos dois braços indica que a construção gênica está intacta, enquanto a não amplificação de um ou dos dois braços é indicativo de alguma alteração no transgene.

4.5 Discussão

Nesse estudo foi investigada a possibilidade de utilizar os genes *Fgl1*, *Hog1*, *Lae1*, *Sid1*, *Snf1* e *Top1*, que estão envolvidos em importantes processos de *F. graminearum*, para serem alvos de HIGS visando ao controle desse patógeno. Os alvos aqui testados ainda não haviam sido explorados como alvos do silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro em *F. graminearum* em plantas de *arabidopsis*, sendo esta, portanto, a primeira vez que são testados neste sentido.

A presença do gene repórter *DsRed* no T-DNA, juntamente com as construções RNAi fornece uma facilidade para a seleção das sementes transformadas, além de auxiliar na análise de segregação da característica no pólen das plantas transgênicas. O filtro Fs 15 (excitação 546 nm / emissão 590 nm) permitiu visualizar a fluorescência *DsRed* (excitação 561 nm / emissão 598 nm), no entanto, não é o mais adequado, portanto, é esperada alguma incerteza na visualização.

A seleção das sementes T0 foi realizada por meio de visualização em microscópio de epifluorescência com filtro Fs15, onde a fluorescência nem sempre foi claramente discernível e pode ter ocorrido falha na seleção, o que poderia explicar a totalidade de sementes sem fluorescência observadas em grande parte dos eventos RNA-Sid1 e RNAi-Snf1 (Tabela 20). A detecção por PCR das construções gênicas nestas plantas T0 não foi possível, provavelmente por problemas com a qualidade do DNA, que foi extraído e armazenado por alguns meses até a análise, devido à pandemia de coronavírus. Apenas as plantas *Snf1.4* e *Fgl1.4* tiveram a amplificação dos dois braços (fragmentos senso e antisenso). *Hog1.3* amplificou somente o braço senso.

Outra informação a ser destacada é a integridade das construções gênicas, quando feita a detecção dos transgenes via PCR, posterior a inoculação, de uma amostragem das plantas T1. Apenas plantas dos eventos *Snf1.4*, *Snf1.9*, *Top1.4* e *Snf1.1* apresentaram amplificação dos dois braços da construção gênica, indicando a integridade nestes eventos. Nas demais, apenas um ou nenhum dos braços apresentou amplificação. A amplificação do gene *DsRed* em todas as amostras indica que o DNA estava íntegro. A

planta T0 Snf1.4 havia amplificado os dois braços e foi reconfirmado na geração T1. A planta Hog1.3 havia amplificado somente o braço senso. Na geração T1, três plantas amplificaram o braço senso e dessas, uma amplificou o braço antisenso. Já foi demonstrado que T-DNAs contendo hpDNA são altamente propensos a deleções em plantas transgênicas de tabaco, onde dentre 33 plantas transgênicas, somente 12 não apresentaram deleção; e dentre estas 12, dez tiveram cópias adicionais truncadas (SUNITHA et al., 2012). Possivelmente é o que ocorreu com as plantas deste trabalho. Mas caso tenham ocorrido estas deleções, não se sabe a extensão destas nem se isso comprometeu a formação das estruturas em grampo e produção de siRNAs. Além disso, em trabalho posterior, Shanmugapriya, Das e Veluthambi (2015) verificaram que a construção em si é influenciada pela disposição das sequências dentro da construção, quando foi colocado o promotor *nos* para controlar a transcrição do gene marcador *nptII* e promotor 35S para controlar a construção *hpTrAP*, houve um maior número de plantas transgênicas com o *hpTrAP* íntegras. Ainda, foi verificado que as plantas com o transgene completo acumularam altos níveis de siRNA, enquanto plantas com o transgene truncado acumularam níveis menores de siRNA. Talvez a disposição das sequências nas construções em nosso trabalho não tenha favorecido o desenvolvimento de um maior número de plantas transgênicas com a sequência dsRNA íntegra, conseqüentemente baixos níveis de siRNA estariam sendo acumulados.

As vias da MAPK (do inglês Mitogen-activated protein kinase – MAPK) são um dos mecanismos de sinalização celular mais importantes e conservados evolutivamente existente em organismos eucariotos, que inclui as etapas desde a detecção dos estímulos ambientais na membrana celular, a transdução deste sinal até o núcleo e a ativação de fatores de transcrição, os quais induzem ou reprimem genes envolvidos na adaptação celular ou resposta aos estímulos detectados (MARTÍNEZ-SOTO; RUIZ-HERRERA, 2017). Na etapa de transdução de sinais, de maneira simplificada, a MAPKKK ativada fosforila MAPKK, que por sua vez fosforila MAPK e atua nos fatores de transcrição. Em fungos, as vias de MAPK estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e de desenvolvimento, resposta a estresse, virulência, sinalização celular, interação com outros organismos etc. (MARTÍNEZ-SOTO; RUIZ-HERRERA, 2017). Uma destas vias é a do

glicerol de alta osmolaridade (do inglês High osmolarity glycerol – HOG), e o gene *Hog1* (MAPK) é o principal componente desta via e está envolvido na resposta ao estresse por hiperosmolaridade, síntese de glicerol e estresse oxidativo (PAREEK; RAJAM, 2017). Em alguns fungos fitopatogênicos *Hog1* mostra-se importante na patogenicidade por afetar a reprodução sexual, formação de apressório e penetração no tecido hospedeiro. Em *F. graminearum*, Nguyen, Schaefer e Bormann (2012) demonstraram a importância de *Hog1* na produção de esporos e o papel na sinalização relacionada às espécies reativas de oxigênio como regulador de genes envolvidos no processo. Pareek e Rajam (2017) demonstraram que em mutantes por RNAi de *Hog1* e *Pbs2* (MAPKK) de *F. oxysporum*, o tamanho do conídio é alterado e o crescimento invasivo e a patogenicidade são reduzidos em frutos de tomate. Em *F. graminearum*, os mutantes *Fghog1*, *Fgpbs2* e *Fgssk2* (MAPKKK) tiveram redução na taxa de crescimento, no crescimento aéreo e no ângulo de ramificação das hifas e foram hipersensíveis a estresse hiperosmótico e a outros estresses, além de serem defectivas na reprodução sexual, perderam a fertilidade feminina em ensaios *in vitro* (ZHENG et al., 2012). Estes mutantes ainda apresentaram virulência e produção de DON reduzidas. Embora as abordagens utilizadas sejam diferentes, no presente trabalho, não foi observada redução na patogênese de *F. graminearum* em folhas destacadas de *A. thaliana* transgênica contendo a construção RNAi-*Hog1* aos 3 dpi. Houve elevada severidade (acima de 60%), com crescimento micelial abundante nos genótipos *Hog1.5* e *Hog1.3*. Além disso, quando analisados os dados de zigozidade, folhas destacadas de plantas homozigotas apresentaram maior valor de severidade do que plantas hemizigotas.

Outras duas MAPK, *Mgv1* e *Gpmk1*, são conhecidas por estarem envolvidas na patogenicidade em *F. graminearum* e por regular a sensibilidade às defensinas (RAMAMOORTHY et al., 2007). Mutantes para estes genes são incapazes de infectar espiguetas de trigo e exibem secreção alterada de várias enzimas extracelulares. Dentre elas, a expressão da lipase *Fgl1* que é conhecida por ser um fator de virulência importante de *F. graminearum*, é diminuída no mutante para *Gpmk1* (SALOMON et al., 2012). Mutantes de *Fgfgl1* tiveram a atividade lipolítica extracelular reduzida em cultura assim como houve redução da virulência tanto para o trigo quanto para o milho (VOIGT,

SCHAFFER E SALOMON, 2005). Posteriormente foi verificado que a lipase Fgl1 é necessária, mas não é suficiente para restaurar a patogenicidade completa do mutante não patogênico *gpmk1* de *F. graminearum* (SALOMON et al. 2012), o que é condizente com a redução e não eliminação da virulência em mutantes *Fgfgl1*. Acredita-se que esta lipase seja responsável pela geração de ácidos graxos livres poliinsaturados que suprimem a biossíntese de calose pela planta, para inibir a imunidade inata durante a infecção em espigas de trigo (BLÜMKE et al., 2014). No presente estudo não foi possível verificar se a construção RNAi-Fgl1 em plantas transgênicas de *Arabidopsis* confere resistência à *F. graminearum*, uma vez que não foi possível avaliar as construções geradas frente ao patógeno, as plantas germinadas dos eventos Fgl1.7, Fgl1.9, Fgl1.10 por motivo desconhecido acabaram morrendo.

