



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

**EXPRESSÃO DE UMA ESFINGOMIELINASE DE *TRICHODERMA HARZIANUM*
COM POTENCIAL PARA CONTROLE DE BACTERIOSES EM PLANTAS**

Pedro Souza Berbert

**Brasília-DF
Janeiro de 2020**

PEDRO SOUZA BERBERT

**EXPRESSÃO DE UMA ESFINGOMIELINASE DE *TRICHODERMA HARZIANUM*
COM POTENCIAL PARA CONTROLE DE BACTERIOSES EM PLANTAS**

Tese apresentada à Pós-graduação em Biologia Molecular, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular

Orientador: Francisco José Lima Aragão

Brasília-DF
Janeiro de 2020

RESUMO

A agricultura é uma importante atividade para a economia do Brasil, que é um dos maiores produtores mundial de alimentos. Os principais fatores que ocasionam perdas aos sistemas agrícolas em todo o mundo são as doenças de plantas. Em geral as plantas são dotadas de mecanismos naturais de defesa para se protegerem contra patógenos. Contudo, as plantas por si só não podem resistir ao ataque, e por isso, várias estratégias para controle de doenças têm sido utilizadas. O controle biológico de pragas, por exemplo, é uma abordagem baseada no uso de organismos específicos para o controle de patógenos. Neste contexto, nos últimos anos técnicas de genômica e transcriptômica estão sendo utilizadas para analisar os mecanismos moleculares envolvidos no controle biológico. Em Vieira *et al.* (2013) foram identificados genes diferencialmente expressos por *Trichoderma harzianum* durante contato com *Fusarium solani*. Dentre os genes com potencial uso biotecnológico que tiveram a expressão aumentada, o gene da esfingomielinase ácida (*Thasm*) destacou-se no primeiro contato entre os fungos. Devido à atividade da enzima o gene da esfingomielinase foi selecionado como gene candidato para transformação de plantas. O objetivo desse trabalho, portanto, foi de analisar a atividade da esfingomielinase de *Trichoderma sp.* em linhagens de tabaco geneticamente modificadas (*Nicotiana tabacum*) e transformar geneticamente laranjeira (*Citrus sinensis* L. Osbeck) para induzir resistência à bactérias fitopatogênicas. Os resultados apresentados nesse trabalho demonstraram que plantas transgênicas de tabaco expressando o gene da esfingomielinase obtiveram resistência às bactérias *Pseudomonas syringae* e *Xylella fastidiosa*. Este estudo serviu como uma validação para confirmação do potencial de ação da esfingomielinase contra patógenos. Com os resultados de resistência obtidos surge uma nova perspectiva para o desenvolvimento de estratégias para a expressão desta molécula em culturas de interesse econômico, afetadas por doenças causadas por infecções bacterianas. Depois de construir e introduzir o vetor de expressão em *Agrobacterium tumefaciens*, as plantas de laranja foram geneticamente transformadas. As brotações regeneradas confirmadas positivas por PCR foram microenxertadas e estão sendo aclimatadas em casa de vegetação. Uma vez estabelecidas, as plantas serão desafiadas em bioensaios com fungos patogênicos e bactérias para verificar o nível de resistência.

Palavras chave: Transformação genética, Controle biológico, Resistência, Fitopatógenos

ABSTRACT

Brazil is one of the world's leaders in food production and agriculture has great importance for its economy. Nevertheless, plant diseases are one of the main factors causing production losses. Plants natural defense mechanisms that protect against pathogens. As plants alone cannot withstand attack, several disease control strategies have been adopted. One of them is biological pest control, which is an approach based on the use of specific organisms for pathogen control. Genomic and transcriptomic techniques allowed to analyze the molecular mechanisms involved in biological control. Vieira *et al.*, (2013) was able to identify differentially expressed genes by *Trichoderma harzianum* growing in contact with *Fusarium solani*. The acid sphingomyelinase (*Thasm*) gene stood out in the first contact between the fungi, showing increased expression. Because of its enzyme activity, the sphingomyelinase gene was selected as a candidate for plant transformation. The objective of this work is to analyze the activity of sphingomyelinase of *Trichoderma* sp. in genetically modified tobacco lines (*Nicotiana tabacum*) and genetically transform orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) to induce resistance to phytopathogenic bacteria. The results presented in this work showed that transgenic tobacco plants expressing the sphingomyelinase gene showed tolerance to the bacteria *Pseudomonas syringae* and *Xylella fastidiosa*. This work demonstrates the potential of sphingomyelinase against pathogens. The results obtained for resistance in tobacco offers a new perspective in developing crops resistant to bacterial infections. After building and introducing the expression vector in *Agrobacterium tumefaciens*, orange explants were transformed. PCR-confirmed regenerated shoots have been grafted and are being acclimated in a greenhouse. Once established, plants will be challenged with pathogenic fungi and bacteria in bioassays to verify resistance.

Key-words: Genetic Transformation, Biological Control, Plant Pathogens, Resistance

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
PROSPECÇÃO DA ESFINGOMIELINASE DE TRICHODERMA.....	12
ESFINGOMIELINASE	14
CAPÍTULO 1: EXPRESSÃO DO GENE DA ESFINGOMIELINASE EM TABACO CONFERE RESISTÊNCIA A DOENÇAS BACTERIANAS	19
RESISTÊNCIA DE PLANTAS VIA ENGENHARIA GENÉTICA	20
JUSTIFICATIVA	23
OBJETIVO.....	24
Objetivos específicos	24
MATERIAL E MÉTODOS	25
Construção do vetor de expressão contendo o gene de esfingomielinase.....	25
Transformação genética de plantas de tabaco	25
Seleção de eventos transgênicos.....	25
PCR quantitativo da expressão da esfingomielinase	26
Inoculação de plantas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	26
Infiltração com <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tabaci.....	27
Inoculação de <i>Xylella fastidiosa</i> em <i>Nicotiana tabacum</i>	27
Atividade antimicrobiana da esfingomielinase em cepa de bactéria <i>Escherichia coli</i>	28
Ensaio da atividade enzimática da esfingomielinase	29
RESULTADOS	30
DISCUSSÃO.....	39
CAPÍTULO 2: OBTENÇÃO DE LARANJEIRA GENETICAMENTE MODIFICADA PARA EXPRESSAR <i>THASM</i> VISANDO RESISTÊNCIA A DOENÇAS BACTERIANAS	43
A CULTURA DA LARANJA	44
BACTERIOSES NA CULTURA DE LARANJA.....	45
Cancro cítrico	45
Clorose variegada dos citrus (CVC)	46
Huanglongbing	47

JUSTIFICATIVA.....	49
OBJETIVO.....	50
Objetivos específicos	50
METODOLOGIA.....	51
Construção do vetor de expressão contendo o gene de <i>esfingomielinase</i>	51
Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	51
Material vegetal	51
Transformação genética de laranja	52
RESULTADOS	54
DISCUSSÃO.....	58
CONCLUSÃO	60
PERSPECTIVAS	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das estruturas dos esfingolipídios. (A): Principais bases de esfingolipídios de mamíferos e plantas (B): Estrutura básica de esfingolipídios mais comuns encontradas em plantas e mamíferos.

Figura 2. Representação das estruturas básicas da esfingomielinase ácida humana adaptada de (Zhou *et al.*, 2016). Em amarelo o domínio SAP, em azul o sítio catalítico da metalofosfatase e em verde o domínio C-terminal

Figura 3: Representação do processo de inoculação de *Xilella fastidiosa* ao longo do caule das plantas de tabaco.

Figura 4: (A) Representação esquemática do vetor pCSphingo contendo o promotor CaMV35S dirigindo a expressão do gene da esfingomielinase e o gene marcador de seleção bar que confere resistência a glifosinato de amônio GA (B): Eletroforese em gel de agarose (2%) contendo amostras do PCR das linhagem de tabaco transformadas com o vetor pCSphingo utilizadas nos bioensaios (C): Teste de cromatografia de fluxo lateral para detecção da proteína PAT. (1) Controle negativo. (2 a 8) linhagens Sph.2 à Sph.12 transgênicas utilizadas nos bioensaios.

Figura 5. Transformação genética de tabaco após a cocultura por *Agrobacterium tumefaciens*. (A) Explantes um mês após a cocultura com início de regeneração de gemas adventícias, (B) multiplicação de gemas adventícias, (C) alongação de brotos na presença do agente seletivo GA 5 mg/L e (D) broto isolado em alongação e transferidos para meio de enraizamento três meses após a transformação genética

Figura 6: Teste com aplicação do herbicida glifosinato para seleção de progênes transgênicas T1: (A) Plantas resistentes ao herbicida não apresentaram lesões, (B) plantas não transgênicas susceptível ao herbicida.

Figura 7. Resposta de folhas destacadas a *S. sclerotiorum* obtida pela inoculação com discos de micélio. Sph2 à Sph12: Folhas das linhagens transgênicas 48 e 72 horas após a infecção; Control: Folhas do controle negativo não transgênico 24 e 48 horas após a infecção.

Figura 8: Curva de progresso da doença obtida a partir da média das áreas lesionadas após a inoculação de folhas destacadas com discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. A área infectada foi medida em milímetros 48 e 72 horas após a inoculação, n=5.

Figura 9. Resposta do bioensaio de folhas destacadas à infiltração da suspensão bacteriana de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* 7 e 14 dias após a infiltração. Sph2 à Sph12: Folhas dos eventos transgênicos Control: Folha de tabaco não transgênico.

Figura 10: Gráfico das áreas lesionadas após a inoculação de folhas destacadas com a bactéria *P. syringae*. A área infectada foi medida em milímetros 7 e 14 dias após a inoculação As letras iguais mostram que as linhagens são iguais segundo o teste Tukey, p-valor < 0.05.

Figura 11: Expressão relativa do gene da *esfingomielinase* em plantas de tabaco transgênica determinado por RT-qPCR. **wt:** plantas selvagens (não-transgênicas), **(2-12):** linhagens de tabaco transgênicas.

Figura 12: Representação dos sintomas de infecção de *X. fastidiosa* em tabaco durante o ensaio resistência.

Figura 13. Gráfico do percentual do número de plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi em que *X. fastidiosa* resultantes da inoculação foi detectada via qPCR. Cont NGM-NI= controle (planta não transgênica, não inoculada. Cont NGM-I= controle (planta não transgênica, inoculada.

Figura 14: Resposta no teste de inibição do crescimento bacteriano. **Antibióticos:** cultura bacteriana crescida com o antibiótico, **Controle:** cultura bacteriana crescida sem antibióticos, **LB+PBS:** Padrão contendo meio de cultura com adição do tampão PBS. As placas foram incubadas à 37°C e o crescimento monitorado na absorbância de 595 nm

Figura 15: Ensaio da atividade da *esfingomielinase* em placas de Elisa com 96 poços. **1-2:** repetições do padrão da *esfingomielinase* contendo diluição seriada de 5 à 0 uM/uL. **3-5:** Triplicata com amostras de plantas, **A:** Planta Controle Negativo, **B:** Sphingo 2, **C:** Sphingo 6, **D:** Sphingo 7, **E:** Sphingo 8, **F:** Sphingo 10, **G:** Sphingo 11, **H:** Sphingo 12.

Figura 16: Representação esquemática do vetor pCSphingoNPTII contendo o promotor CaMV35S, o terminador TNOS, o marcador de seleção nptII, e marcados os sítios de PvuII

Figura 17: Eletroforese em gel de agarose (1%) contendo amostras da digestão de colônias de *E. coli* transformadas com o vetor pCSphingoNPTII. Os números de 1 a 4 indicam as colônias transformadas. O marcador utilizado foi o 1 Kb ladder (Invitrogen). Os fragmentos liberados do vetor pela digestão com a enzima PvuII possuem 7303, 1117, 1350 e 1500 pb.

Figura 18: Eletroforese em gel de agarose (2%) contendo amostras do PCR das colônias de *Agrobacterium* transformadas com o pCSphingoNPTII que foi utilizado para transformar os segmentos do epicótilo de laranja. Os números de 1 a 5 indicam as colônias transformadas com o vetor. Os símbolos C+, C- e H₂O indicam respectivamente o vetores plasmidiais um vetor pC3300 e água (H₂O). O marcador utilizado foi o 100 pb DNA ladder (Invitrogen). O fragmento amplificado é interno ao gene da esfingomilina e possui 413 pb.

Figura 19.: Processo de regeneração de brotos em explantes de laranja após a transformação por *Agrobacterium*. (A) Sementes de laranja retirada dos frutos e secas por 24 horas (B) Sementes de laranja em germinação (C) Plântulas de laranja em desenvolvimento que serão utilizados para Cocultura, (D) e (E) Explantes em meio de regeneração com seleção e (F).

Figura 20: Eletroforese em gel de agarose (2%) contendo amostras do PCR dos brotos regenerantes transformados na Cocultura 11. Os números de 1 a 9 indicam as plantas transformadas. Os símbolos C+, C- indicam respectivamente o vetor de transformação e uma planta controle. O marcador utilizado foi o 1 kb ladder (Invitrogen). O fragmento amplificado é interno ao gene da esfingomilina e possui 400 pb.

Figura 21: Processo de desenvolvimento e microenxertia dos brotos de laranja regenerados. (A) Explantes em meio de regeneração com seleção. (B) Microenxertia dos brotos regenerados em porta enxertos de laranja cultivados *in vitro* (C) Explantes microenxertados mantidos *in vitro* para o desenvolvimento de raízes nos porta enxertos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise do progresso da doença após inoculação com fitopatógenos. Área lesão *S. sclerotiorum*: média das áreas lesionadas nas duas repetições após a inoculação com o *S. Sclerotiorum*. Área lesão *Pseudomonas syringae*: Média das áreas lesionadas nas duas repetições após a inoculação com *P. Syringae*: As médias seguidas de letras idênticas, nas colunas, não diferem pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade. Fungos: n = 20, Bactérias: n=60

Tabela 2: Protocolos utilizados para a transformação genética de plantas.

Tabela 3: Levantamento dos explantes regenerados com diferentes meios de cultura na presença do agente seletivo.