Genes que codificam proteínas quinases como *Snf1* (Sucrose non-fermenting 1) são importantes em vários aspectos de crescimento, desenvolvimento e processos infecciosos em *F. graminearum* (WANG et al., 2011). Foi demonstrado que GzSNF1 é requerido para o desenvolvimento sexual e assexual de *Gibberella zeae*, sendo importante também para o crescimento vegetativo e patogênese (LEE et al., 2009). Wang et al. (2011) verificaram que o mutante Fg09897, com um gene predito como *Snf1* deletado, apresentou 75% de redução na taxa de crescimento e de cerca 45% na formação de conídios em ensaio *in vitro*. Quando inoculado em trigo, o índice da doença foi 13 vezes menor em relação ao fungo PH-1 não mutado, reforçando sua importância no processo infeccioso. Diferentemente do presente trabalho, nos eventos contendo a construção RNAi-Snf1 (*Snf1.1*, *Snf1.4* e *Snf1.9*), não foi observado redução no desenvolvimento de *F. graminearum* aos 3 dpi, pelo contrário, foi verificada elevada severidade, sendo acima de 60%.

No presente trabalho nós verificamos o potencial de *Lae1*, ortólogo a *LaeA*, putativa histona metiltransferase – (do inglês, *loss of aflatoxin expression*), que é um regulador global do metabolismo secundário em fungos filamentosos que pertence ao complexo velvet (BAYRAM et al., 2008; NIEHAUS et al., 2018). *LaeA* em *Aspergillus nidulans*, afeta a expressão de múltiplos clusters de genes de metabólitos secundários, modificando a estrutura da heterocromatina (BUTCHKO et al., 2012). Ortólogos ao gene

de *A. nidulans* foram identificados em várias espécies de ascomicetos incluindo *F. graminearum* (KIM et al., 2013). Butchko et al. (2012), realizaram deleção de *LaeA*, o que resultou na redução da expressão de grupos de genes responsáveis pela síntese de metabólitos secundários, que são tóxicos à saúde humana como a fumosinas, bicaverina, ácido fusárico e fusarina. A deleção de *LaeA* em várias espécies de fungos resultou na regulação negativa de vários genes, na diminuição dos níveis de produção de metabólitos secundários, e alteração do desenvolvimento assexuado e sexuado e redução da virulência de fungos patogênicos (JAIN; KELLER, 2013). No presente estudo foi avaliado o potencial do gene *LaeA* de *F. graminearum* como alvo de HIGS em *A. thaliana*. Folhas destacadas dos genótipos transgênicos contendo a construção RNAi-Lae1 apresentaram elevada severidade, variando entre 62,1% e 73,2%. Não foi verificada uma redução significativa na severidade em comparação com os controles, mostrando que a virulência de *F. graminearum* não foi alterada quando exposto à linhagens transgênicas contendo RNAi-Lae1. Diferentemente, Kim et al. (2013) verificaram que a deleção de *LaeA* na estipe transgênica de *F. graminearum* levou à redução do acúmulo de micotoxinas, e quando este gene foi superexpresso houve um aumento da produção de tricotecenos e de outros metabólitos secundários. No mesmo trabalho foi demonstrado que *LaeA* em *F. graminearum* controla negativamente a indução peritecinal e a virulência na planta hospedeira, uma vez que os sintomas em trigo foram reduzidos quando inoculados com o mutante de perda de função para *LaeA*.

Paralelamente foi investigado o potencial de HIGS de gene relacionado com a sobrevivência de *F. graminearum*. A habilidade dos fungos de sobreviver em muitos ambientes está ligada à sua capacidade de adquirir nutrientes essenciais. O ferro é um micronutriente essencial para todos os eucariotos, pois participa de vários processos biológicos essenciais, sendo geralmente complexado e disponível em quantidades muito limitadas. Sistemas altamente específicos para aquisição de ferro foram desenvolvidos pelos fungos como a produção e a absorção de sideróforos quelantes de ferro, importantes para certos patógenos bacterianos humanos, bem como em fungos fitopatogênicos, como *F. graminearum* para adquirir ferro do hospedeiro (POWER et al., 2006). Sideróforos são compostos orgânicos de baixo peso molecular com forte atividade quelante de ferro

biossintetizados por peptídeos sintetases não ribossomais (NRPSs) (OIDE et al., 2006). Geralmente estão envolvidos em processos de desenvolvimento reprodutivo e patogênico e podem fornecer um mecanismo antioxidante protetor contra espécies reativas de oxigênio (EROs).

No presente trabalho nós selecionamos eventos transgênicos com a construção RNAi-Sid1 tendo como alvo o respectivo gene de *F. graminearum*, dois eventos transgênicos foram avaliados quanto a possibilidade de obter resistência ao patógeno. *F. graminearum* foi capaz de se propagar em folhas destacadas de arabis contendo as construções gênicas de RNAi-Sid1, sendo verificada uma elevada severidade para os eventos, chegando a 67,5% no genótipo transgênico menos suscetível, alcançando 80,5% no mais suscetível. Os resultados vão em sentido oposto ao estudo feito por Oide et al. (2006) que sugerem que *Sid1* é necessário para virulência. Oide et al. (2006) estudaram o papel do gene *NPS6* que codifica para um peptídeo sintase não ribossomal que é um determinante de virulência em patógenos ascomicetos, incluindo *F. graminearum*, *NPS6* é responsável pela biossíntese de sideróforos extracelulares triacetil fusarinina C em *F. graminearum*. Nesse estudo foi demonstrado que a deleção do gene *NPS6*, não afetou a reprodução sexual, mas causou aumento da sensibilidade à falta de ferro e estresse oxidativo, levando à redução da virulência. Foi proposto que o papel dos sideróforos extracelulares na virulência fúngica que é de fornecer o nutriente essencial ferro e não de atuar como fitotoxinas, privando o hospedeiro de ferro.

Ainda investigamos o potencial do gene Top1 como alvo para HIGS de *F. graminearum*. As enzimas topoisomerases relaxam o DNA superenrolado, permitindo que muitos processos celulares básicos ocorram, tais como a transcrição, replicação e recombinação do DNA (WANG, 2002). Mutantes de deleção do gene topoisomerase I (Top1) em *F. graminearum* e *F. culmorum* exibiram uma grande redução na virulência em espigas de trigo (BALDWIN et al., 2010). Além disso, a esporulação assexuada foi reduzida em mutantes de *F. graminearum* e ausentes em *F. culmorum*. O mutante *top1* de *F. graminearum* não desenvolveu esporos sexuais *in vitro*. Por fim, ambos os mutantes foram capazes de produzir DON *in vitro*. Segundo Baldwin et al. (2010), o crescimento invasivo reduzido observado nos mutantes *top1* em espigas de trigo podem refletir uma

falha de adaptação as diferentes respostas do hospedeiro. Esses defeitos de virulência parecem permitir que o hospedeiro induza defesas para restringir o crescimento do invasor. O estudo detalhado do crescimento do mutante *top1* na espiguetta inoculada revelou que as células da pálea em torno das primeiras hifas havia acumulado polímeros de lignina na parede celular. Sugerindo que o patógeno teria que lidar com defesas ativas do hospedeiro. Em contraste, durante em crescimento *in vitro*, as taxas de crescimento radial não foram afetadas pois o fungo não encontrou as defesas do hospedeiro. No presente trabalho, o fungo foi capaz de se desenvolver de forma igual ou mais severo em relação ao controle Ler inoculado, mostrando elevada severidade (média de 72,9%) no evento Top1.4.

Os resultados obtidos no ensaio de inoculação das plantas transgênicas contendo as construções gênicas RNAi (Hog1, Lae1, Snf1, Sid1 e Top1) demonstraram que a severidade dessas plantas não foi menor em relação ao genótipo silvestre (ecótipo Ler) e em relação ao controle DsRed (vetor vazio). Uma das possibilidades da ausência de diferença estatística na severidade é o fato de a maioria das plantas serem hemizigotas. A inoculação em linhagens homozigotas pode modificar o cenário devido ao maior nível e homogeneidade de expressão dessas construções, diminuindo a variação entre repetições.

No entanto, quando observada a zigozidade, a severidade foi menor em plantas homozigotas em relação às hemizigotas apenas nas plantas dos eventos Lae1.4 e Lae1.10 (Tabela 21), mostrando que a resistência não foi aumentada dentro dos eventos estudados, embora poucas plantas homozigotas tenham sido avaliadas. Mesmo que fossem observadas diminuições em fatores relacionados com a virulência, níveis elevados de resistência são desejados para justificar a utilização em espécies de interesse agrônômico como o trigo.