INTRODUÇÃO

A agricultura é uma atividade de grande importância econômica, social e tecnológica de países em desenvolvimento como o Brasil (OMOROGIWA *et al.*, 2014; DIM e EZENEKWE, 2013; FAO, 2002). Contudo, apesar de um crescimento expressivo observado nos últimos anos, o principal desafio para a agricultura moderna é o de conciliar o aumento da produção de alimentos com os conceitos atuais de sustentabilidade (FISCHER *et al.*, 2014; PRETTY *et al.*, 2010). A transformação da agricultura para uma produção mais eficiente requer mais do que a transformação dos métodos de produção agrícola. Passa a ser vital, para alcançar tais objetivos, o desenvolvimento de pesquisas científicas para geração de tecnologias que visam melhorar tanto a produtividade quanto a resistência de plantas a estresses bióticos e abióticos.

Atualmente, a produtividade é o principal fator impulsionador da agricultura brasileira e as doenças de plantas constituem um dos principais fatores responsáveis por perdas na produção agrícola do país (NELSON, 2019). Como as doenças de plantas podem ser causadas por diferentes agentes patogênicos como fungos, bactérias, nematoides e vírus, o desenvolvimento de estratégias para a proteção das plantas requer conhecimento sobre a biologia e coevolução destes patógenos com seus hospedeiros (MCDONALD e STUKENBROCK, 2016).

Todas as plantas são dotadas de mecanismos naturais de defesa para se protegerem contra patógenos. A imunidade inata primária é a primeira linha de defesa das plantas e depende da caracterização do patógeno em nível celular, o que desencadeia vias complexas de sinalização (NEJAT *et al.*, 2017). O início da resposta é desencadeado pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por proteínas receptores e de reconhecimento dos padrões (PRRs), que ativam os mecanismos de defesa primária, tais como alterações da parede celular, deposição de calos e o acúmulo de proteínas relacionadas à defesa (JONES e DANGL, 2006). Em geral, as plantas por si só não podem resistir ao ataque de patógenos, que codificam efetores com a capacidade de superar os sistemas imunes (CUI *et al.*, 2009).

Para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, várias estratégias químicas e genéticas são empregadas para gerar sistemas que possam se contrapor às doenças geradas por patógenos. Entre as estratégias genéticas, várias novas estratégias para o controle de doenças têm sido

usadas e o uso de plantas resistentes via engenharia genética demonstra ser uma abordagem eficaz (WIT, 2007)

PROSPECÇÃO DA ESFINGOMIELINASE DE TRICHODERMA

A necessidade de aumentar a produtividade agrícola levou a um uso intensivo de defensivos para o controle de pragas e doenças de plantas. Contudo, o desenvolvimento de métodos alternativos, como o controle biológico em substituição ao controle químico, tem sido apontado como um método eficiente para o manejo de doenças em plantas e a manutenção da alta produtividade com baixo impacto ecológico (HIROOKA e ISHII, 2013; HYAKUMACHI, 2013).

O controle biológico é um método de manejo do controle de doenças de plantas, baseado na introdução de um organismo para reduzir a densidade populacional de outro organismo. Dentro deste contexto, espécies do gênero *Trichoderma* são mundialmente conhecidas como importantes Agentes de Controle Biológico (BCA), pois tem a capacidade de antagonizar fitopatógenos por uma combinação de vários mecanismos como competição, antibiose e micoparasitismo (BROTMAN *et al.*, 2010; VINALE *et al.*, 2008).

Os fungos do gênero *Trichoderma* possuem diferentes modos de interação com fitopatógenos e plantas (HOWELL, 2003). Novos estudos objetivaram, além de conhecer os processos envolvidos no controle biológico, a identificação e uma melhor compreensão da maquinaria molecular do processo de biocontrole (KUBICEK *et al.*, 2011, LORITO *et al.*, 2010). Neste cenário, a utilização de técnicas de genômica e transcriptômica tem sido aplicada tanto para explorar genes de *Trichoderma* expressos em diferentes condições de cultivo, quanto para analisar os mecanismos moleculares envolvidos no controle biológico (LIU e YANG, 2005; SAMOLSKI, 2009; STEINDORFF *et al.*, 2012).

As ESTs (expressed sequence tags) são sequências de RNA mensageiro que são convertidas em cDNA para serem sequenciados e identificados por meio da bioinformática. Na literatura, a utilização das bibliotecas ESTs é uma maneira eficaz para investigar os padrões de expressão gênica (BAILEY *et al.*, 2006). Também se tornaram uma poderosa ferramenta que tem sido utilizada para explorar genes de *Trichoderma* durante a interação com fungos fitopatógenos (LIU e YANG, 2005; STEINDORFF *et al.*, 2012).

Estudos moleculares possibilitaram avanços no entendimento sobre as enzimas secretadas por *Trichoderma* durante o processo de antagonismo aos fitopatógenos, assim como possibilitou a descoberta de novos genes para a transformação genética de plantas. A técnica de subtração por hibridização subtrativa ou SSH (Suppression Subtractive Hybridization) é uma metodologia utilizada para isolar e clonar genes diferencialmente expressos entre duas populações de cDNA obtidos de condições distintas. Neste contexto diversos trabalhos fizeram o uso da técnica de SSH para identificar genes diferencialmente do processo de micoparasitismo do *Trichoderma*. CARPENTER *et al.* (2005) investigaram os genes envolvidos na interação entre *T. hamatum* e *Sclerotinia sclerotiorum*. SCHERM *et al.* (2008) utilizaram biblioteca subtrativas RaSH (rapid subtractive hybridization) para clonar genes que são expressos especificamente durante a interação com o fitopatógeno *Rhizoctonia solani* e (VIEIRA *et al.*, 2013) por meio da análise de bibliotecas subtrativas e identificaram genes diferencialmente expressos em *Trichoderma harzianum* durante a interação com *Fusarium solani*.

No interessante estudo de Vieira *et al.* (2013) foram identificados genes de *Trichoderma* com potencial uso biotecnológico para transformação de plantas. Nesse estudo, vários genes diferencialmente expressos em *Trichoderma harzianum* durante contato com *Fusarium solani* foram identificados. Com a análise de suas sequências foi possível inferir suas funções durante o desenvolvimento, metabolismo e controle biológico realizado por *T. harzianum*. A quantificação da expressão de alguns desses genes foi analisada por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) e dentre os genes candidatos que tiveram a expressão aumentada, o gene da esfingomielinase ácida (aSMase) destacou-se no primeiro contato entre os fungos; e provavelmente devido à sua atividade de hidrolase, que cliva esfingolípido, presentes na membrana plasmática, sua função durante o contato pode estar associada à resposta ao fitopatógeno para degradação da membrana.

Embora a busca por plantas resistentes a fungos ter levado pesquisadores à identificação de genes de *Trichoderma* com reconhecido interesse biotecnológico (KUBICEK *et al.*, 2011; LORITO *et al.*, 2010; VINALE *et al.*, 2008), novos estudos são necessários para viabilizar a utilização desses genes. Por esta razão, o gene que codifica para uma esfingomielinase foi selecionado como gene candidato para transformação de plantas a serem obtidas e estudadas neste trabalho.

ESFINGOMIELINASE

A unidade estrutural e funcional básica de todos os seres vivos é a célula. Sendo uma das suas principais características, a estrutura que forma a bicamada lipídica da membrana plasmática restringindo a passagem de moléculas polares, íons e patógenos. A estrutura típica das membranas celulares é formada de esfingolípídeos, além de outros componentes como esteróis e proteínas (MANSY, 2010)

Os esfingolípídeos compõe uma classe de lipídeos de membrana, compostos por um grupo-cabeça polar e duas caudas não polares, formados por três estruturas básicas: uma molécula de amino-álcool de cadeia longa (esfingosina), uma molécula de ácido graxo de cadeia longa, e um grupo polar unido ou por uma ligação glicosídica ou por uma ligação fosfodiéster (Figura 1B). A Esfingosina e diidroesfingosina são a principal base estrutural dos esfingolípídeos nas células dos mamíferos, e a fitoesfingosina é a principal estrutura nas plantas e fungos (Figura 1A) (HANADA, 2005; WORRALL, 2003).

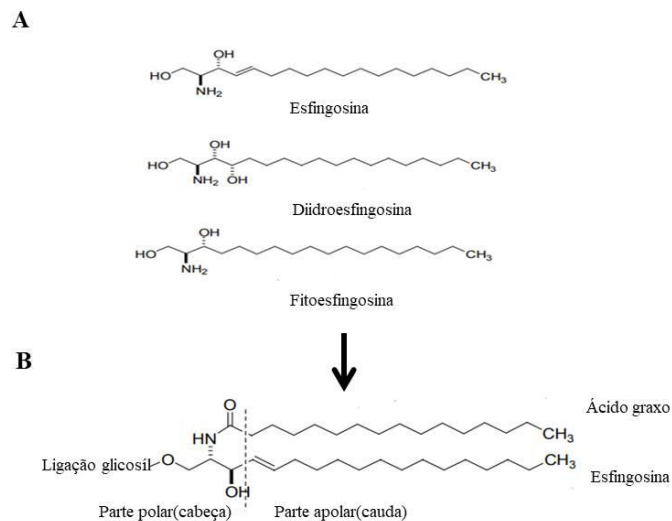


Figura 1. Representação esquemática das estruturas dos esfingolípídeos. (A): Principais bases de esfingolípídeos de mamíferos e plantas (B): Estrutura básica de esfingolípídeos mais comuns encontradas em plantas e mamíferos.

Diferentes organismos possuem estruturas de membranas diferentes. Nas células de mamíferos esfingomielina é responsável pela maior parte dos fosfolípídeos da membrana (LYNCH .e DUNN, 2003), enquanto células de animais inferiores têm fosfoceramida etanolamina

no lugar da esfingomielina (HANADA, 2005). Em plantas, os esfingolípídios complexos mais encontrados são glicosilceramidas (GlcCers) e glicosil inositolfosfoceramidas (GIPCs). Estes são formados pela adição de resíduos glicosil (açúcar) e outros grupos polares contendo fosfato à ceramida (LYNCH e DUNN, 2003) e em fungos as inositolfosfoceramidas (IPCs) e glicosilceramidas (GlcCer) são os lípídeos predominantes (ROLLIN-PINHEIRO *et al.*, 2016).

Os esfingolípídios são componentes estruturais de membranas celulares de animais, plantas e fungos (BIEBERICH, 2004; CHEN *et al.*, 2006; MACEYKA *et al.*, 2002). Contudo nas plantas além do papel estrutural, os esfingolípídios são componentes-chave nos microdomínios da membrana chamados “lipids rafts” (BHAT e PANSTRUGA, 2005; BORNER *et al.*, 2005) responsáveis na transdução de sinal e o tráfego de proteínas específicas. Assim como a clivagem de esfingolípídios geram derivados como a (ceramida), que atuam como segundos mensageiros de processos importantes como a morte celular programada, na resposta de hipersensibilidade induzida por patógenos e nas interações patógeno-hospedeiro (LIANG *et al.*, 2003; MARKHAN *et al.*, 2003; PEER *et al.*, 2010; TAKAHASHI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2008)

As enzimas do metabolismo dos esfingolípídios determinam os níveis celulares de ceramida, e por consequência a regulação de processos celulares subjacentes à geração, acúmulo e ação de ceramida (JENKINS *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2008; LIANG *et al.*, 2003). A ceramida pode ser gerada *de novo* na primeira etapa da síntese de um novo esfingolípido, com a condensação de serina e palmitoil-CoA (KITATANI *et al.*, 2008) ou a partir da hidrólise de esfingolípídeos, como a esfingomielina realizada por esfingomielinases.

Esfingomielinase ou Esfingomielina phosphodiesterase (EC 3.1.4.12) são enzimas que catalisam a hidrólise da esfingomielina para gerar ceramida e fosforilcolina. (SMITH *et al.*, 2008). Basicamente, as esfingomielinases são compostas por três partes: um domínio do tipo (SAP), formado por proteínas ativadoras de esfingolípídeos, um domínio catalítico pertencente à superfamília metalofosfatasas (MPPs) e um domínio C-terminal. A estrutura do domínio catalítico mostra duas camadas de folhas β , formando o núcleo central cercadas de α hélices, resultando em uma arquitetura que é característica do domínio calcinerurin-like phosphoesterases (ZHOU *et al.*, 2016; GORELIK *et al.*, 2016).

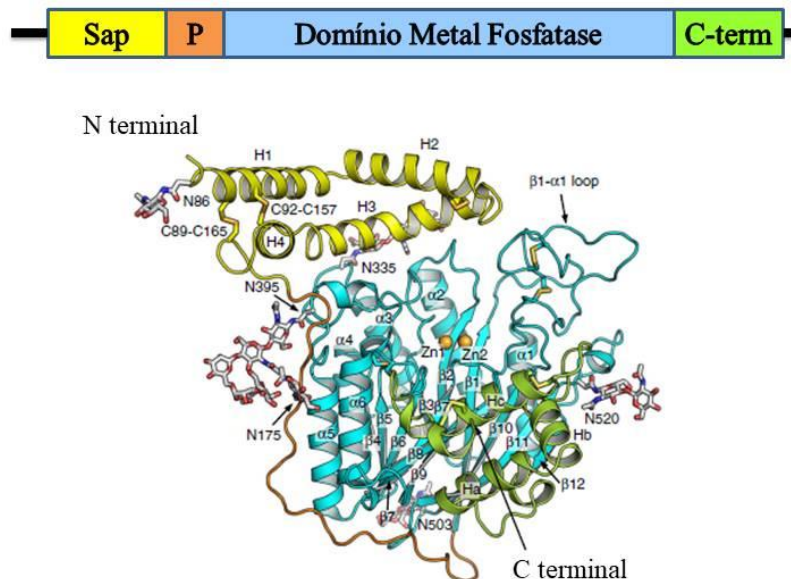


Figura 2. Representação das estruturas básicas da esfingomielinase ácida humana adaptada de (Zhou *et al.*, 2016). Em amarelo o domínio SAP, em azul o sítio catalítico da metalofosfatase e em verde o domínio C-terminal

Na literatura, existem três classes principais de SMase, divididas em ácida, neutra e alcalina, de acordo com o pH ótimo de sua atividade. Também se distinguem em cinco tipos: Smase ácida, Smase secretora, Smase neutra dependente de magnésio, Smase independente de magnésio e Smase alcalina; dependendo da localização celular, estrutura primária e dependência de um íon metálico (GONI *et al.*, 2012).

Em mamíferos, o papel das SMases está primordialmente ligado à sua capacidade de reorganizar a membrana plasmática e ativar a formação de microdomínios, enriquecidos por ceramida (SCHUCHMAN, 2010). A ativação de proteínas de sinalização, dentro desses microdomínios funcionam tanto como um mensageiro secundário, na indução da resposta apoptótica (PERROTA *et al.*, 2015), quanto na resposta imune para eliminar agentes patogênicos (LI *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2009). Assim, o sistema esfingomielinase-ceramida ou sua deficiência estão envolvidos em processos patológicos como a doença Niemann–Pick.

As esfingomielinas foram primeiramente identificadas em células humanas, porém novos estudos têm descoberto enzimas bacterianas homólogas à esfingomielinas. As esfingomielinas produzidas por *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria Ivanovii* são as mais bem caracterizadas entre as esfingomielinas bacterianas (MILHAS *et al.*, 2010). Apesar do nível de identidade entre esfingomielinas de bactérias e mamíferos ser baixo, estas apresentam resíduos conservados no sítio catalítico, levando à sugestão de um mecanismo catalítico comum (CLARKE *et al.*, 2006).

Em bactérias, as esfingomielinas são secretadas e funcionam como uma toxina que catalisa a hidrólise da esfingomielina da membrana plasmática de células hospedeiras (NARAYANAVARI *et al.*, 2012). Primeiramente, essas esfingomielinas foram assim designadas por causa da sua habilidade de converter esfingomielina em colina e ceramida. Mas novos estudos têm demonstrado que estas esfingomielinas são um grupo heterogêneo de enzimas, que atuam em moléculas alvo diferente e, portanto, devem ser classificadas como dois tipos diferentes SMase Cs (EC 3.1.4.12) e SMase Ds (EC 3.1.4.41) dependendo do local da clivagem da esfingomielina (GONI *et al.*, 2012; FLORES-DÍAZ *et al.*, 2016).

Em artrópodes, as esfingomielinas encontradas são classificadas como SMases D (EC 3.1.4.41) e foram inicialmente caracterizadas como um dos componentes do veneno de aranha *Loxosceles* sp., mas recentemente também têm sido descritas em novos organismos filogeneticamente distantes tais como bactérias, carrapatos, ácaros e fungos (DIAS-LOPES *et al.*, 2013). Nesses organismos, as esfingomielinas D catalisam a hidrólise da esfingomielina, gerando produtos diferentes das esfingomielinas de mamíferos. As Esfingomielinas D catalisam a hidrólise da esfingomielina, resultando na formação de ceramida-1-fosfato e colina (C1P), ou a hidrólise de lisofosdatidilcolina gerando ácido lisofosfatídico (LPA) (ANDRADE *et al.*, 2006).

Em fungos, sequências homólogas a esfingomielinas têm sido recentemente descobertas. No estudo de Dias-Lopes *et al.* (2013) utilizando ferramentas de bioinformática foram identificadas sequências de SmaseD em diferentes gêneros de fungos patogênicos e validado a atividade da esfingomielinase no fungo *Aspergillus flavus*. Vieira *et al.* (2013) identificaram uma sequência da esfingomielinase ácida em *T. harzianum* durante o micoparasitismo com *Fusarium solani*.

Como a identificação do gene da esfingomielinase ácida em *Trichoderma* ocorreu durante o processo do micoparasitismo, foi hipotetizado que essa enzima poderia estar atuando na degradação da membrana do fungo antagônico *Fusarium oxysporum*. Com a possibilidade da expressão de um gene de esfingomielinase de *Trichoderma* em plantas de *Nicotiana tabacum*, surge uma possível estratégia para validar o mecanismo de ação desta molécula e o potencial papel biotecnológico da esfingomielinase para geração de plantas resistentes a fungos e bactérias.

**CAPÍTULO 1: EXPRESSÃO DO GENE DA ESFINGOMIELINASE EM
TABACO CONFERE RESISTÊNCIA A DOENÇAS BACTERIANAS**

RESISTÊNCIA DE PLANTAS VIA ENGENHARIA GENÉTICA

A obtenção de organismos geneticamente modificados (GM), por meio da técnica do DNA recombinante ampliou as possibilidades do melhoramento genético. A geração de plantas transgênicas tornou-se uma ferramenta importante não só para elucidação da função gênica, bem como ampliou a possibilidade de mudanças em processos fisiológicos e permitiu a expressão heteróloga de proteínas capazes, de proporcionar resistência a fitopatógenos causadores de doenças.

As primeiras estratégias para controle de doenças via transformação genética de plantas, foram baseados em genes que codificam enzimas inibidoras de CWDEs (cell-wall-degrading enzymes) microbianos, cuja função está relacionada com a capacidade de interferir na membrana e parede celular do hospedeiro (ISLAM *et al.*, 2006; GROVER e GOWTHAMAN 2003; KHALILUEV e SHPAKOVSKII, 2013). Posteriormente, na última década, o silenciamento de genes induzido por RNAi surgiu como uma ferramenta para gerar plantas resistentes a patógenos.

A tecnologia do RNA interferência (RNAi) envolve um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional, exercido por moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA), que impedem a expressão de genes específicos por degradação do RNA mensageiros alvo (DUAN *et al.*, 2012; SETTEN *et al.*, 2019). Com a possibilidade de introdução de vetores que codificam o siRNA em plantas surgiu a possibilidade de induzir a supressão de genes críticos de nematoides, bactérias, fungos e vírus e proporcionar resistência contra algumas doenças de importância econômica (YOUNIS *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2017).

Com a elucidação genética dos mecanismos de defesa de plantas, novos estudos passaram a utilizar biomoléculas envolvidas no sistema imune de plantas, que atuam tanto na detecção e reconhecimento moléculas efetoras de agentes patogênicos quanto desencadeiam vias de sinalização dentro da célula vegetal (PANDOLFI *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

A primeira linha de defesa do sistema imune de plantas, designada imunidade induzida por PAMPs (PAMPs-Pathogen-Associated Molecular Patterns), é ativada após a detecção de moléculas produzidas pelo patógeno ou derivadas do próprio hospedeiro (DAMPs - Damage-

Associated Molecular Patterns) por proteínas de reconhecimento denominadas PRRs (*Plant Pattern Recognition Receptors*). O reconhecimento de padrões moleculares conservados desencadeia alterações fisiológicas, sinalização hormonal e transcricional para restringir o desenvolvimento do patógeno (DANGL e JONES, 2001; HACQUARD *et al.*, 2017).

Neste contexto, diversos estudos buscam, além de descobrir proteínas PRRs que possam ser aplicadas no desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a doenças, analisar funcionalidade e especificidade dessas proteínas à diferentes patógenos (BOUTROT e ZIPFEL, 2017). Embora as diferentes famílias de receptores possuam domínios específicos e mecanismos comuns de reconhecimento de patógenos, é relatada uma atividade altamente específica para determinados patógenos específicos, na qual a maioria das PRRs reconhecem um número restrito de alvos e não resulta em uma resistência de amplo espectro.

Como uma estratégia para subverter o sistema imune, patógenos especializados secretam proteínas efetoras que suprimem o sistema de defesa, assim como exploram genes de susceptibilidade do hospedeiro para obter sucesso na colonização e infecção (LAPIN e ACKERVEKEN, 2013). Recentemente, Van Schie e Takken (2014) descreveram as classes e mecanismos moleculares dos genes de susceptibilidade do hospedeiro e Zaidi *et al.* (2018) citam como uma estratégia utilizar CRISPR para interromper esses genes de suscetibilidade, o que pode interferir na compatibilidade entre o hospedeiro e os patógenos e, conseqüentemente, fornecer uma resistência duradoura às doenças.

A segunda linha de defesa (ETI- imunidade ativada por efetores) é ativada após o patógeno tentar superar o sistema de defesa do hospedeiro, o que desencadeia a ativação dos genes de resistência (R) e uma resposta sistêmica adquirida (SAR) (SILVA *et al.*, 2018). Proteínas relacionadas a patogênese (PR's) são um conjunto de moléculas induzidas e acumuladas no hospedeiro, apenas após a infecção do patógeno (ALI *et al.*, 2018). Na literatura, as proteínas PR são classificadas em 17 famílias baseadas em suas similaridades de sequência, atividades enzimáticas e outras características biológicas (SELS *et al.*, 2008). A expressão constitutiva de proteínas PR com diferentes funções em plantas transgênicas tem mostrado eficiência no controle do desenvolvimento de patógenos como fungos e bactérias (VAN LOON *et al.*, 2006, WALLY e PUNJA, 2010).

Dentre as proteínas relacionadas à patogênese, três são também classificadas como peptídeos antimicrobianos. Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são pequenas sequências de aminoácidos (<100 aminoácidos) hidrofóbicos e catiônicos, encontrados em bactérias, fungos, animais e planta, que estão relacionadas com o mecanismo de defesa (DA CUNHA *et al.*, 2017, ZASLOFF, 2002). Conforme descrito na literatura, a ação antimicrobiana ocorre de forma direta quando causa alterações na integridade física do sistema de membranas, e indireta quando os AMPs atravessam a barreira da membrana e interferem nos processos metabólicos intracelulares (SINHA e SHUKLA, 2019). De acordo com o possível modo de ação, os AMPs oferecem grande perspectiva como estratégias para o controle de doenças vegetais. Na literatura a geração de plantas GM para a expressão desta moléculas apresentam diferentes graus de resistência em espécies economicamente importantes como algodão, arroz, batata, soja e tabaco (SILVA *et al.*, 2018).

Embora muito já tenha sido estudado, poucos são os relatos que demonstram efetivamente o controle (durável/amplo espectro) de doenças causadas por bactérias (SUNDIN, 2016) e a busca por plantas resistentes tem levado os pesquisadores a identificar novos genes com interesse biotecnológico para o controle desses patógenos. Assim, a geração de plantas com genes de *Trichoderma* surge como uma alternativa e os primeiros estudos têm demonstrando resultados positivos no controle de doenças de plantas (BOLAR *et al.*, 2000; HERMOSA *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2009; MONTERO-BARRIENTOS *et al.*, 2010; SUAREZ *et al.*, 2004).

JUSTIFICATIVA

Os fungos do gênero *Trichoderma* são mundialmente conhecidos como agentes de controle biológico e estudos recentes trouxeram avanços significativos sobre as enzimas secretadas durante o processo de micoparasitismo. Dentro do seu arsenal enzimático, a esfingomielinase se destacou por apresentar altos valores de expressão durante o início do antagonismo. Esfingolipídeos, que são substratos dessa enzima, são reconhecidos alvos de terapias antimicrobianas e antifúngicas. Com base nessa premissa, acreditamos em uma função de defesa para a enzima esfingomielinase. Nesse estudo, optou-se por testar a hipótese que a esfingomielinase de *Trichoderma* pode atuar na desestabilização dos esfingolipídios de fitopatógenos como fungos e bactérias e proporcionar resistência.

OBJETIVO

O objetivo geral deste estudo foi analisar a atividade da esfingomielinase de *Trichoderma* sp. em linhagens de tabaco *N. tabacum* GM e avaliar a sua capacidade de induzir resistência a fitopatógenos (fungos e bactérias).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir vetores para expressão de um gene codificante para uma esfingomielinase de *Trichoderma* sp., e gerar (GM) de fumo.
- Realizar a caracterização molecular dos eventos GM gerados para demonstrar a presença e expressão dos transgenes.
- Realizar bioensaios para avaliação de resistência das plantas ao fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum* e às bactérias *Pseudomonas syringae* pv. Tabaci e *Xylella fastidiosa*

MATERIAL E MÉTODOS

CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO CONTENDO O GENE DE ESFINGOMIELINASE

A sequência que codifica para uma esfingomielinase ácida de *Trichoderma virens* Gv29-8 [GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) acesso (EHK26001.1)] foi utilizada para que esta fosse quimicamente sintetizada e clonada pela empresa Epoch Life Science, Inc. (Sugar Land, TX, USA). O fragmento dessa sequência foi clonado no vetor pC3300 entre os sítios de NcoI e SacI, sob o controle do promotor 35SCaMV. O vetor pCSphingo foi transferido para a linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105, que foi utilizada para transformar plantas de tabaco (cv. Xanthi) de acordo com Horsch *et al.*, (1988)

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS DE TABACO

A linhagem de *A. tumefaciens* EHA 105, contendo o vetor pCSphingo, foi inoculada em 10 mL de meio LB (MILLER, 1972), contendo os antibióticos rifampicina 100 mg/L, canamicina 100 mg/L. A cultura cresceu por 16 h a 28° C até uma densidade ótica (D.O.) de 0,7 (A600nm). Após o crescimento da cultura bacteriana, os explantes foliares foram inseridos na suspensão bacteriana (cocultura líquida). Os explantes inoculados foram cultivados em meio MS sólido, contendo BAP (6-benzilaminopurina) 1 mg.L⁻¹, por 48 h, no escuro. Após dois dias de cocultura em meio semisólido, os explantes foram transferidos para meio de regeneração MS contendo BAP 2 mg.L⁻¹, cefotaxima 200 mg.L⁻¹, timentin 100 mg.L⁻¹ e glufosinato de amônio (GA) 5 mg.L⁻¹. Os explantes foram cultivados por duas semanas e os calos obtidos foram separados e transferidos para novo meio de regeneração contendo GA. Os brotos tolerantes ao herbicida foram transferidos para o meio de enraizamento contendo 1 mg.L⁻¹ ANA e 5 mg.L⁻¹ de GA. As plântulas transgênicas regeneradas foram aclimatadas em casa de vegetação até a produção e colheita das sementes.