A avaliação de poucos (um a quatro) eventos transgênicos podem ser insuficientes para inferir sobre o potencial uso das sequências nesse trabalho, sobretudo por não terem sido realizadas até o momento análises da expressão gênica, uma vez que a não produção de siRNAs possa justificar os resultados obtidos. Por outro lado, a detecção de siRNA atrelados a níveis de expressão reduzidos dos genes alvos em *F. graminearum*

correlacionados à elevada severidade levariam a conclusões desfavoráveis quanto ao uso destes alvos para HIGS. A variabilidade na expressão do transgene pode dificultar a avaliação de eventos transgênicos e geralmente requer a geração e a análise de centenas ou, em ambientes industriais, milhares de plantas transgênicas para identificar poucas linhas com expressão transgênica estável e de alto nível (GELVIN, 2017). Faz-se necessário em experimentos futuros analisar a expressão gênica dos genes *Fgl1*, *Hog1*, *Lae1*, *Sid1*, *Snf1* e *Top1* de *F. graminearum* quando expostos ao hospedeiro transgênico. Um maior número de eventos deve ser testado, avaliando a infecção em folhas destacadas, bem como em inflorescências inoculadas com suspensão de esporos.

Inúmeros são os candidatos a alvo de HIGS que estão disponíveis atualmente, por exemplo, uma série de candidatos a proteínas efetoras secretadas por *F. graminearum* foram identificadas via análise de transcriptoma e proteoma, (BROWN; ANTONIW; HAMMOND-KOSACK, 2012; RAUWANE et al., 2020). São necessários esforços coordenados em rede de pesquisa para realizar estudos funcionais em grande escala com estes genes alvo candidatos, almejando o desenvolvimento de uma tecnologia capaz de conferir resistência a *F. graminearum*.

Por fim, as abordagens de RNAi têm convencionalmente se baseado no uso de plantas transgênicas que expressam dsRNA contra alvos selecionados (DALAKOURAS et al., 2020). Esses métodos baseados na interferência por RNA têm se mostrado uma estratégia eficaz para proteger as plantas contra doenças causadas por patógenos (TINOCO et al., 2010; KOCH et al., 2013; GHAG; SHEKHAWAT; GANAPATHI, 2014; CHENG et al., 2015; HU et al., 2015; ANDRADE et al., 2016; CHEN et al., 2016). Recentemente, o silenciamento gênico induzido por spray (do inglês, spray-induced gene silencing – SIGS) que consiste na aplicação de dsRNA sobre a planta, tendo como alvo genes do patógeno, vem sendo explorada. Essa inovadora estratégia, tem sido usada com sucesso em monocotiledôneas e dicotiledôneas, contra infecção de fungos e pragas (KOCH et al., 2016; HÖFLE et al., 2019; QI et al., 2019) o que faz de SIGS uma alternativa interessante visando o controle de *F. graminearum*, além de potencialmente poder auxiliar o uso de HIGS no estudo preliminar de genes alvo.

4.6 Conclusão

Foi possível obter plantas geneticamente modificadas de arabis contendo as construções gênicas RNAi-Hog1, -Lae1, -Snf1, -Sid1, -Top1, -Fgl1 e -DsRed (vetor vazio), com eventos segregando para uma, duas ou mais inserções dos transgenes.

As folhas destacadas de plantas de arabis transgênicas na geração T1, homocigotas e hemizigotas, contendo as construções gênicas RNAi-Lae1, Hog1, Snf1, Sid1, Top1, quando expostas à *F. graminearum*, não apresentaram resistência ao patógeno. As plantas transgênicas avaliadas quanto a resposta ao patógeno apresentaram severidade igual ou até maior em relação aos controles sem os transgenes.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A giberela é um fator limitante para produção de trigo em função dos efeitos causados no rendimento e qualidade dos grãos, além de causar contaminação por micotoxinas. Em vista das estratégias atualmente adotadas não serem efetivas para controlar *F. graminearum*, novas estratégias como a tecnologia de silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro (*Host Induced Gene Silencing*, HIGS), podem auxiliar a contornar essa situação. HIGS é baseada em RNA de interferência (RNAi) e, no caso de plantas, visa ao silenciamento de genes importantes para o crescimento, desenvolvimento ou patogenicidade dos patógenos. Entre outros fatores, a aplicação desta estratégia requer a identificação de genes-alvo dentro de uma ampla gama de candidatos. Como a eficiência da produção de plantas transgênicas de trigo é baixa e o custo é alto, a espécie modelo *Arabidopsis thaliana* pode ser utilizada para indicar as construções gênicas mais promissoras a serem testadas em trigo e demais espécies de importância agrônômica.

Em um primeiro momento foram avaliados em *A. thaliana* o potencial de construções gênicas múltiplas de RNAi para HIGS em *F. graminearum*, sendo uma tendo simultaneamente como alvo três regiões do gene *Chs3b*, e outra tendo como alvos em uma mesma construção os genes *Cyp51A*, *Cyp51B*, *Cyp51C*, *Tri5* e *Tri6*. Construções similares foram utilizadas para produzir trigo transgênico. As linhagens transgênicas de arábidoopsis com estas construções não foram efetivas no controle do patógeno causador da giberela. Porém, a construção RNAi-Cyp51-Tri foi capaz de reduzir os níveis de DON nas inflorescências de duas linhas de arábidoopsis. As linhagens de arábidoopsis contendo a construção gênica *Synchit2* também não foi efetiva para o controle de *F. graminearum*.

As linhagens transgênicas de trigo BRS Guamirim contendo as construções gênicas RNAi-Chs3b e RNAi-Cyp51-Tri não apresentaram reduções significativas quanto aos sintomas da giberela. A análise de expressão gênica dos genes de *F.*

graminearum *Chs3b*, *Cyp51A*, *Cyp51B* e *Tri5* comprovou que HIGS em trigo não foi efetivo nesse trabalho.

Em um segundo momento foram geradas plantas transgênicas de *arabidopsis* contendo construções gênicas tendo como alvo os genes *Hog1*, *Lae1*, *Snf1*, *Sid1*, *Top1*, e *Fgl1* de *F. graminearum*. Os resultados observados quanto a resistência ao fungo via HIGS ainda não foram promissores. No entanto, deve-se ressaltar a necessidade de estudos adicionais, principalmente analisando outros isolados do fungo e maior número de eventos, os quais já foram produzidos neste trabalho, para inferir sobre a viabilidade do uso desses alvos para HIGS.

Sementes de plantas homozigotas T2 (não segregantes para DsRed) de eventos contendo as construções gênicas RNAi-*Hog1*, -*Lae1*, -*Snf1* -*Sid1*, -*Top1*, -*Fgl1* e DsRed (vetor vazio), provenientes de plantas T1 avaliadas em experimento de inoculação, foram selecionadas a partir da análise de pólen de plantas individuais em microscópio de epifluorescência. Estudos mais aprofundados com plantas homozigotas e a análise de expressão gênica dos genes *Hog1*, *Lae1*, *Snf1*, *Sid1*, *Top1*, *Fgl1* em *F. graminearum* poderão fornecer resultados mais esclarecedores em relação ao real potencial de controle de *F. graminearum*, e a viabilidade da utilização desses genes como alvo de HIGS. Os eventos contendo a construção gênica RNAi-*Fgl1* (*Fgl1.7*, *Fgl1.9*, *Fgl1.10*), podem ser avaliados futuramente quanto a resposta à *F. graminearum*.

Os resultados aqui apresentados fazem parte do projeto colaborativo Embrapa – BBSRC “Uso de previsão do risco de doença, tecnologias NGS e HIGS para explorar e controlar a giberela em lavouras de trigo”. As atividades desenvolvidas nesse trabalho são referentes ao plano de trabalho três, relacionado com a avaliação de sequências gênicas para HIGS de *F. graminearum*, em *arabidopsis* e trigo. No decorrer do projeto, *F. graminearum* isolado CML3066 teve seu genoma completo sequenciado (MACHADO et al., 2020), facilitando os estudos que envolvem HIGS / SIGS e, conseqüentemente mais alvos poderão ser testados visando obter resistência ao patógeno causador da giberela.

6 CONCLUSÃO GERAL

As construções gênicas múltiplas de RNAi tendo como alvos os genes *Chs3b*, *Cyp51A*, *Cyp51B*, *Cyp51C*, *Tri5* e *Tri6* para silenciamento através HIGS, inseridas em linhagens transgênicas em arábido e trigo não foram efetivas no controle do patógeno causador da giberela. Redução nos níveis de DON foi observado em linhagens transgênicas de arábido e trigo contendo a construção RNAi-Cyp51-Tri. A expressão dos genes *Chs3b*, *Cyp51A*, *Cyp51B* e *Tri5* não foi reduzida em *F. graminearum* inoculadas nas linhagens transgênicas de trigo.

As construções gênicas simples de RNAi tendo como alvos os genes *Hog1*, *Lae1*, *Snf1*, *Sid1* e *Top1* para silenciamento através HIGS, inseridas em linhagens transgênicas em arábido não foram efetivas no controle de *F. graminearum*, assim como construção gênica RNAi-Synchit2, contendo fragmento de gene que codifica quitina sintase de *F. verticillioides*.

Estudos adicionais utilizando maior número de eventos são necessários para concluir a viabilidade do uso destas construções gênicas para HIGS visando à resistência a *F. graminearum*. Além disso, é necessário que se faça análise de expressão gênica nas plantas transgênicas e no patógeno.

REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. B. **Introductory Mycology**. 4 ed. New York: John Wiley, 1996.

ANDRADE, C. M.; TINOCO, M. L. P.; RIETH, A. F.; MAIA, F. C. O.; ARAGÃO, F. J. L. Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, v. 65, n. 4, p. 626–632, 2016.

ARIAS, R. S.; DANG, P. M.; SOBOLEV, V. S. RNAi-mediated control of aflatoxins in peanut: method to analyze mycotoxin production and transgene expression in the peanut/*Aspergillus* pathosystem. **Journal of Visualized Experiments**, v. 106, p. 1-11, 2015.

ASTOLFI, P.; REYNOSO, M. M.; RAMIREZ, M. L.; CHULZE, S. N.; ALVES, T. C. A.; TESSMANN, D. J.; DEL PONTE, E. M. Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. **Plant Pathology**, v. 61, p. 289-295, 2012.

AUDENAERT, K.; VANHEULE, A.; HÖFTE, M.; HAESAERT, G. Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment. **Toxins**, v. 6, n. 1, p. 1-19, 2013.

AYUMI, K.; MANICKAVELU, A. Molecular pathogenetic study of *Fusarium* head blight in highly resistant, resistant and susceptible common wheat (*Triticum aestivum* L.). **Advances in Plants & Agriculture Research**, v. 2, p. 131-136, 2015.

BAI, G. H.; SHANER, G. Management and resistance in wheat and barley to fusarium head blight. **Annual Reviews Phytopathology**, v. 42, p. 135-161, 2004.

BAI, G.; SHANER, G. Scab of wheat: prospects for control. **Plant Disease**, v. 78, p. 760-766, 1994.

BAI, G.; SU, Z.; CAI, J. Wheat resistance to *Fusarium* head blight. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.40, p. 336-246, 2018.

BALDWIN, T. K.; URBAN, M.; BROWN, N.; HAMMOND-KOSACK, K. A role for Topoisomerase I in *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* pathogenesis and sporulation, **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.23, p.566-577, 2010.

BAYRAM, O.; BRAUS, G. H. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36 n. 1, p. 1-24, 2012.

BAYRAM, O.; KRAPPMANN, S.; NI, M.; BOK, J. W.; HELMSTAEDT, K.; VALERIUS, O.; BRAUS-STROMEYER, S.; KWON, N. J.; KELLER, N. P.; YU, J. H.; BRAUS, G. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. **Science**, v. 320, p.1504-1506, 2008.

BIGEARD J, HIRT H. Nuclear signaling of plant MAPKs. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 469 p. 1-18, 2018.

BLÜMKE, A.; FALTER, C.; HERRFURTH, C.; SODE, B.; BODE, R.; SCHÄFER, W.; FEUSSNER, I.; VOIGT, C. A. Secreted fungal effector lipase releases free fatty acids to inhibit innate immunity-related callose formation during wheat head infection. **Plant Physiology**, v.165, p.346-358, 2014.

BOENISCH, M. J.; SCHÄFER, W. *Fusarium graminearum* forms mycotoxin producing infection structures on wheat. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 110, p. 1-13, 2011.

BOLOGNESI, R.; RAMASESHADRI, P.; ANDERSON, J.; BACHMAN, P.; CLINTON, W.; FLANNAGAN, R.; ILAGAN, O.; LAWRENCE, C.; LEVINE, S.; MOAR, W.; MUELLER, G.; TAN, J.; UFFMAN, J.; WIGGINS, E.; HECK, G.; SEGERS, G. Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). **Plos One**, v. 7, n. 10, p. 1-11, 2012.

BORGES, F.; MARTIENSSEN, R. A. The expanding world of small RNAs in plants. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, p.727-741, 2015.

BOTTALICO, A.; PERRONE, G. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. **Journal of Plant Pathology**, v. 108, n.7, p. 611-624, 2002.

BOYES, D. C.; ZAYED, A. M.; ASCENZI, R.; MCCASKILL, A. J.; HOFFMAN, N. E.; DAVIS, K. R.; GÖRLACH, J. Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis:

a model for high throughput functional genomics in plants. **Plant Cell**, v. 13, p.1499-1510, 2001.

BROWN, N. A.; ANTONIW, J.; HAMMOND-KOSACK, K. E. The predicted secretome of the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*: A refined comparative analysis. **Plos One**, v.7, n.4, p.1-4, 2012.

BROWN, N. A.; BASS, C.; BALDWIN, T. K.; CHEN, H.; MASSOT, F.; CARION, P. W.; URBAN, M.; VAN DE MEENE, A. M.; HAMMOND-KOSACK, K. E. Characterisation of the *Fusarium graminearum*-Wheat floral interaction. **Journal of Pathogens**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

BUSHNELL, W. R.; HAZEN, B. E.; PRITSCH, C. Histology and physiology of Fusarium head blight. In: Leonard KJ, Bushnell WR, eds. Fusarium head blight of wheat and barley. St Paul, MN, USA: **APS Press**, p. 44–83, 2003.

BUTCHKO, R. A.; BROWN, D. W.; BUSMAN, M.; TUDZYNSKI, B.; WIEMANN, P. Lae1 regulates expression of multiple secondary metabolite gene clusters in *Fusarium verticillioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v.49, p.602-612, 2012.

CAI, Q.; QIAO, L.; WANG, M.; HE, B.; LIN, F. M.; PALMQUIST, J.; HUANG, S. D.; JIN, H. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. **Science**, v. 8, n. 360, p.1126-1129, 2018.

CARDOZA, R.; MALMIERCA, M.; HERMOSA, M.; ALEXANDER, N.; MCCORMICK, S.; PROCTOR, R.; TIJERINO, A.; RUMBERO, A.; MONTE, E.; GUTIÉRREZ, S. Identification of loci and functional characterization of trichothecene biosynthetic genes in the filamentous fungus *Trichoderma*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p.4867-4877, 2011.

CHEN, D. H.; RONALD, P. C. A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 17, p. 53-57, 1999.

CHEN, W.; KASTNER, C.; NOWARA, D.; OLIVEIRA-GARCIA, E.; RUTTEN, T.; ZHAO, Y.; DEISING, H. B.; KUMLEHN, J.; SCHWEIZER, P. Host-induced silencing of *Fusarium culmorum* genes protects wheat from infection. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 17, p. 4979-4991, 2016.

CHEN, X.; STEED, A.; HARDEN, C.; NICHOLSON, P. Characterization of *Arabidopsis thaliana*-*Fusarium graminearum* interactions and identification of variation in resistance among ecotypes. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 5, p. 391-403, 2006.

CHENG, W. SONG, X. S.; LI, H. P.; CAO, L. H.; SUN, K.; QIU, X. L.; XU, Y. B.; YANG, P.; HUANG, T.; ZHANG, J. B.; QU, B.; LIAO, Y.C. Host-induced gene silencing of an essential chitin synthase gene confers durable resistance to *Fusarium* head blight and seedling blight in wheat. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 9, p. 1335-1345, 2015.

CHUNTAO, Y.; HULBERT, S. Host induced gene silencing (HIGS), a promising strategy for developing disease resistant crops. **Gene Technology**, v. 4, p. 1-2, 2015.

CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 16, n. 6, p. 735-743, 1998.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Séries históricas: Séries Históricas de Área Plantada, Produtividade e Produção. 2021. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2>>. Acesso em: 15 fev. 2021.

DALAKOURAS, A.; WASSENEGGER, M.; DADAMI, E.; GANOPOULOS, I.; PAPPAS, M. L.; PAPADOPOULOU, K. Genetically modified organism-free RNA interference: exogenous application of RNA molecules in plants, **Plant Physiology**, v. 182, p. 38-50, 2020.

DARWISH, W.S.; IKENAKA, Y.; NAKAYAMA, S. M. M.; ISHIZUKA, M. An overview on mycotoxin contamination of foods in Africa. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.76, p.789-797, 2014.

DEL PONTE, E. M.; FERNANDES, J. M. C.; PIEROBOM, C. R.; BERGSTROM, G. C. Giberela do trigo: aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, p.587-605, 2004.