SELEÇÃO DE EVENTOS TRANSGÊNICOS

Para estudar o modo de ação da esfingomielinase em plantas transgênicas, foram selecionadas linhagens de tabaco, expressando o gene da esfingomielinase. Progenies da primeira geração (T₁) das linhagens sph2, sph6, sph7, sph8, sph10, sph11 e sph12 de plantas de *N. tabacum* foram selecionadas pela presença do gene de seleção, por meio da detecção da proteína fosfinotricina acetil transferase (PAT) com o Teste Kit GMO Trait chek LL (Strategic

Diagnostic Inc.). A análise por PCR foi realizada para confirmar a presença do transgene. Os primers Sphingo973 F: (TGGACAAGATGGGTTGGAGC) e Sphingo1344R: (GCCATAACAGCATGAGAAGCA) foram utilizados para amplificar 413pb da sequência codificante do gene da esfingomielinase.

PCR QUANTITATIVO DA EXPRESSÃO DA ESFINGOMIELINASE

Os níveis de transcrição do gene *Thasm* nas plantas de tabaco transgênicas foram quantificados por qRT-PCR. O RNA total foi isolado, a partir de 30 mg de tecido de folhas novas, utilizando o kit SV Total RNA Isolation System Kit (Promega). O cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total, utilizando o primer Oligo (dT) e um kit SuperScript III *de transcriptase reversa*, como descrito pelo fabricante (Invitrogen). A PCR foi realizada em um sistema de PCR em tempo real Applied Biosystems 7300 usando SYBR Green (Stratagene), de acordo com as instruções do fabricante. O programa de amplificação foi de 30 ciclos com 94°C por 15 s, 58°C por 15 s e 72°C por 15 s. Os níveis de transcrição do gene da esfingomielinase foram normalizados em relação aos genes endógenos *L25Ribossomal* e *EF1α*, os primers para amplificação dos genes endógenos *EF1α* 5'-TGAGATGCACCACGAAGCTC-3' e 5'-CCAACATTGTCACCAGGAAGTG-3'; *L25Ribossomal* 5'-CCCCTCACCACAGAGTCTGC-3' e 5'-AAGGGTGTGTTGTCCTCAATCTT-3' foram obtidos em por SCHMIDT e DELANEY, 2010. Os ensaios quantitativos foram realizados em triplicata.

INOCULAÇÃO DE PLANTAS COM *SCLEROTINIA SCLEROTIURUM*

Para a produção do inóculo utilizado no bioensaio, escleródios de *Sclerotinia* foram cultivados em placa de Petri com meio BDA (Batata Dextrose Agar), visando o desenvolvimento de micélios. Para o teste das folhas destacada um disco de micélio de 5 mm de diâmetro foi retirado do halo formado e posicionados na superfície adaxial de uma folha de cada planta (geração T₁). As caixas GERBOX, contendo as folhas inoculadas, foram transferidas para sala de cultivo e mantidas à 20°C, no escuro. Para avaliar o progresso da infecção fúngica, as folhas inoculadas foram fotografadas após 48 e 72 horas, após a inoculação. As imagens foram usadas para medir a área infectada usando o programa IMAGE J (imagej.nih.gov/ij/). As médias das áreas das lesões foram analisadas pelo teste TUKEY, com probabilidade de 5%, utilizando o programa SAS (Analytics Software e Solutions). As experiências foram repetidas duas vezes com três repetições para cada linhagem.

INFILTRAÇÃO COM *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *TABACI*

A cepa bacteriana de *P. syringae* pv. *tabaci* Emb 135 (IBSBF 766) foi cultivada em meio 523 (Kado e Heskett, 1970), e incubado a 28° C. Após o crescimento em meio líquido por 48 h, a cultura foi centrifugada e ressuspendida em água destilada usando a escala de Mc Farland na diluição 10⁻⁷. A infiltração nas folhas destacadas foi realizada com uma seringa sem agulha em sua parte abaxial. Em cada folha, 6 pontos foram infiltrados com a suspensão bacteriana e um ponto com água (controle de infiltração). As folhas foram mantidas em bandejas embrulhadas com sacos plásticos para simular uma câmara úmida e mantidas na sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas a 25 ± 2°C. Para avaliar o progresso do crescimento bacteriano, as folhas destacadas foram fotografadas para o cálculo das áreas lesionadas 7 e 14 após a infiltração. As imagens foram usadas para medir a área infectada usando o programa IMAGE J (imagej.nih.gov/ij/). As médias das áreas das lesões foram agrupadas pelo teste TUKEY, com 5% de probabilidade (usando SAS: Analytics Software e Solutions). As experiências foram repetidas duas vezes com cinco repetições.

INOCULAÇÃO DE *XYLELLA FASTIDIOSA* EM *N. TABACUM*

Sementes de *N. tabacum* Xanthi GM eventos 2, 6, 7, 8, 10, 11, 12 foram semeadas e, após 20 dias, as mudas foram transplantadas individualmente para vasos. Para o ensaio de inoculação foram utilizadas as cepas 9a5c e Itápolis da bactéria *Xylella fastidiosa*. A bactéria foi cultivada em meio PWG (HILL e PURCELL, 1995) e após o crescimento a cultura bacteriana foi centrifugada e ressuspendida em PBS 1X na densidade ótica (D.O.) de 0,368 (A_{600nm}). A inoculação nas plantas foi feita com auxílio de seringa e agulha de insulina aplicando aproximadamente 1 mL da suspensão bacteriana por planta (Figura 3). As plantas inoculadas e seus controles foram mantidas em casa de vegetação e, após 30 e 90 dias da inoculação, foram coletadas folhas de cada uma das plantas. Para a detecção de *X. fastidiosa* nas plantas inoculadas foi realizado um PCR quantitativo. As amostras de DNA coletadas foram quantificadas em Nanodrop e 300 ng foram utilizados na reação de PCR quantitativo com os primers HL5 (5-AAGGCAATAAACGCGCACTA-3) e HL6 (5-GGTTTTGCTGACTGGCAACA-3) que amplifica um fragmento de 221 pb do genoma de *X. fastidiosa*



Figura 3: Processo de inoculação de *Xilella fastidiosa* em diferentes pontos ao longo do caule das plantas de tabaco.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ESFINGOMIELINASE EM CEPA DE BACTÉRIA *ESCHERICHIA COLI*.

Para testar a hipótese da esfingomielinase estar atuando diretamente sobre a membrana das células bacterianas foi realizada uma adaptação da metodologia descrita por (CLSI, 2015). Para a extração de proteínas a partir de folhas foi utilizado o protocolo descrito por MARCELINO e GROSSI DE SÁ (2015) e a determinação da quantificação de proteína total realizada pela técnica de Bradford utilizando o kit Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories)

Para a preparação de inóculo usado no teste cepas de *E. coli* foram cultivadas *overnight* em meio LB (MILLER, 1972). Para estabelecer o padrão de turbidez do inóculo, a cultura foi centrifugada e ressuspensa, utilizando a escala Mc Farland na diluição de 10^{-7} . Para o ensaio da concentração inibitória mínima (MIC) os extratos proteicos obtidos das linhagens de tabaco foram quantificados e diluídos nas concentrações de 512, 256, 128, 64 ng/uL. Para o ensaio, os extratos foram adicionados à suspensão bacteriana e incubados em microplacas de 96 poços num agitador a 150 rpm à 37°C. Após incubação por 16h, a absorbância foi medida num leitor de microplacas (Bio-Rad) à 595 nm. A taxa de sobrevivência das bactérias foi calculada por alterações na densidade óptica comparada pela referência (crescimento bacteriano no meio). O antibiótico cefotaxima foi utilizado como controle.

ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ESFINGOMIELINASE

Para analisar a atividade da esfingomielinase em plantas transgênicas, foi utilizado o kit Sphingomyelinase assay kit (Abcam ab 138876). O kit utiliza o indicador AbBlue como uma sonda colorimétrica para quantificar indiretamente a fosfocolina produzida a partir da hidrólise da esfingomielina pela esfingomielinase SMase. Resumidamente, a concentração das amostras foi diluída em série assim como determina o protocolo. Depois de realizadas as diluições estas foram adicionadas a microplacas de 96 poços e incubadas a 37 ° C com o substrato (esfingomielina) do kit. Para detecção colorimétrica foi adicionado indicador colorimétrico e a absorbância foi monitorada a 655nm.

RESULTADOS

A construção do vetor de transformação foi projetada para a expressão constitutiva do gene da esfingomielinase em plantas de tabaco. Após o desenho *in silico* do cassete de expressão, a sequência codificante para uma esfingomielinase de *T. harzianum* foi quimicamente sintetizada e clonada no vetor pCambia 3300, gerando o vetor pCSphingo (Figura 4A) que foi introduzido em *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 para transformação genética de plantas.

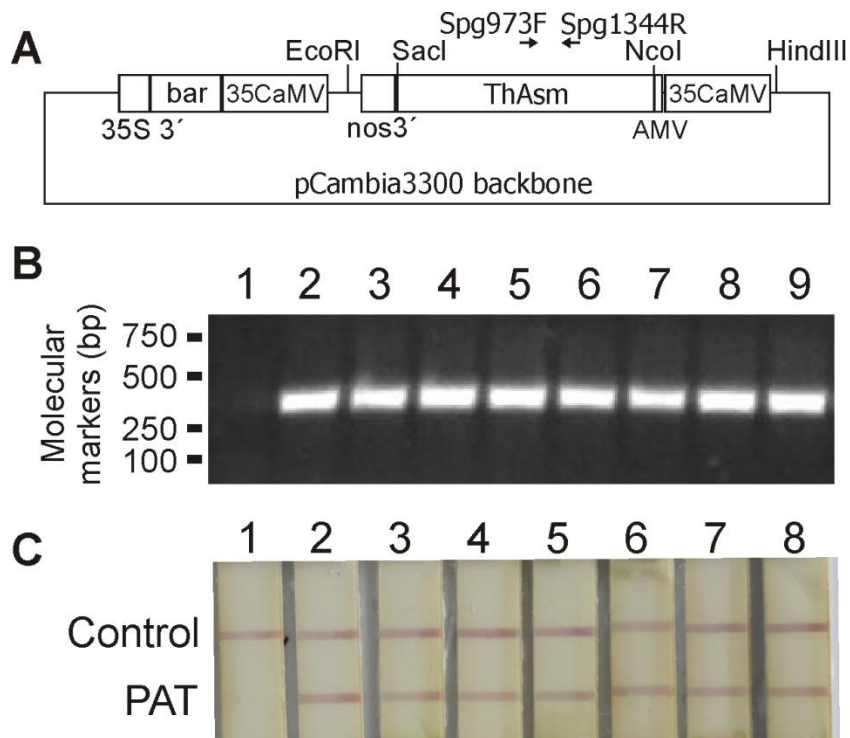


Figura 4: (A) Representação esquemática do vetor pCSphingo contendo o promotor *CaMV35S* dirigindo a expressão do gene da esfingomielinase e o gene marcador de seleção *bar* que confere resistência ao glifosinato de amônio (GA) (B): Eletroforese em gel de agarose (2%) contendo amostras dos produtos de PCR das linhagem de tabaco transformadas com o vetor pCSphingo utilizadas nos bioensaios (C): Teste de cromatografia de fluxo lateral para detecção da proteína PAT. (1) Controle negativo. (2 a 8) linhagens Sph.2 à Sph.12 transgênicas utilizadas nos bioensaios.

Linhagens de plantas transgênicas de tabaco foram geradas por transformação mediada por *Agrobacterium* (Figura 5) (BERBERT, 2015). Partindo dos resultados iniciais obtidos nos ensaios de resistência foram escolhidas as linhagens sph2, sph6, sph7, sph8, sph10, sph11 e sph12, para um estudo mais detalhado. Para os ensaios realizados, plantas da geração T₁, de cada

linhagem, foram pré-selecionadas por meio da seleção com o herbicida glufosinato de amônio (GA) (Figura 6). A presença do gene da esfingomielinase nas linhagens T₁ foi estabelecida por PCR (Figura 4B) e a expressão do gene *BAR* detectada pelo GMO TraitCheck Test (Figura 4C).

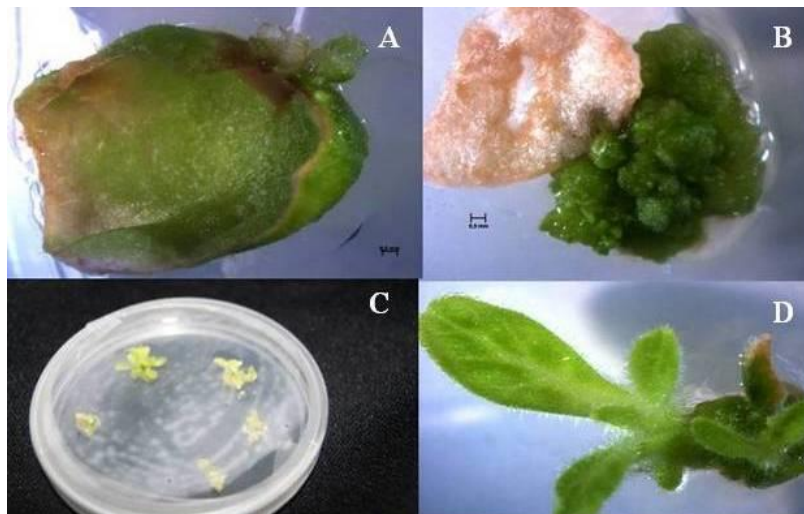


Figura 5. Transformação genética de tabaco após a cocultura por *A. tumefaciens*. (A) Explantes um mês após a cocultura, com início de regeneração de gemas adventícias, (B) multiplicação de gemas adventícias, (C) alongação de brotos na presença do agente seletivo GA 5 mg/L e (D) broto isolado em alongação e transferidos para meio de enraizamento, três meses após a transformação genética.



Figura 6: Teste com aplicação do herbicida glufosinato para seleção de progênes transgênicas T₁: (A) Plantas resistentes ao herbicida não apresentaram lesões, (B) plantas não transgênicas susceptível ao herbicida.