DEL PONTE, E. M.; SPOLTI, P.; WARD, T. J.; GOMES, L. B.; NICOLLI, C. P.; KUHNEM, P. R.; SILVA, C. N.; TESSMANN, D. J. Regional and field-specific factors affect the composition of fusarium head blight pathogens in subtropical no-till wheat agroecosystem of Brazil. **Phytopathology**, v. 105, n. 2, p.246-254, 2015.

DESFEUX, C.; CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. **Plant Physiology**, v. 123, n. 3, p. 895-904, 2000.

DESJARDINS, A. E. *Fusarium* mycotoxins-chemistry, genetics, and biology. **The American Phytopathological Society Press**, 2006.

DESJARDINS, A. E.; HOHN, T. M.; MCCORMICK, S. P. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: Chemistry, genetics, and significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 157, p. 595-604, 1993.

DING, Y.; MEI, J.; CHAI, Y.; YU, Y.; SHAO, C.; WU, Q.; DISI, J. O.; LI, Y.; WAN, H.; QIAN, W. Simultaneous transcriptome analysis of host and pathogen highlights the interaction between *Brassica oleracea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, v. 109, p.542-550, 2019.

DUFFECK, M. R.; TIBOLA, C. S.; GUARIENTI, E. M.; DEL PONTE, E. M. Survey of mycotoxins in Southern Brazilian wheat and evaluation of immunoassay methods. *Scientia Agricola*, v. 74, p. 343-348, 2017.

DWEBBA, C. C.; FIGLAN, S.; SHIMELIS, H. A.; MOTAUNG, T. E.; SYDENHAM, S.; MWADZINGENI, L.; TSILO, T. J. Fusarium head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. *Crop Protection*, v. 91, p. 114-122, 2017.

FAN, J.; URBAN, M.; PARKER, J.E.; BREWER, H. C.; KELLY, S. L.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; FRAAIJE, B. A.; LIU, X.; COOLS, H. J. Characterization of the sterol 14 α -demethylases of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific CYP51 function. *New Phytologist*, v. 198, n. 3 p. 821-835, 2013.

FOROUD, N.; EUDES, F. Trichothecenes in Cereal Grains. *International Journal Molecular Science*, v. 10, p. 147-173, 2009.

GELVIN, S. B. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the plant genome. *Annual Review of Genetics*, v. 51, p. 195-217, 2017.

GHAG, S.B.; SHEKHAWAT, U. K. S.; GANAPATHI, T. R. Host-induced post-transcriptional 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.

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, p. 875-883, 2015.

GREENSHIELDS, D. L.; LIU, G.; FENG, J.; SELVARAJ, G.; WEI, Y. The siderophore biosynthetic gene *SIDI1*, but not the ferroxidase gene *FET3*, is required for full *Fusarium graminearum* virulence. *Molecular Plant Pathology*, v.8, n.4, p.411-421, 2007.

GUO, J; ZHANG, X. L.; HOU, Y. L.; CAI, J. J.; SHEN, X. R.; ZHOU. High-density mapping of the major FHB resistance gene *Fhb7* derived from *Thinopyrum ponticum* and

its pyramiding with Fhb1 by marker-assisted selection. **Theoretical Apply Genetics**, v. 28, p.2301-2316, 2015.

GUPTA, P. K.; MIR, R. R.; MOHAN, A.; KUMAR, J. Wheat genomics: present status and future prospects. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2008, p. 1-36, 2008.

HE, F.; ZHANG, R.; ZHAO, J.; QI, T.; KANG, Z.; GUO, J. Host-induced silencing of *Fusarium graminearum* genes enhances the resistance of *Brachypodium distachyon* to fusarium head blight. **Frontiers in Plant Science**, v.10, p.1-12, 2019.

HÖFLE, L.; BIEDENKOPF, D.; WERNER, B. T.; SHRESTHA, A.; JELONEK, L.; KOCH, A. Study on the efficiency of dsRNAs with increasing length in RNA-based silencing of the *Fusarium* CYP51 genes. **RNA Biology**, v. 17, p. 463-473, 2019.

HOU, Z.; XUE, C.; PENG, Y.; KATAN, T.; KISTLER, H. C.; XU, J. R. A mitogen-activated protein kinase gene (MGV1) in *Fusarium graminearum* is required for female fertility, heterokaryon formation, and plant infection. **Molecular Plant Microbe-Interactions**, v.15, p.1119-1127, 2002.

HU, Z.; PAREKH, U.; MARUTA, N.; TRUSOV, Y.; BOTELLA, J. R. Down-regulation of *Fusarium oxysporum* endogenous genes by Host-Delivered RNA interference enhances disease resistance. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, p. 1-10, 2015.

JAIN, S.; KELLER, N. Insights to fungal biology through LaeA sleuthing. **Fungal Biology Reviews**, v.27, p.51-59, 2013.

JANSEN, C.; VON WETTSTEIN, D.; SCHÄFER, W.; KOGEL, K. H.; FELK, A. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. **Proceedings National Academy Sciences of USA**, v. 102, p. 16892-16897, 2005.

JENCZMIONKA, N.J.; SCHÄFER, W. The Gpmk1 MAP kinase of *Fusarium graminearum* regulates the induction of specific secreted enzymes. **Current Genetics**, v. 47, p. 29-36, 2005.

JENCZMIONKA, N. J.; MAIER, F. J.; LOSCH, A. P.; SCHAFFER, W. Mating, conidiation and pathogenicity of *Fusarium graminearum*, the main causal agent of the head-blight disease of wheat, are regulated by the MAP kinase gpmk1. **Current Genetics**, v. 43, p. 87- 95, 2003.

JOCHL, C.; LOH, E.; PLONER, A.; HAAS, H.; HUTTENHOFER, A. Development-dependent scavenging of nucleic acids in the filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **RNA Biology**, v. 6, p. 179-186, 2009.

KALLEDA, N.; NAOREM, A.; MANCHIKATLA, R. V. Targeting fungal genes by diced siRNAs: a rapid tool to decipher gene function in *Aspergillus nidulans*. **Plos One**, v. 8, n. 10, p. 1-13, 2013.

KETTING RF. The many faces of RNAi. **Developmental Cell**, v. 20, n. 2, p. 148-161, 2011.

KHATRI, M.; RAJAM, M. V. Targeting polyamines of *Aspergillus nidulans* by siRNA specific to fungal ornithine decarboxylase gene. **Medical Mycology**, v. 45, p. 211-220, 2007.

KIM, D.; HAGER, M. Optimize highly efficient genetic transformation method of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars using mature embryo. **Bio-Protocol**, v. 101, p. 1-9, 2020.

KIM, H. K.; LEE, S.; JO, S. M.; MCCORMICK, S. P.; BUTCHKO, R. A.; PROCTOR, R. H.; YUN, S. H. Functional roles of *FgLaeA* in controlling secondary metabolism, sexual development, and virulence in *Fusarium graminearum*. **Plos One**, v.8, n.7, p.1-15, 2013.

KNIP, M.; CONSTANTIN, M. E.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. Trans-kingdom Cross-Talk: Small RNAs on the Move. **Plos Genetics**, v. 10, n. 9, p. 1-7, 2014.

KOCH, A.; BIEDENKOPF, D.; FURCH, A.; WEBER, L.; ROSSBACH, O.; ABDELLATEF, E.; LINICUS, L.; JOHANNSMEIERS, J.; JELONEK, L.; GOESMANN, A. 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, p. 1-22, 2016

KOCH, A.; HÖFLE, L.; WERNER, B. T.; IMANI, J.; SCHMIDT, A.; JELONEK, L.; KOGEL, K. H. SIGS vs HIGS: a study on the efficacy of two dsRNA delivery strategies to silence *Fusarium FgCYP51* genes in infected host and non-host plants. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, p. 1636-1644, 2019. 2019.

KOCH, A.; KUMAR, N.; WEBER, L.; KELLER, H.; IMANI, J.; KOGEL, K. H. Host induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 -demethylase encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 48, p. 19324-19329, 2013.

KOVALCHUK, N.; JIA, W.; EINI, O.; MORRAN, S.; PYVOVARENKO, T.; FLETCHER, S.; BAZANOVA, N.; HARRIS, J.; BECK-OLDACH, K.; SHAVRUKOV, Y.; LANGRIDGE, P.; LOPATO, S. Optimization of TaDREB3 gene expression in transgenic barley using cold-inducible promoters. **Plant Biotechnology Journal**, v. 11, n. 6, p.659-670, 2013.

KUHNEM, P.; ROSA, A. C.; WAGNER, F.; ROSA, A, T, S. **Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de trigo e Triticale**. 1. ed. Passo Fundo: Biotrigo Genética, 2020.

LANGEVIN, F.; EUDES, F.; COMEAU, A. Effect of trichothecenes produced by *Fusarium graminearum* during Fusarium Head Blight development in six cereal species. **European Journal Plant Pathology**, v. 110, p. 735-746, 2004.