Para avaliar os efeitos do gene da esfingomielinase na indução de resistência a doenças causadas por fungos, as linhagens transgênicas foram desafiadas com o patógeno *S. sclerotiorum*.

Folhas destacadas de plantas GM da geração T₁ foram inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* e a área da lesão foi registrada 48 e 72 horas após a inoculação (Figura 7). Os

resultados do teste com o fungo *S. sclerotiorum* demonstrou que as linhagens transgênicas não diferiram significativamente em relação ao controle (Figura 8). Após 48 horas da inoculação, já era possível observar os primeiros sintomas de doença em todas as plantas testadas, mas a análise do progresso da doença revela que os eventos transgênicos não apresentaram atraso no desenvolvimento dos sintomas, quando comparado com o controle não transgênico. A área infectada 72 horas após a inoculação variou de 39.64 a 58.33 mm² (média 47.51mm²) nas linhas transgênicas, enquanto no controle (plantas não-transgênicas) a área infectada variou de 21.10 a 152.956 mm² (média 63.96 mm²). No entanto, essas diferenças não se revelaram estatisticamente significativas (P<0.05).

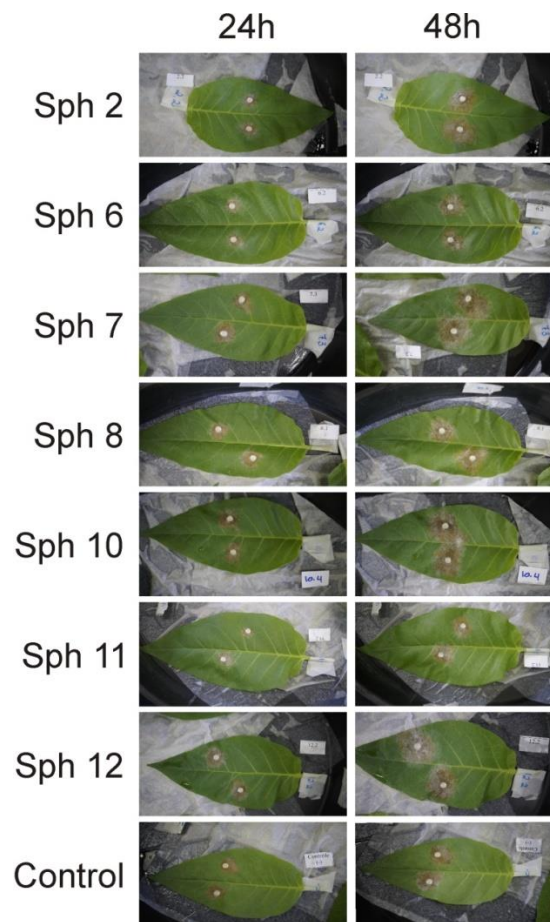


Figura 7. Resposta de folhas destacadas a *S. sclerotiorum* obtida pela inoculação com discos de micélio. Sph2 à Sph12: Folhas das linhagens transgênicas 48 e 72 horas após a infecção; Control: Folhas do controle negativo não transgênico 24 e 48 horas após a infecção.

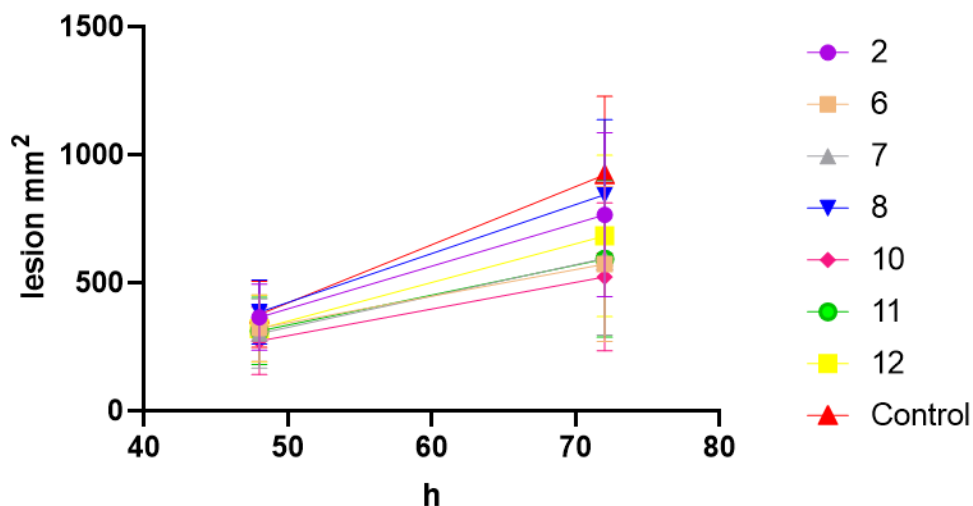


Figura 8: Curva de progresso da doença obtida a partir da média das áreas lesionadas após a inoculação de folhas destacadas com discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. A área infectada foi medida em milímetros 48 e 72 horas após a inoculação, n=5.

Tabela 1: Análise do progresso da doença após inoculação com fitopatógenos. Área de lesão com *S. sclerotiorum*: média das áreas lesionadas nas duas repetições após a inoculação com o *S. sclerotiorum*. Área lesão *P. syringae*: Média das áreas lesionadas nas duas repetições após a inoculação com *P. syringae*: As médias seguidas de letras idênticas, nas colunas, não diferem pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade. Fungos: n = 20, Bactérias: n=60

Linhagens	Área de lesão <i>S. sclerotiorum</i>		Área de lesão <i>P. syringae</i>	
	48 horas	72 horas	7 dias	14 dias
Sph 2	27.45 ^a	56.08 ^a	22.16 ^a	33.47 ^a
Sph 6	23.34 ^a	42.99 ^a	23.66 ^a	43.68 ^a
Sph 7	25.49 ^a	45.00 ^a	23.24 ^a	38.19 ^a
Sph 8	28.64 ^a	58.33 ^a	18.39 ^a	28.27 ^a
Sph 10	20.43 ^a	39.64 ^a	21.13 ^a	33.73 ^a
Sph 11	23.56 ^a	43.39 ^a	22.58 ^a	28.59 ^a
Sph 12	21.89 ^a	47.14 ^a	23.22 ^a	28.74 ^a
Controle	29.45 ^a	63.96 ^a	163.44 ^b	358.67 ^b

Para avaliar os efeitos do gene da esfingomielinase na indução de resistência a doenças causadas por bactérias, as linhagens transgênicas foram desafiadas com *P. syringae* e *X. fastidiosa*

Para avaliar o ensaio de infiltração bacteriana com *P. syringae* foi monitorada a área lesionada nas áreas infiltradas (Figura 9). A medida da área infiltrada demonstrou o progresso da infecção bacteriana e as análises estatísticas mostram diferenças entre as linhagens transgênicas e o controle (Figura 10). Sete dias após a infiltração, já era possível verificar o início do crescimento da área afetada com uma diferença em até duas vezes da área lesionada entre os eventos transgênicos e o controle (Tabela 1). Com o progresso da doença após 14 dias a área infectada nas plantas controle havia tomado praticamente toda a folha, enquanto nas linhas transgênicas foi observada uma reação de controle da expansão bacteriana. A área infectada após 14 dias variou de 28.59 a 43.68 mm² (média 33.52 mm²) nas linhas transgênicas, enquanto no controle (plantas não-transgênicas) a média da área infectada foi 358.67 mm².

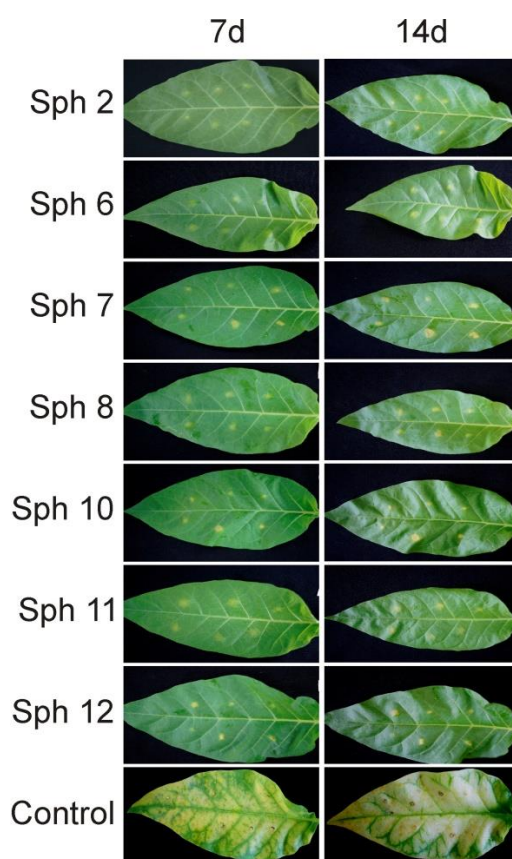


Figura 9. Análise do progresso da doença após inoculação de folhas com a suspensão bacteriana de *P. syringae* pv *tabaci*, 7 e 14 dias após a infiltração. Sph2 à Sph12: Folhas dos eventos transgênicos Control: Folha de tabaco não transgênico.

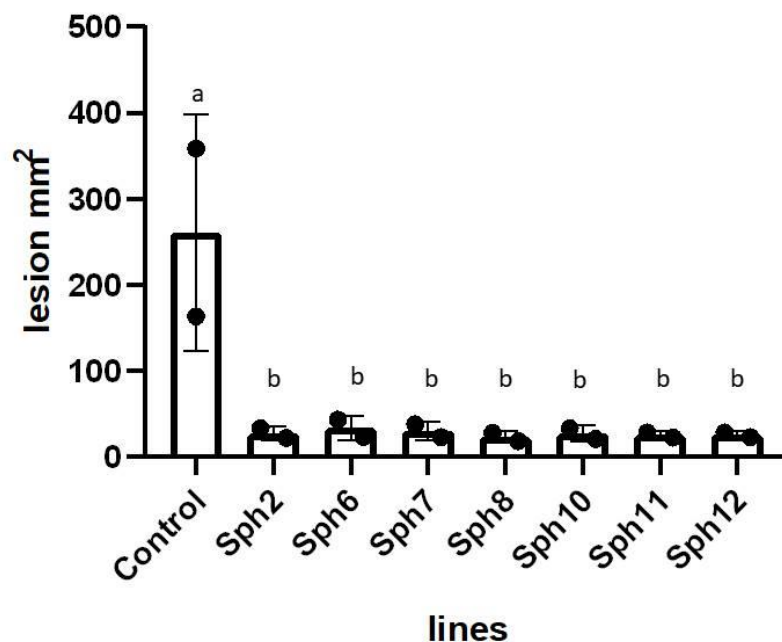


Figura 10: Gráfico das áreas lesionadas após a inoculação de folhas destacadas com a bactéria *P. syringae*. A área infectada foi medida em milímetros 7 e 14 dias após a inoculação. As letras iguais mostram que as linhagens são iguais segundo o teste Tukey, p -valor < 0.05.

A análise quantitativa de RT-qPCR foi realizada a fim de determinar a relação causa-efeito entre a expressão do gene esfingomielinase com a resposta obtida com o ensaio de resistências à *P. syringae*. O resultado demonstrou que as linhagens possuem diferentes níveis de expressão (Figura 11). Quando comparados à expressão da esfingomielinase com a resposta obtida com o ensaio de resistência não observamos correlação entre o nível de expressão do transgene e a resistência observada à *P. syringae*. Contudo, as plantas transgênicas de tabaco com expressão do gene da esfingomielinase possuíam melhores resultados no desafio.

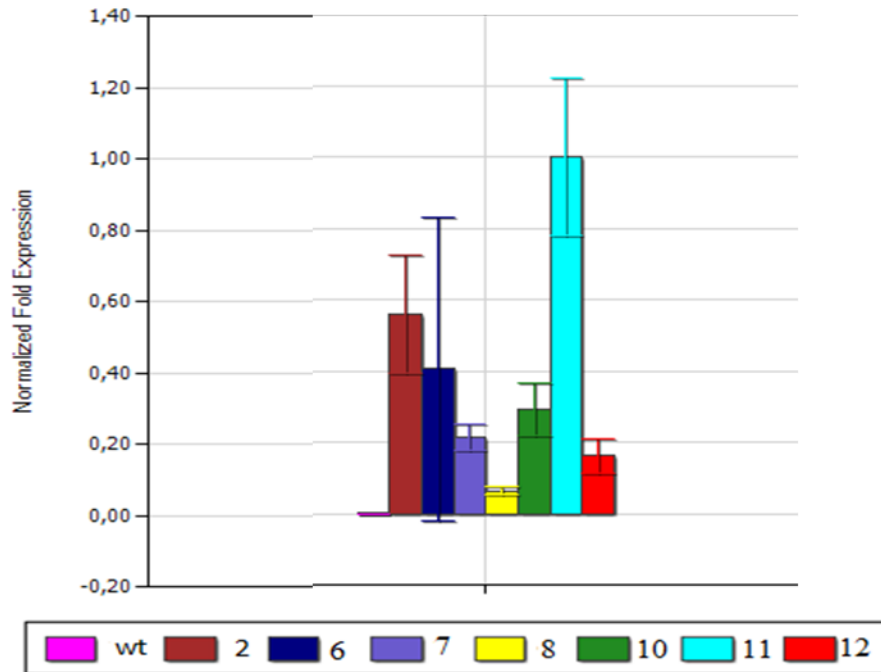


Figura 11: Expressão relativa do gene da *esfingomielinase* em plantas de tabaco transgênica determinado por RT-qPCR. **wt**: plantas selvagens (não-transgênicas), **(2-12)**: linhagens de tabaco transgênicas.

Para o experimento de resistência das plantas de tabaco à infecção com *X. fastidiosa*, quinze plantas de cada linhagem foram inoculadas e mantidas em casa de vegetação para o desenvolvimento de sintomas (Figura 12), 30 e 90 dias após da inoculação, foram coletas folhas de cada uma das plantas, de todas as plantas do experimento. As amostras de DNA coletadas foram quantificadas e 300 ng foram utilizados na qPCR. Após padronização e verificação da ausência de reações cruzadas com os controles negativos, a qPCR foi aplicada a todas as amostras de DNA coletadas.