LEE, S. H.; LEE, J.; LEE, S.; PARK, E. H.; KIM, K. W.; KIM, M. D.; YUN, S. H. GzSNF1 is required for normal sexual and asexual development in the ascomycete *Gibberella zeae*. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 1, p. 116-127, 2009.

LENARDON, M. D.; MUNRO, C. A.; GOW, N. A. R. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 416-423, 2010.

LIMA, M. I. P. M Protocolo usado na Embrapa Trigo para caracterizar o Tipo I e Tipo II de resistência genética à giberela em trigo. Passo Fundo: **Embrapa Trigo**, 2014. 5p. (Embrapa Trigo. Comunicado Técnico, 345).

LIMA, M. I. P. M. Giberela e brusone em cereais de inverno. In: SANTOS, H. P.; FONTANELI, R. S.; SPERA, S. T. (Ed.). **Sistema de produção para cereais de inverno sob plantio direto no Sul do Brasil**. Embrapa trigo, Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2010. p. 207-224.

LIMA, M. I. P. M. Giberela ou brusone? Orientações para a identificação correta dessas enfermidades em trigo e em cevada. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2004. 56 p. (Embrapa Trigo. Documentos online, 40). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do40.htm>. Acesso: 15 de abril de 2021.

LIU, Q.; FENG, Y.; ZHU, Z. Dicer-like (DCL) proteins in plants. **Functional e Integrative Genomics**, v. 9, p. 277-286, 2009a.

LIU, S. Y.; HALL, M. D.; GRIFFEY, C. A.; MCKENNDRY, A. Meta-analysis of QTL associated with Fusarium head blight resistance in wheat. **Crop Science**, v. 49, p. 1955-1968, 2009b.

LIU, Z.; ZHANG, X.; LIU, X.; FU, C.; HAN, X.; YIN, Y.; MA, Z. The chitin synthase *FgChs2* and other *FgChss* co-regulate vegetative development and virulence in *F. graminearum*. **Scientific reports**, v.6, p. 1-12, 2016.

LU, C. B.; CHENG, S. H.; WU, R. L.; HU, Y. H.; FAN, J. P.; WANG, C. S. Breeding the lines with resistance to Fusarium head blight of wheat cultivar Yangmai 13 by molecular marker-assisted selection. **J. Triticeae Crops**, v.30, p.1058-1064, 2010.

LV, C.; SONG, Y. X.; GAO, L. F.; YAO, Q.; ZHOU, R. H.; XU, R. G.; JIA, J. Integration of QTL detection and marker assisted selection for improving resistance to Fusarium head blight and important agronomic traits in wheat. **The Crop Journal**. v. 2, p. 70-78, 2014.

MACHADO, A. K.; BROWN, N. A.; URBAN, M.; KANYUKA, K.; HAMMOND-KOSACK, K. E. RNAi as an emerging approach to control Fusarium head blight disease and mycotoxin contamination in cereals. **Pest Management Science**, v. 74, p. 790-799, 2017a.

MACHADO, F. J.; NICOLLI, C. P.; MÖLLER, P. A.; ARRUDA, R.; WARD, T. J.; DEL PONTE E, M. Differential triazole sensitivity among members of the *Fusarium graminearum* species complex infecting barley grains in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, p. 197-202, 2017b.

MACHADO, F. J.; SANTANA, F. M.; LAU, D. DEL PONTE, E. M. Quantitative review of the effects of triazole and benzimidazole fungicides on Fusarium head blight and wheat yield in Brazil. **Plant Disease**, p. 1-38, 2017c.

MACHADO WOOD, A. K.; KING, R.; URBAN, M.; NICOLLI, C. P.; DEL PONTE, E. M.; HAMMOND-KOSACK, K. E. Genome sequence of *Fusarium graminearum* strain CML3066, isolated from a wheat spike in southern Brazil. **Microbiology Resource Announcements**, v. 9, n. 19, p. 1-3, 2020.

MAJUMDAR, R.; RAJASEKARAN, K.; CARY, J. W. RNA Interference (RNAi) as a potential tool for control of mycotoxin contamination in crop plants: concepts and considerations. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 200, p. 1-14, 2017.

MAMTA, B.; RAJAM, M. V. RNAi technology: a new platform for crop pest control. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 3, p. 487-501, 2017.

MARTÍNEZ-SOTO, D.; RUIZ-HERRERA, J. Functional analysis of the MAPK pathways in fungi. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 4, p. 192-202, 2017.

MASANGA, J. O.; MATHEKA, J. M.; OMER, R. A.; OMMEH, S. C.; MONDA, E. O.; ALAKONYA, A. E. Downregulation of transcription factor aflR in *Aspergillus flavus* confers reduction to aflatoxin accumulation in transgenic maize with alteration of host plant architecture. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 8, p. 1379-1387, 2015.

MCCORMICK, S.P. The role of DON in pathogenicity. In: LEONARD, K.J.; BUSHNELL, W.R. (Eds). Fusarium Head Blight of Wheat and Barley. **The American Phytopathological Society**: Minnesota, v 7, p. 165-183, 2003.

MCMULLEN, M.; BERGSTROM, G.; WOLF, E.; DILLMACKY, R.; HERSHMAN, D.; SHANER, G.; SANFORD, D. A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: Fusarium head blight. **Plant Disease**, v. 96, p. 1712-1728, 2012.

MERHEJ, J.; RICHARD-FORGET, F.; BARREAU, C. Regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium*: recent advances and new insights. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p.519-528, 2011.

MILLER, J.; ARNISON, P. Degradation of deoxynivalenol by suspension culture of the Fusarium head blight resistant wheat cultivar Frontana. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 8, p. 147-150, 1986.

MOROZOV, S. Y.; SOLOVYEV, A. G.; KALININA, N. O; TALIANSKY, M. E. Double-stranded rnas in plant protection against pathogenic organisms and viruses in agriculture. **Acta Naturae**, v. 11, n. 4, p. 13-21, 2019.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NALAM, V. J.; ALAM, S.; KEEREETAWEEP, J.; VANABLES, B.; BURDAN, D.; LEE, H.; TRICK, H. N.; SAROWAR, S.; MAKANDAR, R.; SHAH, J. Facilitation of *Fusarium graminearum* Infection by 9-Lipoxygenases in Arabidopsis and Wheat. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 10, p. 1142-1152, 2015.

NALAM, V. J.; SAROWAR, S.; SHAH, J. Establishment of a *Fusarium graminearum* infection model in *Arabidopsis thaliana* leaves and floral tissues. **Bio-protocol**, v. 6, n. 14, p. 1-14, 2016.

NGUYEN, T. V.; SCHAEFER, W.; BORMANN, J. The stress-activated protein kinase FgOS-2 is a key regulator in the life cycle of the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.25, p.1142-1156, 2012.

NIBLETT, C. L.; BAILEY, A. M. Potential applications of gene silencing or RNA interference (RNAi) to control disease and insect pests of date palm. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 24, p. 462-469, 2012.

NIEHAUS, E. M.; RINDERMANN, L.; JANEVSKA, S.; MÜNSTERKÖTTER, M.; GÜLDENER, U.; TUDZYNSKI, B. Analysis of the global regulator Lae1 uncovers a connection between Lae1 and the histone acetyltransferase HAT1 in *Fusarium fujikuroi*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.102, n. 1, p. 279-295, 2018.

NOWARA, D.; GAY, A.; LACOMME, C.; SHAW, J.; RIDOUT, C.; DOUCHKOV, D.; HENSEL, G.; KUMLEHN, J.; SHWEIZER, 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.

OIDE, S.; LIU, J.; YUN, S.; WU, D.; MICHEV, A.; CHOI, M. Y.; HORWITZ, B. A. TURGEON, G. Histidine kinase two-component response regulator proteins regulate reproductive development, virulence, and stress responses of the fungal cereal pathogens *Cochliobolus heterostrophus* and *Gibberella zeae*. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 12, p. 1867-1880, 2010.

OIDE, S.; MOEDER, W.; KRASNOFF, S.; GIBSON, D.; HAAS, H.; YOSHIOKA, K.; TURGEON, B. G. NPS6, encoding a nonribosomal peptide synthetase involved in siderophore-mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes. **Plant Cell**, v. 10, p. 2836-2853, 2006.

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, p. 595-608, 2013.

PAREEK, M.; RAJAM, M. V. RNAi-mediated silencing of MAP kinase signalling genes (*Fmk1*, *Hog1*, and *Pbs2*) in *Fusarium oxysporum* reduces pathogenesis on tomato plants. **Fungal Biology**, v.121, p.775-784, 2017.

PARRY, D. W.; JENKINSON, P.; MCLEOD, L. Fusarium head blight (SCAB) in small grain cereals – a review. **Plant Pathology**, v. 44, p. 207-238, 1995.

POWER, T.; ORTONEDA, M.; MORRISSEY, J. P.; DOBSON, A. D. W. Differential expression of genes involved in iron metabolism in *Aspergillus fumigatus*. **International Microbiology**, v.9, p.281-287, 2006.

PROCTOR, R. H.; MCCORMICK, S. P.; KIM, H. S.; CARDOZA, R. E.; STANLEY, A. M.; LINDO, L.; KELLY, A.; BROWN, D. W.; LEE, T.; VAUGHAN, M. M. Evolution

of structural diversity of trichothecenes, a family of toxins produced by plant pathogenic and entomopathogenic fungi. **Plos Pathogens**, v. 14, p. 1-38, 2018.

QI, T.; GUO, J.; PENG, H.; LIU, P.; KANG, Z.; GUO, J. Host-induced gene silencing: a powerful strategy to control diseases of wheat and barley. **International Journal of Molecular Science**, v. 20, n. 206, p. 1-15, 2019.

RAMAMOORTHY, V.; ZHAO, X.; SNYDER, A.K.; XU, J. R.; SHAH, D. M. Two mitogen-activated protein kinase signalling cascades mediate basal resistance to antifungal plant defensins in *Fusarium graminearum*. **Cellular Microbiology**, v. 9, p. 1491-1506, 2007.

RAUWANE, M. E.; OGUGUA, U. V.; KALU, C. M.; LEDWABA, L. K.; WOLDESEMAYAT, A. A.; NTUSHELO, K. Pathogenicity and virulence factors of *Fusarium graminearum* including factors discovered using next generation sequencing technologies and proteomics. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 1-29, 2020.

RAWAT, N.; PUMPHREY, M. O.; LIU, S.; ZHANG, X.; TIWARI, V. K.; ANDO, K.; TRICK, H. N.; BOCKUS, W. W.; AKHUNOV, E.; ANDERSON, J. A.; GILL, B. S. Wheat *Fhb1* encodes a chimeric lectin with agglutinin domains and a poreforming toxin-like domain conferring resistance to *Fusarium* head blight. **Nature Genetics**, v. 48, n. 12, p. 1576-1580, 2016.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; **Doenças dos cereais de inverno: diagnose, epidemiologia e controle**. 2. Ed. Lages: Graphel, 2007.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; Doenças do Trigo. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. Volume 2: Doenças de Plantas Cultivadas. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 631-638.

SALOMON, S.; GACSER, A.; FRERICHMANN, S.; KROGER, C.; SCHAFER, W.; VOIGHT, C. A. The secreted lipase FGL1 is sufficient to restore the initial infection step to the asexual *Fusarium graminearum* MAP kinase disruption mutant Delta gpmk1. **European Journal of Plant Pathology**, v. 134, p.23-37, 2012.

SCHEUER, P. M.; FRANCISCO, A.; MIRANDA, M. Z.; OGLIARI, P. J.; TORRES, G.; LIMBERGER, V.; MONTENEGRO, F. M.; RUFFI, C. R.; BIONDI, S. Characterization of Brazilian wheat cultivars for specific technological applications. **Food Science and Technology**, v. 31, n. 3, p.816-826, 2011.

SCHROEDER, H.; CHRISTENSEN, J. Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. **Phytopathology**, v. 53, p. 831-838, 1963.

SEONG, K. Y.; PASQUALI, M.; ZHOU, X.; SONG, J.; HILBURN, K.; MCCORMICK, S.; DONG, Y.; XU, J. R.; KISTLER, H. C. Global gene regulation by *Fusarium* transcription factors Tri6 and Tri10 reveals adaptations for toxin biosynthesis. **Molecular Microbiology**, v. 72, p. 354-367, 2009.

SEONG, K. Y.; ZHAO, X.; XU, J. R.; GULDENER, U.; KISTLER, H. C. Conidial germination in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, p.389-399, 2008.

SHANMUGAPRIYA, G.; DAS, S. S.; VELUTHAMBI, K. Transgenic tobacco plants expressing siRNA targeted against the Mungbean yellow mosaic virus transcriptional activator protein gene efficiently block the viral DNA accumulation. **Virusdisease**, v. 26, n. 1, p. 55-61, 2015.

SIEBER, C. M.; LEE, W.; WONG, P.; MÜNSTERKÖTTER, M.; MEWES, H. W.; SCHMEITZL, C.; VARGA, E.; BERTHILLER, F.; ADAM, G.; GÜLDENER, U. The *Fusarium graminearum* genome reveals more secondary metabolite gene clusters and hints of horizontal gene transfer. *Plos One*, v. 9, n. 10, p. 1-22, 2014.

SMITH, N.A.; SINGH, S. P.; WANG, M. B.; STOUTJESDIJK, P. A.; GREEN, A. G.; WATERHOUSE, P. M. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. **Nature**, v. 407, n. 6802, p. 319-320, 2000.

SNUSTAD, P., SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética**. 7. ed. Campo Grande: Guanabara, 2017.

SPETH, E.B.; LEE, Y.N.; HE, S.Y. Pathogen virulence factors as molecular probes of basic plant cellular functions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, 580-586, 2007.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1980. 418p.

SUNITHA, S.; SHIVAPRASAD, P.V.; SUJATA, K.; VELUTHAMBI. High frequency of T-DNA deletions in transgenic plants transformed with intron-containing hairpin RNA genes. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 30, p. 158-167, 2012.

SUBRAMONI, S.; SUÁREZ-MORENO, Z. R.; VENTURI, V. Lipases as pathogenicity factors of plant pathogens. In: TIMMIS, K. N. (Ed.). **Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology**. 1. ed. Berlin: Springer, 2010. p. 3269-3277.

TEPFER, M.; CASSE-DELBART, F. *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. **Microbiological Science**, v. 4, p. 24-28, 1987.

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

TOKAI, T.; KOSHINO, H.; TAKAHASHI-ANDO, N.; SATO, M.; FUJIMUR, M.; KIMURA, M. Fusarium Tri4 encodes a key multifunctional cytochrome P450 monooxygenase for four consecutive oxygenation steps in Trichothecene biosynthesis. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 353, p. 412-417, 2007.

TRALAMAZZA, S.M.; BEMVENUTI, R.H.; ZORZETE, P.; GARCIA, F. S; CORRÊA, B. Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested wheat grains from Brazil. **Food Chemistry**, v. 196, p. 445-450, 2016.

URBAN, M.; DANIELS, S.; MOTT, E.; HAMMOND-KOSACK, K. Arabidopsis is susceptible to the cereal ear blight fungal pathogens *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. **The Plant Journal**, v. 32, n. 6, p. 961-973, 2002.

URBAN, M.; MOTT, E.; FARLEY, T.; HAMMOND-KOSACK, K. The *Fusarium graminearum* MAP1 gene is essential for pathogenicity and development of perithecia. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 347- 359, 2003.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Programs and Services, Agricultural Statistics, Production, Supply and Distribution Online 148 Database (PSD Online), circulars, grains. 2021. Disponível em <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>>. Acesso em 15 fev. 2021.

VAUCHERET, H; BÉCLIN, C.; FAGARD, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 17, p. 1-9, 2001.

VILLAFANA, R. T.; RAMDASS, A. C.; RAMPERSAD, S. N. Selection of *Fusarium* trichothecene toxin genes for molecular detection depends on TRI gene cluster organization and gene function. **Toxins**, v. 11, n. 36, p. 1-25, 2019.

VOIGT, C. A.; SCHAFFER, W.; SALOMON, S. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. **Plant Journal**, 42, 364-375, 2005.

WANG, C.; ZHANG, S.; HOU, R.; ZHAO, Z.; ZHENG, Q.; XU, Q.; ZHENG, D.; WANG, G.; LIU, H.; GAO, X.; MA, J-W.; KISTLER, H. C.; KANG, Z.; XU, J-R.

Functional Analysis of the Kinome of the Wheat Scab Fungus *Fusarium graminearum*. **Plos Pathogens**, v.7, p.1-21, 2011.

WANG, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: A molecular perspective. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.3, p.430-440, 2002.

WANJIRU, W. M.; ZHENSHENG, K.; BUCHENAUER, H. Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 803-810, 2002.

WEGULO, S. N. Factors influencing deoxynivalenol accumulation in small grain cereals. **Toxins**, v. 12, n. 11, p. 1157-1180, 2012.

WILCOXSON, R. D.; SKOVMAND, B.; ATIF, A. H. Evaluation of wheat cultivars for ability to retard development of stem rust. **Annals of Applied Biology**, Warwick v.80, p.275-281, 1975.