Figura 12.: Sintomas de infecção de *X. fastidiosa* em folhas de tabaco durante o ensaio resistência.

A qPCR evidenciou a presença de *X. fastidiosa* nas plantas inoculadas. Na coleta de 90 dias, foi observada diferença em valores de quantificação entre as plantas de *N. tabacum* cv. Xanthi NT e os eventos transgênicos. Enquanto a Cq médio das plantas NT foi 19,6 a média dos eventos variou entre 21,9 e 24,7. Esta média representa aproximadamente 10 vezes menos *X. fastidiosa* nos eventos GM em comparação ao não NT. Com relação a detecção de *X. fastidiosa* foi observada redução no número de plantas onde *X. fastidiosa* foi detectada, nos transgênicos eventos em comparação ao controle não GM (Figura 13). A linhagem sph10 apresentou a menor porcentagem de detecção de *X. fastidiosa* nos experimentos com as duas cepas de bactérias.

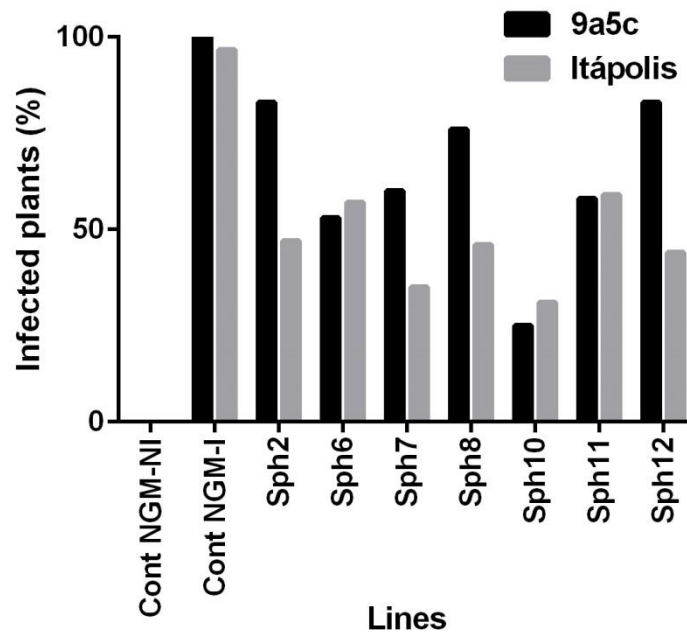


Figura 13. Detecção de *X. fastidiosa* em plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi via qPCR. Cont NGM-NI= controle (planta não transgênica, não inoculada). Cont NGM-I= controle (planta não transgênica, inoculada).

Para testar a atividade antimicrobiana da esfingomielinase, os extratos proteicos das plantas de tabaco transgênicas foram diluídos em meio LB líquido e incubados junto a cepas de *E.coli* para inibir o crescimento bacteriano. A análise do ensaio não mostrou atividade antimicrobiana, mesmo com uma concentração de 512 ng/μL, o extrato das plantas transformadas não diferiu do extrato da planta controle. As culturas bacterianas com o extrato das plantas possuía uma densidade óptica maior que o controle sem o extrato proteico (Figura 14).

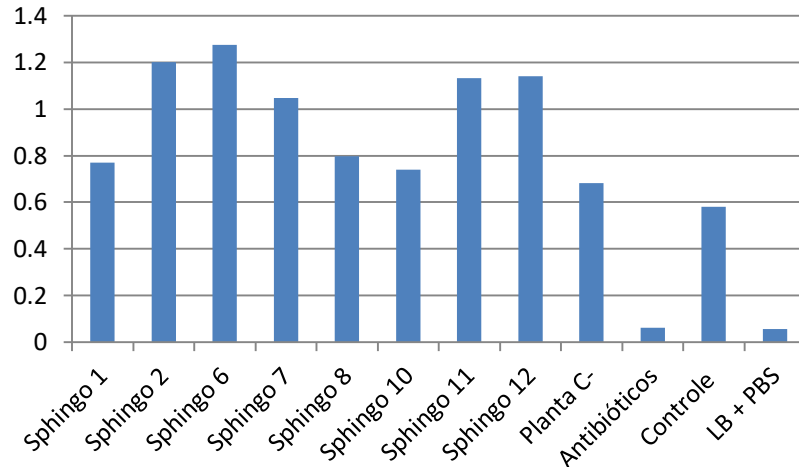


Figura 14: Resposta no teste de inibição do crescimento bacteriano. **Antibióticos:** cultura bacteriana crescida com o antibiótico, **Controle:** cultura bacteriana crescida sem antibióticos, **LB+PBS:** Padrão contendo meio de cultura com adição do tampão PBS. As placas foram incubadas à 37°C e o crescimento monitorado na absorbância de 595 nm

A esfingomielinase é responsável por clivar a esfingomielina em ceramida e fosfocolina. A hipótese de que a esfingomielinase expressa em tabaco pudesse atuar sobre os esfingolipídios dos patógenos estudados foi testada utilizando o kit colorimétrico utiliza o indicador ABBLUE para quantificar indiretamente a fosfocolina produzida a partir da hidrólise da esfingomielina. Quando submetidas, às amostras do extrato proteico das linhagens transgênicas não foi observada a reação (Figura 15). A não detecção da atividade enzimática, utilizando o kit, pode estar ligada ao protocolo de extração da proteína das plantas de tabaco ou a sensibilidade do kit, que foi desenvolvido para detecção da atividade enzimática no sangue e fluidos corporais.

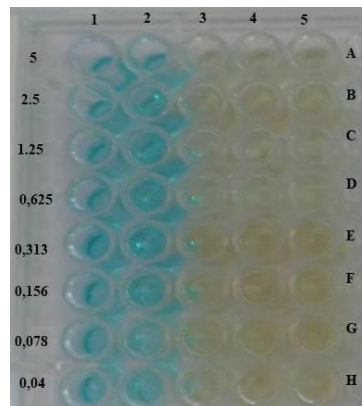


Figura 15: Atividade da *esfingomielinase* em placas de Elisa com 96 poços. **1-2:** repetições do padrão da *esfingomielinase* contendo diluição seriada de 5 à 0 uM/uL. **3-5:** Triplicata com amostras de plantas, **A:** Planta Controle Negativo, **B:** Sphingo 2, **C:** Sphingo 6, **D:** Sphingo 7, **E:** Sphingo 8, **F:** Sphingo 10, **G:** Sphingo 11, **H:** Sphingo 12.

DISCUSSÃO

Ao longo dos anos, proteínas relacionadas à patogênese (PR) representam a mais importante classe de genes utilizada nos programas de transformação genética de plantas, objetivando resistência à doenças e patógenos (MOOSA *et al.*, 2017; PANDOLFI *et al.*, 2017). A clonagem dos primeiros genes de resistência foi publicada na década de 90 com (JOHAL e BRIGGS, 1992) o gene *Hm1* de milho, seguido do gene *Pto* de tomate por Martin *et al.* (1993), e o gene *Cf-9* de tomate (JONES *et al.*, 1994). Embora muito progresso tenha ocorrido em torno do entendimento da tolerância controlada por esses genes de resistência (KOURELIS e HOORN, 2018), a maioria dos genes R possuem mecanismos comuns e domínios que acarretam numa atividade altamente específica para o reconhecimento de patógenos específicos

Recentemente, a descoberta de genes de *Trichoderma* durante o processo de micoparasitismo abriu novas perspectivas para o controle de fitopatógenos. Aqui nós relatamos pela primeira vez a expressão do gene *Thasm* de *Trichoderma* e demonstramos que a expressão desta molécula em plantas geneticamente modificadas é capaz de induzir resistência a bactérias fitopatogênicas.

Na busca de resistência a fungos, em geral encontramos genes que codificam enzimas hidrolíticas, glucanases e quitinases, cuja funções estão relacionada com a capacidade de interferir na estrutura da parede celular (ISLAM, 2006; GROVER e GOWTHAMAN *et al.*, 2003, KHALILUEV e SHPAKOVSKII, 2013).

Quitinases são encontradas e classificadas em plantas como proteínas relacionadas à patogênese (PR3, PR4, PR8 e PR11) assim como também estão presentes em uma ampla variedade de organismos como bactérias, vírus, plantas e animais (NAGPURE *et al.*, 2013). Como a ação desta enzima está relacionada à degradação de quitina, diversos estudos propuseram que a expressão de quitinases em plantas transgênicas pode desencadear resistência a doenças causadas por fungos (CEASAR e IGNACIMUTHU, 2012). Neste contexto, BOLAR *et al.* (2000) transformou maçã e observou resistência a *Venturia inaequalis*, Dana *et al.* (2006) transformou tabaco com uma combinação de duas quitinases CHIT33 e CHIT42 sobre o controle de um peptídeo de sinal e observou que além de uma tolerância aos patógenos *Rhizoctonia solani* e *P. syringae*. Baranski *et al.* (2008) transformaram cenoura com *Chit36* de *T. harzianum* e observou um aumento na tolerância a *Alternaria radicina* e *Botrytis cinérea* e Aghazadeh *et al.* (2016) expressou quitinase de *Trichoderma atroviride* combinada com PR5 *thaumatin-like*

protein (tlp) de arroz em plantas transgênicas de canola e mostraram resistência significativamente aumentada contra *S. sclerotiorum*.

Assim como as quitinases, a expressão de glucanases (PR-2) também tem sido alvo de estudos que demonstraram o envolvimento desta enzima no mecanismo de defesa da planta. Nestes estudos foram demonstrados que sua atividade está intimamente relacionada com a hidrólise de glucano que é um componente essencial da parede celular de fungos (SINGH *et al.*, 2014). Porém, a superexpressão apenas do gene da glucanases demonstra um sucesso limitado com pouca resistência observada (WALLY *et al.*, 2009). No entanto, quando combinada, a expressão de quitinases e glucanases frequentemente resulta em um efeito acumulativo, aumentando a resistência em várias espécies de plantas (ALI *et al.*, 2018; CEASAR e IGNACIMUTHU, 2012). Assim, a expressão conjunta de glucanases com proteínas do tipo taumatina (TLP), que interagem especificamente com a membrana plasmática dos fungos, mostrou resistência significativamente aumentada contra *S. sclerotiorum* (AGHAZADEH *et al.*, 2016)

No presente estudo, testou-se a hipótese de que esfingomielinase de *Trichoderma* poderia atuar como uma molécula desestabilizadora da membrana do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* levando ao combate da infecção. Contudo a expressão do gene da esfingomielinase neste trabalho não se mostrou eficaz para inibir o crescimento do fungo. Os resultados obtidos dos desafios demonstraram que as plantas transformadas não diferem das selvagens. É possível que isso esteja relacionado a sua apresentação às estruturas da membrana desses patógenos, quando no contato com as plantas.

Sclerotinia sclerotiorum é um fungo necrotrófico (também considerando por alguns autores como hemibiotrófico) muito agressivo, que interage com os tecidos vivos por um curto período de tempo. Possivelmente esse período não é suficiente para que o efeito da presença da esfingomielinase sobre as estruturas membranares do patógeno seja efetivo. Na cinética dos genes expressos por *T. harzianum* em contato com *S. sclerotiorum* proposto por Troian *et al.* (2014) quitinases e glucanases tiveram sua expressão durante o início da interação com *S. sclerotiorum*, é provável que após a sua atuação destas enzimas na parede celular a enzima esfingomielinase possa interagir com a membrana.

Como o gene da esfingomielinase foi descoberto durante o micoparasitismo com *F. Solani* acreditava-se que um desafio com o fungo pudesse causar redução dos sintomas

ocasionados pela infecção. Contudo o bioensaio com *Fusarium* não foi efetivo (dados não mostrados) pois ocorria o crescimento de hifas sobre a superfície foliar sem sinal infecção nas folhas destacadas.

Inicialmente, a principal hipótese para o mecanismo de ação da esfingomielinase é que esta poderia atuar na degradação da membrana dos fungos, mas os resultados mais promissores ocorreram nos desafios como as bactérias gram negativas *P. syringae pv tabaci* e *X. fastidiosa*.

Embora não tenha sido possível comprovar a atividade in vitro da esfingomielinase através do ensaio enzimático, talvez por questões de extração da proteína total que pode ter comprometido o estado nativo da enzima, ou mesmo a baixa concentração da enzima no extrato total; mas acreditamos que exista uma interação entre a proteína heteróloga expressa pelas plantas transgênicas com a membrana das bactérias testadas, que pode estar interferindo no processo de infecção bacteriana por um mecanismo semelhante ao que ocorre com os peptídeos antimicrobianos.

Em plantas, peptídeos antimicrobianos conhecidos como (PR12) defensinas, (PR13) tioninas e (PR14) proteínas de transferência de lipídios, fazem parte do sistema de defesa inata (NAWRROT *et al.*, 2014), assim como se tornaram uma das principais estratégias que vêm sendo utilizadas na busca de resistência a doenças causadas por fungos e bactérias (KHAN *et al.*, 2019; WALLY e PUNJA, 2010; KHALILUEV e SHPAKOVSKII, 2013). Nesses estudos, a atividade desses peptídeos ocorre por meio de uma interação com fosfolipídios, o que leva a alterações na integridade física do sistema de membranas, seguida de sua internalização, e interferência nos processos metabólicos celulares (ZASLOFF, 2002; THEVISSSEN *et al.*, 2007; NAWROT *et al.*, 2014).