XU, Y. B.; LI, H. P.; ZHANG, J. B.; SONG, B.; CHEN, F. F.; DUAN, X. J.; XU, H. Q.; LIAO, Y. C. Disruption of the chitin synthase gene CHS1 from *Fusarium asiaticum* results in an altered structure of cell walls and reduced virulence. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, n. 3, p. 205–215, 2010.

YAZAR, S.; OMURTAG, G.Z. Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. **International Journal of Molecular Science**, v. 9, p. 2062-2090, 2008.

YIN, C.; HULBERT, S. Host induced gene silencing (HIGS), a promising strategy for developing disease resistant crops. **Gene Technology**, v. 4, p. 1-2, 2015.

YIN, C.; 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.

YOUNIS, A.; SIDDIQUE, M. I.; KIM, C. K.; LIM, K. B. RNA interference (RNAi) induced gene silencing: a promising approach of hi-tech plant breeding. **International journal of biological sciences**, v. 10, n. 10, p. 1150-1158, 2014.

ZADOKS, J. C.; CHANG, T. T.; KONZAK, C. F. A decimal code for the growth stages of cereals. **Weed Research**, v. 14, p. 415-421, 1974.

ZHANG, T.; JIN, Y.; ZHAO, J. H.; GAO, F.; ZHOU, B. J.; FANG, Y. Y.; GUO H. S. Host-induced gene silencing of the target gene in fungal cells confers effective resistance

to the cotton wilt disease pathogen *Verticillium dahliae*. **Molecular Plant**, v. 9, p. 939-942, 2016.

ZHENG, D.; ZHANG, S.; ZHOU, X.; WANG, C.; XIANG, P.; ZHENG, Q.; XU, J. R. The FgHOG1 pathway regulates hyphal growth, stress responses, and plant infection in *Fusarium graminearum*. **Plos One**, v. 7, n. 11, p. 1-12, 2012.

ANEXOS

Anexo I - Imagem da eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR a partir do DNA de linhagens de trigo HIGS contendo as construções gênicas RNAi-Chs3b e RNAi-Cyp51-Tri. Passo Fundo - RS, 2020

Anexo II - Alinhamento da sequência parcial de *Fusarium verticillioides* com a sequência de genes que codificam para quitina sintase em *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium graminearum*. Passo Fundo - RS, 2021

Sschs	TTCCGAGTTATGCGCTTTTGGAAAAGTCTGGTACATATGATCCCCCATCGTACCTTCTCTAC	60
FvChs7	TTCCAGCGTATGCCCTATTGGCTCGTTCCGGCACCTATGAGCCACCATCGTACCTGATCAC	60
FgPH-1Chs6	TTCCAGCGTATGCTCTCCCTTGGCTCGCTCGGGTACTTACGAGCCTCCCTTCTTACCTCATCAC	60
FgCML3066Chs	TTCCAGCGTATGCTCTCCCTTGGCTCGCTCGGGTACTTACGAGCCTCCCTTCTTACCTCATCAC	60
	*** ***** ** * * ** **	
Sschs	CGCGGACGATGCGAGCAGCTGCGAGCAGATTTTAGAGCATCTTTAAAGGCCATCGGTATCAA	120
FvChs7	CGCCGACGATGGTGTGCGGGCCGATGACTTCCGTCAGGCACTGAAGGAGATCGGTATCAA	120
FgPH-1Chs6	CGCCGATGATGGTGTGCGGCTGCCGACGACTTTCGCCAGGCACTCAAGGAGATTGGTATCAA	120
FgCML3066Chs	CGCCGATGATGGTGTGCGGCTGCCGACGACTTTCGCCAGGCACTCAAGGAGATTGGTATCAA	120
	*** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** * * * * * * * * * * * * * * *	
Sschs	AGGTGCGGGCCACAGAGATCTAATCTCAATACTAGCAGGATTATTGAAGCTAGGTGATAC	180
FvChs7	GGGCTCTGCCACCAGCACTTCAATTCACACTTGGTCTGCTCAAGCTCGGCAACAC	180
FgPH-1Chs6	GGGATCTGTCCACCCTAATCTCATCTACCTTGGCTGGACTTCTCAAGCTTGGCAACAC	180
FgCML3066Chs	GGGATCTGTCCACCCTAATCTCATCTACCTTGGCTGGACTTCTCAAGCTTGGCAACAC	180
	** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Sschs	TTTGAGCTTCATTCTTGATGGAGATGCTTTGGAGGAGATTGTGAAGATGTGGGAGGTCT	240
FvChs7	TCCTGACTACGATGCCGACTCAGACGATTTCCGAGGAGATTGCGAGGATGTTAGTGGTCT	240
FgPH-1Chs6	TCCTGACTACGATGCCGATTCGACGATTTCCGAGGAGATCTCGGAAGATGTCAGCGGTCT	240
FgCML3066Chs	TCCTGACTACGATGCCGATTCGACGATTTCCGAGGAGATCTCGGAAGATGTCAGCGGTCT	240
	* * ** * * * * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Sschs	TCTTGGCTTGGAACTGATGTTCTCGTCAAGCAATGCACGACACAGGAGCGAGAACTCT	300
FvChs7	TCTTGGCATGGAACAGAGGTGCTCATGCGACAGCTAAGCACTGAGGACCGTCGAAACACT	300
FgPH-1Chs6	TCTTGGTATGGAGCCGAGGTTCTCATGCAACAGTTGAGCACTGAGGATCGACGAACT	300
FgCML3066Chs	TCTTGGTATGGAGCCGAGGTTCTCATGCAACAGTTGAGCACTGAGGATCGACGAACT	300
	***** ***** ** ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Sschs	GATCGGTGGACTTTTGAAGCTCTTGTAGATTGGGTGATTTTGAAGCCCAACAGGCCCAT	360
FvChs7	CGTTGGTGGTTTGTACGAGGCTCTTGTGCGACTGGGTGATTTTGAAGCCCAACAGGCGCTAT	360
FgPH-1Chs6	TGTTGCTGGCTTGTATGAGGCTCTCGTTGACTGGGTCAATTTCCAAGGCCAACGCTGCCAT	360
FgCML3066Chs	TGTTGCTGGCTTGTATGAGGCTCTCGTTGACTGGGTCAATTTCCAAGGCCAACGCTGCCAT	360
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Sschs	CGCTAGCGAGATGGCTAGAACTCAAGGACGGCGATTCTTCGAGTGAAGGGGACCGGGGAGC	420
FvChs7	TGCTGCTCAGATGCTTCGCATTCCGAGATGGCGACGAGTCCATCGATGGCC---GCGGTGT	417
FgPH-1Chs6	TGCCGCTCAGATGCTCCGATCCGAGATGGCGATGAGTCTGTTGATGGTC---GTGGCGT	417
FgCML3066Chs	TGCCGCTCAGATGCTCCGATCCGAGATGGCGATGAGTCTGTTGATGGTC---GTGGCGT	417
	** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Sschs	TGGAACCCCGAATACCGAGGACGACAATGGTGACACGGTTTGCATAACTGTTCTTGAAT	480
FvChs7	GCGCACTCCAA---CCTCTAACGAGGACGGTGATACCGTGTCAATCACAGTTGTTGAAGT	474
FgPH-1Chs6	CCGCACTCCAA---ACGAAAACGAGGATGGTGACACCGTTTCCATCACTGTTGTTGAAGT	474
FgCML3066Chs	CCGCACTCCAA---ACGAAAACGAGGATGGTGACACCGTTTCCATCACTGTTGTTGAAGT	474
	** * * * * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Sschs	CCCGGACCCGAATCTGGGG-	499
FvChs7	TCCCGAGCCCTCGATTGGCC	494
FgPH-1Chs6	CCCCGAACCC-----	484
FgCML3066Chs	CCCCGAACCC-----	484
	** * * * *	

Nota: Alinhamento da sequência parcial de *Fusarium verticillioides* (FvChs7) com a sequência de genes que codificam para quitina sintase em *Sclerotinia sclerotiorum* (Sschs) e *Fusarium graminearum* (FgPH-1Chs6 e FgCML3066Chs). As sequências parciais de 494 pb da sequência de codificação do gene *Chs7* de *F. verticillioides* (FvChs7) (posição 624-1117) foram alinhadas ao gene da quitina sintase de *S. sclerotiorum* (Sschs) (número do acesso no GenBank XM_001584969.1), ao gene da quitina sintase 6 de *F. graminearum* PH-1 (FgPH-1Chs6) (número do acesso no GenBank XM_011319518.1) e ao gene *Chs6* de *F. graminearum* CML3066 (FgCML3066Chs) (número do acesso no GenBank LT222053.1). * representa o alinhamento perfeito entre as três sequências. O alinhamento foi feito por Clustaw Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).



PPGAgro

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - FAMV