Como os peptídeos antimicrobianos são encontrados praticamente em todos os seres vivos, desde microrganismos até humanos, acredita-se que essas moléculas sejam um componente universal da imunidade inata (MAHLAPUU *et al.*, 2016). Portanto, nos últimos anos, novos peptídeos sintéticos têm sido construídos com base em AMPs naturais com o objetivo de aperfeiçoar a atividade contra patógenos específicos. Neste contexto, o desenvolvimento de plantas GM demonstrou que a expressão dessas moléculas naturais ou artificiais desencadeia certo nível de resistência em diferentes espécies como, arroz (BUNDÓ *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2000), batata (OSUSKY *et al.*, 2000; GAO *et al.*, 2000), banana (CHAKRABARTI *et al.*, 2003; GHAG *et al.*, 2012), canola (VERMA *et al.*, 2012), citros

(BOSCARIOL *et al.*, 2006; CARDOSO *et al.*, 2010; FURMAN *et al.*, 2013; HAO *et al.*, 2016, HAO *et al.*, 2017), soja (BRAND *et al.*, 2012) fumo (FUKUTA *et al.*, 2012; JAYNES *et al.*, 1993, HUANG *et al.*, 1997; KOO *et al.*, 2002; YEVTUSHENKO *et al.*, 2005), tomate (ALAN *et al.*, 2004, BALAJI e SMART, 2012), trigo (RONG *et al.*, 2013).

Os esfingolípídios são componentes essenciais da membrana celular, mas também influenciam diretamente nos mecanismos de reconhecimento dos patógenos invasores. Um segundo mecanismo indireto para a enzima esfingomielinase, seria que esta pudesse atuar na clivagem de esfingolípídios da membrana do patógeno e levar à liberação de ceramida. Apesar da constituição da membrana de plantas e bactérias não ser formada por esfingomielina as bactérias gram negativas *P.syringae* e *X. fastidiosa* possuem lipopolissacarídeos como lípidios estruturais das membranas. Na literatura é relatado que estes lípídeos podem ser reconhecidos durante a interação planta patógenos como PAMPs e desencadear respostas celulares como a morte celular programada (TAKAHASHI *et al.*, 2009, LIANG *et al.*, 2003; ZIPFEL, 2014).

De acordo com Peer *et al.* (2010), a resposta de hipersensibilidade serve para limitar a propagação dos patógenos, que depende do tecido vivo durante a infecção. Contudo, com a ativação da morte celular, as células produzem sinais que ativam as resposta de defesa nas células adjacentes. Assim, o papel da esfingomielinase seria de gerar subprodutos, que podem atuar como mensageiros secundários na regulação de sinais intracelulares, desencadeando a ativação dos processos de defesa da planta.

**CAPÍTULO 2: OBTENÇÃO DE LARANJEIRA GM PARA EXPRESSAR
THASM VISANDO RESISTÊNCIA A DOENÇAS BACTERIANAS**

A CULTURA DA LARANJA

A planta de laranja doce é o fruto da laranjeira (*Citrus sinensis*) uma árvore pertencente à família das Rutaceae. Esta é originária do sul Asiático e foi introduzida no Brasil pelos portugueses durante a colonização e hoje é um dos frutos mais consumidos mundialmente. Atualmente, a laranja é cultivada em todas as regiões do país, embora a maior produção esteja situada em São Paulo e no triângulo mineiro, com uma área de 415.232 hectares (FUNDECITRUS, 2018).

A produção mundial de laranja em 2016 foi de 73 milhões de toneladas, a safra brasileira em 2016/2017 foi de 245 milhões de caixas com o Brasil, respondendo por 23 % da produção total (FAOSTAT, 2016). Na última década, a citricultura passou a ter um papel importante na economia brasileira (FRANCO, 2017) com o Brasil atingindo a liderança na produção mundial de suco de laranja na qual cerca de 98% da produção brasileira é destinada para exportação, gerando uma receita aproximada de US\$ 1,5 a US\$ 2,5 bilhões, e o restante dos frutos são para o consumo in natura (ERPEN *et al.*; 2018).

A citricultura mundial é responsável por grandes impactos socioeconômicos nos seus principais polos produtores. Neste cenário o Brasil aparece em ascensão e apesar de São Paulo, que é o principal produtor, ter observado um declínio na área plantada devido à disseminação de pragas e doenças e o elevado custo para o controle de fitopatógenos (NEVES *et al.*, 2010; ERPEN *et al.*, 2018), as safras atuais demonstram uma crescente expansão das áreas plantadas devido a pesquisas que abrange desde a adaptação ao clima e ao solo até técnicas de manejo para controle de doenças, incremento da produtividade e a qualidade dos frutos (FUNDECITRUS, 2017))

A cultura da laranjeira é afetada por diversas doenças. Dentre as causadas por fungos destacam-se a pinta-preta (*Guignardia citricarpa*), a verrugose (*Elsinoe* sp.), a melanose (*Diaporthe citri*), a rubelose (*Corticium salmonicolor*), a podridão floral (*Colletotrichum acutatum*) e a gomose causada por *Phytophthora* sp. Dentre as doenças causadas por vírus destaca-se a tristeza dos citrus causada por Citrus tristeza virus.

As doenças bacterianas são causadas principalmente por três patógenos que atuam em tecidos específicos e de maneiras diferentes (VOJNOV *et al.*, 2010). Dentre estas podemos citar *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, que invade o mesófilo através dos estômatos ou lesões da folha e causa a doença do cancro cítrico, *X. fastidiosa*, que é transmitida por insetos conhecidos

como cigarrinhas e se aloca no xilema das plantas, causando a clorose variegada dos citros e *Candidatus liberibacter asiaticus*, que é transmitida por psíldeos e se translocam no floema ocasionando o huanglongbing (ou greening) (BASSANEZI *et al.*, 2015).

BACTERIOSES NA CULTURA DE LARANJA

CANCRO CÍTRICO

O cancro cítrico é causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, possui origem asiática e, no Brasil, foi constatado pela primeira vez em 1957. A doença é de fácil disseminação, afetando todos as cultivares de citros, sendo que a principal forma de propagação da bactéria são as lesões residuais da planta afetada e pode ocorrer naturalmente através da água, chuva e vento, assim como por ação antrópica com o uso de ferramentas, equipamentos e introdução de mudas (BOCK *et al.*, 2005; GRAHAM *et al.*, 2004). Todos os cultivares de citros são susceptíveis ao cancro e a infecção da bactéria ocorre através de aberturas, pelos estômatos ou ferimentos na planta. Os sintomas do cancro podem ser observados nas folhas, caules e frutos. Inicialmente ocorre na região de penetração, no qual as bactérias liberam enzimas e degradam as células das plantas, ocasionando a morte da célula. A bactéria permanece viva nas margens das lesões em folhas e frutos e podem sobreviver nas lesões por até alguns anos (GOTWALD *et al.*, 2002). Os sintomas da doença são caracterizados por lesões necróticas de penetração e anéis cloróticos amarelos. Quando o ataque é severo ocorre a perda das folhas, diminuição da produtividade e qualidade dos frutos, tornando-os impróprios para comercialização.

No Brasil, o levantamento do Fundecitrus (2017b) relevou que o cancro cítrico está presente em 12,92% das áreas amostradas, presentes em todas as regiões do parque cítrico paulista e triângulo mineiro onde é verificado o crescimento da incidência da doença.

As principais estratégias para o controle do cancro são o controle químico com inseticidas para controlar o inseto minador do citros (*Phyllocnistis citrella*), indutores de resistência que ativam o sistema de defesa natural da planta e a aplicação de bactericidas a base de cobre, que forma uma camada protetora, evitando novas infecções (BEHLAU *et al.*, 2010), assim como práticas de manejo como o plantio de árvore certificadas livre de patógenos, a substituição de espécies cítricas por variedades mais resistentes e a redução da dispersão

bacteriana para pomares ao redor com quebra-ventos (BEHLAU *et al.*, 2007; CANTEROS, 2004; GRAHAM *et al.*, 2004).

CLOROSE VARIEGADA DOS CITRUS (CVC)

A bactéria *X. fastidiosa* é uma bactéria responsável por doenças em inúmeras espécies de plantas economicamente importantes. Esta bactéria foi descoberta em 1884 em áreas de cultivo de uva no sul da Califórnia, e relatada causando a clorose variegada dos citros (CVC) pela primeira vez no Brasil em 1987, onde rapidamente se tornou uma das doenças mais importantes que afetam produção de laranja doce (AZEVEDO *et al.*, 2016). A *X. fastidiosa* é uma bactéria fitopatogênica que afeta todas as variedades de citros disponíveis para comercialização. Naturalmente é encontrada limitada aos vasos do xilema de seus hospedeiros, bloqueando o movimento de água. Nas plantas hospedeiras, a bactéria é capaz de alternar entre dois estilos de vida: uma forma exploratória no qual bactérias aparentemente com baixa adesividade se movem ao longo da planta entre vasos do xilema e uma forma adesiva, que embora limitadas em sua capacidade de se mover dentro da planta, é adquirido de forma mais eficiente por insetos vetores (CASERTA *et al.*, 2017). A disseminação ocorre por vetores conhecidos como cigarrinhas (Hemíptera: Cicadellidae), que se alimentam da seiva nos vasos do xilema das plantas contaminadas (FADEL *et al.*, 2014). Os sintomas da doença são caracterizados pela escassez de água, produzida por agregados de bactérias e produção de polissacarídeos, causando a oclusão vascular do xilema (DE SOUZA *et al.*, 2003). Os sintomas da CVC manifestam-se em folhas, frutos e ramos. Em folhas, os primeiros sintomas são caracterizados por manchas cloróticas, esparsas e próximas as bordas foliares. Com o desenvolvimento da doença aparecem bolsas com goma na parte abaxial, que ao se romper produzem manchas de coloração bege. Os sintomas nos frutos surgem após os primeiros sintomas nas folhas e os tornam pequenos, endurecidos e com aumento no teor de acidez, o que os torna impróprios para produção do suco de laranja e comercialização dos frutos in natura.

A CVC está presente nas principais áreas citrícolas do país, em diferentes intensidades. No cinturão citrícola, o levantamento da Fundecitrus (2017b) confirmou a tendência de queda na incidência da CVC, com apenas 2,89% das plantas analisadas. A queda na incidência da doença reflete as ações propostas em leis, decretos e portarias, que visam impedir a entrada da bactéria em regiões livres da doença, assim como propostas de manejo, baseado em três estratégias:

utilização de mudas saudáveis, poda de ramos com sintomas iniciais em plantas com mais de dois anos e erradicação de plantas mais novas e controle das cigarrinhas.

HUANGLONGBING

Dentre as doenças que afetam a citricultura o Huanglongbing (HLB) é a doença mais grave que afeta todas as variedades de citros disponíveis para comercialização. A doença é causada pela bactéria gram-negativa *Candidatus liberibacter* sp., e foi primeiramente mencionada na China no final do século XIX. Nas Américas, não existiam relatos até o início do século XXI, quando foram detectados no Brasil, em 2004, no estado de São Paulo, e nos Estados Unidos, em 2005, na Flórida (BOVÉ e AYRES, 2007). Mais recentemente, várias espécies de *C. liberibacter* têm sido associadas a doenças em diversas culturas por todo o mundo (WANG *et al.*, 2017).

O HLB pode ser causado por três espécies de *C. Liberibacter*, *Candidatus asiaticus*, *Candidatus africanus* e *Candidatus americanus*. O mecanismo de transmissão da bactéria entre as plantas infectadas e plantas saudáveis ocorre através de enxertia ou por insetos da classe psíldeo (HAJERI *et al.*, 2014), particularmente, nas Américas a transmissão do HLB está predominantemente associado à *Candidatus. L. asiaticus*, transmitida pelo psíldeo asiático do citros (*Diaphorina citri*) (CHIYAKA *et al.*, 2012; HALL *et al.*, 2013) e na África do Sul por *Candidatus L. africanus* pelo psíldeo africano do citros (*Trioza erytreae*) (WANG *et al.*, 2017).

Embora as diferentes espécies de *C. Liberibacter* tenham diferentes vetores de transmissão, os sintomas causados pelas três bactérias em citros são semelhantes. Os primeiros sintomas aparecem cerca de seis meses, após a infecção e estão associados à colonização sistêmica da bactéria. Inicialmente, a bactéria coloniza os vasos do floema e impede a translocação dos fotoassimilados pelo corpo da planta, e as plantas infectadas apresentam os ramos amarelados, as folhas com manchas ao longo da nervura, amareladas de um lado do limbo e verdes do outro lado. O desenvolvimento da doença provoca um rápido declínio das árvores e ocorre a perda das folhas, que são substituídas por folhas pequenas, eretas e endurecidas. Os frutos que se desenvolvem apresentam uma forma assimétrica, redução de peso e tamanho, frequentemente apresentam sementes abortadas e os frutos caem antes da colheita. Os frutos que permanecem apresentam baixa qualidade, tornando-os não comercializáveis. (MONZO e STANSLY, 2017; WANG *et al.*, 2017)

No Brasil, o aparecimento das primeiras plantas com os sintomas aconteceu em 2004 e acabou se disseminando rapidamente, a incidência de laranjeiras com sintomas no cinturão citrícola em 2017 foi de 16,73% das plantas, correspondendo a um total 32 milhões de árvores infectadas (FUNDECITRUS, 2017b).

O controle do Huanglongbing é complicado devido ao longo período de incubação e o difícil diagnóstico. O combate à doença no Brasil está baseado no manejo fitossanitário proposto pelo FUNDECITRUS, (2017b). Embora as estratégias para controle esteja focado na prevenção da ocorrência de novas infecções o monitoramento e controle do psilídeo, assim como a inspeção e erradicação de plantas doentes, tem demonstrado ser um processo laborioso e com pouco efeito na redução da velocidade de progresso da doença (BELASQUE JUNIOR *et al.*, 2010). Como alternativas de controle do HLB, diversas estratégias estão sendo abordadas. Neste contexto o controle do vetor de transmissão é uma das principais medidas adotadas e embora diversos trabalho relatem a eficiência no controle do psilídeos, através de aplicações de inseticidas, o controle do inseto vetor não evita totalmente as infecções primárias (ASATO, 2018). A resistência induzida, especialmente a resistência sistêmica adquirida (SAR) tem demonstrado ser eficiente no controle de doenças bacterianas e fungicas de citros. Recentemente Hu *et al.* (2018) demonstrou que a injeção no xilema de plantas de moléculas ativadoras de SAR assim como alguns antibióticos, acarretou significativo controle do HLB, obtido pela supressão de *C. L. asiaticus*.

JUSTIFICATIVA

Os fungos da classe *Trichoderma* são mundialmente conhecidos pela sua atuação como agente de controle biológico. Recentes estudos moleculares possibilitaram avanços no entendimento sobre as enzimas secretadas por *Trichoderma* durante o processo de antagonismo aos fitopatógenos, assim como possibilitou a descoberta de novos genes para a transformação genética de plantas.

Em trabalho a ser publicado, já existe uma prova de conceito mostrando a eficiência da esfingomielinase em induzir resistência contra bactérias em plantas de tabaco GM. Isso indica que há um excelente potencial de uso desse gene em uma estratégia de geração de plantas resistentes a múltiplas doenças bacterianas. A expressão heteróloga deste gene em laranja poderá levar ao desenvolvimento de cultivares resistente.

OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi transformar geneticamente laranjeira (*Citrus sinensis*) para induzir resistência a bactérias fitopatogênicas

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir um vetor de expressão contendo gene da *esfingomielinase* sob o controle do promotor constitutivo 35S do *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV) e do marcador de seleção nptII
- Transformar geneticamente plantas de laranja via *A. tumefaciens* com o vetor pCSphingoNPTII
- Realizar bioensaios para avaliação de resistência das plantas a bactérias fitopatogênicas.

METODOLOGIA

CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO CONTENDO O GENE DE *ESFINGOMIELINASE*

A sequência do gene da *Esfingomielinase* obtida pelo GenBank (NCBI, 2014) acesso (JK840922) foi quimicamente sintetizada e clonada pela empresa Epoch Inc. (USA) no vetor pC3300GCHI sob o controle do promotor 35SCaMV. Após a clonagem do vetor de expressão o marcador de seleção glifosinato de amônio, presente no vetor original, foi substituído pelo gene *nptII*, contido no vetor pC2300, que confere resistência a canamicina, gerando o vetor pCSphingoNPTII.

TRANSFORMAÇÃO DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

O vetor pCSphingoNPTII foi transferido para a linhagem de *A. tumefaciens* EHA 105 por eletroporação como descrito por (LACORTE e ROMANO, 1998). A presença do vetor nas colônias foi confirmada por PCR com os primers Sphingo 973 F: (GCAGAAGCTCCAACCCATCT) e Sphingo 1344R: (AGCTGCTGATGAACCTGGAC), que irão amplificar uma sequência de 413pb, contida na região codificante do gene da esfingomielinase.

MATERIAL VEGETAL

Sementes de frutos maduros de laranjas (*C. sinensis*) cultivar “Pêra” foram extraídas, lavadas e secas por 24 horas. Depois de retirados seus tegumentos, foram desinfestadas em solução de hipoclorito (2,5%) durante 20 minutos. Após este período, as sementes foram lavadas três vezes com água destilada estéril e incubadas *in vitro* em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), à temperatura de 27° C. A incubação inicial durante 4-6 semanas foi realizada na ausência de luz, para germinação e alongamento do epicótilo. Posteriormente, as plantas foram transferidas para condições de fotoperíodo de 16 h,e após 10 dias, após foram utilizadas como explantes para a transformação genética.

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE LARANJA

A linhagem de *A. tumefaciens* EHA 105 contendo o vetor pCSphingoNPTII foi plaqueada em meio AB (CHILTON *et al.*, 1974), contendo os antibióticos 100 mg.L⁻¹ de rifampicina e 100 mg.L⁻¹ de canamicina. A cultura cresceu por 48 h à 28°C, e as células foram coletadas e ressuspendida na absorbância 0,8 à 600 nm. A suspensão bacteriana foi centrifugada e ressuspendida em meio de cultura MS líquido, contendo 1% de glicose e 100µM de acetoseringona.

Os explantes provenientes de segmentos de epicótilo foram imersos na solução bacteriana por um período de 20 minutos. Em seguida, foram secos à temperatura ambiente em papel filtro e transferidos para placas de Petri, com meio de cultura MS, contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose, 8 g.L⁻¹ ágar, pH 5.7 suplementado com os reguladores de crescimento propostos em (Tabela 2).

Tabela 2: Protocolos utilizados para a transformação genética de plantas.

NOME TRANSFORMAÇÃO	COCULTURA	REGENERAÇÃO	EXPLANTE
BAP	3 mg.L ⁻¹ BAP	3 mg.L ⁻¹ BAP	Epicótilos de plantas <i>in vitro</i>
CM3	2 mg.L ⁻¹ 2ip 2 mg.L ⁻¹ 2,4 D 1 mg.L ⁻¹ AIA	1 mg.L ⁻¹ BAP 0,5 mg.L ⁻¹ ANA	Epicótilos de plantas <i>in vitro</i>
LR1	1 mg.L ⁻¹ BAP 0,5 mg.L ⁻¹ ANA	3 mg.L ⁻¹ BAP	Epicótilos de plantas <i>in vitro</i>

Após o período de cocultivo, os explantes foram transferidos para o meio de cultura MS contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose, 8 g.L⁻¹ ágar, pH 5.7 e suplementado com canamicina 100 mg.L⁻¹ para a seleção de brotos transformados e cefotaxima 200 mg.L⁻¹ e timetin 100 mg.L⁻¹ para a inibição da *Agrobacterium*. As placas com os explantes foram incubadas em sala de crescimento a 26°C ± 2 no escuro para o processo de regeneração até o desenvolvimento de gemas adventícias. Após o desenvolvimento das gemas, os explantes foram cultivados em fotoperíodo de 16h e mantidos em repiques periódicos, até que as gemas se desenvolvessem e emitissem as primeiras folhas.

Os brotos desenvolvidos foram microenxertadas em plântulas laranja “Pêra” germinadas *in vitro*. Para a microenxertia, foram removidos os ápices dos porta enxerto e os brotos

provenientes da transformação foram enxertados. As plantas microenxertadas foram mantidas *in vitro* sob fotoperíodo de 16 h, a $26^{\circ}\text{C} \pm 2$. Após 45 dias, as plantas foram transferidas para vasos de terra e incubadas até a completa aclimatização para a condição ambiente da casa de vegetação.

RESULTADOS

A síntese e construção do cassete de expressão de *Thams* foi inicialmente realizada usando-se o vetor pCAMBIA3300 como base, que contém o gene *bar*, que confere tolerância ao herbicida glifosinato de amônio (GA). No entanto, o protocolo de transformação de laranja, geralmente utiliza o gene *nptII*, que confere tolerância a canamicina. Sendo assim, foi realizada uma digestão do pCAMBIA2301 com *XhoI* para retirar a região codificante de *bar* e substituí-la pela região codificante de *nptII* (FIGURA 15). Depois de inserido em células de *E. coli* linhagem XL1 Blue, sua presença foi confirmada através da liberação dos fragmentos 1117, 1350 e 1500 pb após a digestão com *PvuII* (FIGURA 6).

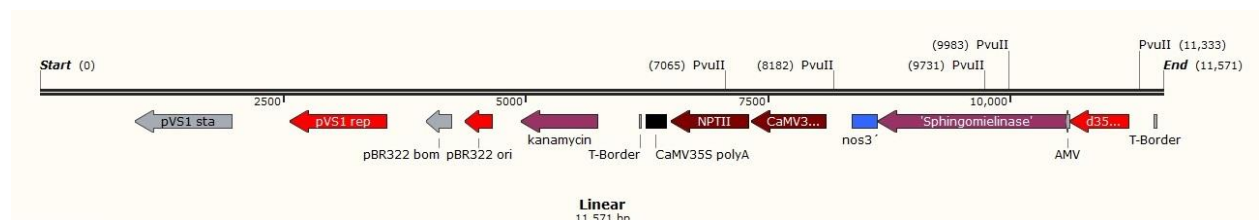


Figura 16.: Representação esquemática do vetor pCSphingoNPTII contendo o promotor *CaMV35S*, o terminador TNOS, o marcador de seleção *nptII*, e marcados os sítios de *PvuII*

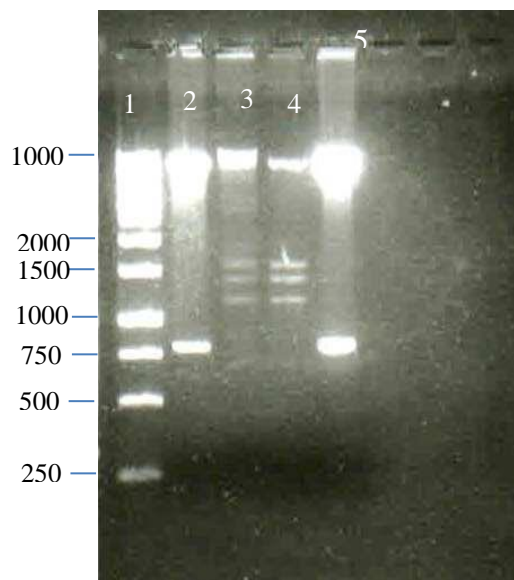


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose (1%) contendo amostras da digestão de colônias de *E. coli* transformadas com o vetor pCSphingoNPTII. Os números de 1 a 4 indicam as colônias transformadas. O marcador utilizado foi o 1 Kb ladder (Invitrogen). Os fragmentos liberados do vetor pela digestão com a enzima *PvuII* possuem 7303,1117, 1350 e 1500 pb.

Após a clonagem do vetor de expressão em *A. tumefaciens* e verificação do inserto (Figura 17), as plantas de laranja foram transformadas.



Figura 18: Eletroforese em gel de agarose (2%) contendo amostras do PCR das colônias de *Agrobacterium* transformadas com o pCSphingoNPTII que foi utilizado para transformar os segmentos do epicótilo de laranja. Os números de 1 a 5 indicam as colônias transformadas com o vetor. Os símbolos C+ e H₂O indicam respectivamente o vetor plasmidial e água (H₂O). O marcador utilizado foi o 100 pb dna ladder (Invitrogen). O fragmento amplificado é interno ao gene da esfingomilinaase e possui 413 pb.

Com o estabelecimento do protocolo de transformação as plantas de laranja germinadas *in vitro* foram utilizadas no processo de Cocultura. Após o processo de Cocultura, os explantes foram transferidos para o meio de cocultura, no qual passaram três dias e posteriormente a infecção foram transferidos para o meio de regeneração na presença do agente seletivo canamicina (100 mg.L⁻¹). Depois de uma etapa de indução de regeneração por 30 dias no escuro, os explantes regenerados (TABELA 3) foram transferidos para novo meio de regeneração até o desenvolvimento das brotações (FIGURA 19), a eficiência de regeneração geral foi 2,1% dos explantes iniciais.

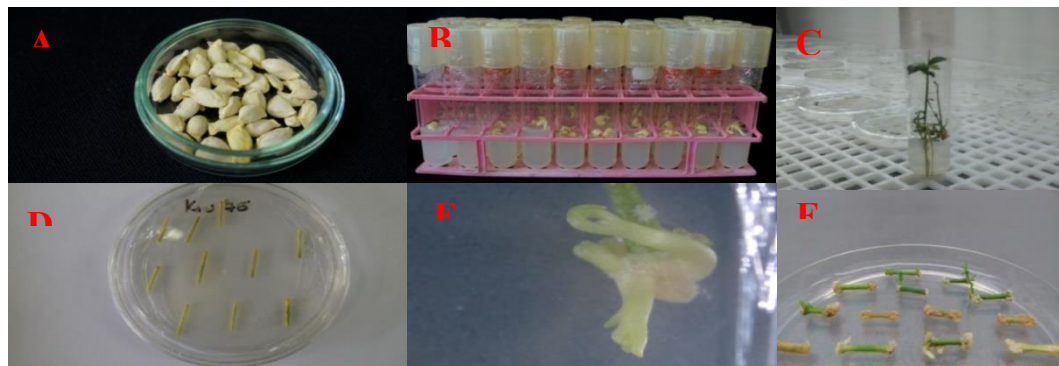


Figura 19.: Processo de regeneração de brotos em explantes de laranja, após a transformação por *Agrobacterium*. (A) Sementes de laranja retirada dos frutos e secas por 24 horas (B) Sementes de laranja em germinação (C) Plântulas de laranja em desenvolvimento que serão utilizados para Cocultura, (D) e (E) Explantes em meio de regeneração com seleção e (F).

Tabela 3: Explantes regenerados com diferentes meios de cultura na presença do agente seletivo.

	Numero total de explantes		
	Explantes iniciais	Explantes regenerados	Explantes Positivos
Cocultura 1 (CM3)	316	2	0
Cocultura 1 (BAP)	260	0	0
Cocultura 2 (CM3)	360	0	0
Cocultura 3 (BAP)	200	1	0
Cocultura 4 (BAP)	240	11	3
Cocultura 4 (CM3)	240	0	0
Cocultura 5 (BAP)	260	3	0
Cocultura 5 (CM3)	110	0	0
Cocultura 6 (BAP)	220	1	0
Cocultura 6 (LR1)	220	4	2
Cocultura 7 (BAP)	160	3	3
Cocultura 7 (LR1)	160	8	1
Cocultura 8 (BAP)	280	4	3
Cocultura 8 (LR1)	200	2	2
Cocultura 9 (BAP)	180	6	1
Cocultura 9 (LR1)	180	9	1
Cocultura 10 (BAP)	180	0	0
Cocultura 10 (LR1)	180	0	0
Cocultura 11 (BAP)	200	5	0
Cocultura 11 (LR1)	200	9	2
Cocultura 12 (BAP)	200	1	0
Cocultura 12 (LR1)	200	0	0
Cocultura 13 (BAP)	300	7	Há confirmar
Cocultura 13 (LR1)	240	5	Há confirmar

Para a confirmação da inserção do gene nos explantes regenerados foi realizado um PCR com os *primers* específicos do gene da esfingomielinase (Figura 20). Os brotos regenerados sob seleção, após a confirmação por PCR foram microenxertados (Figura 21) e mantidos *in vitro* para o desenvolvimento de raízes nos porta enxertos, A eficiência de transformação é de 0,47%.

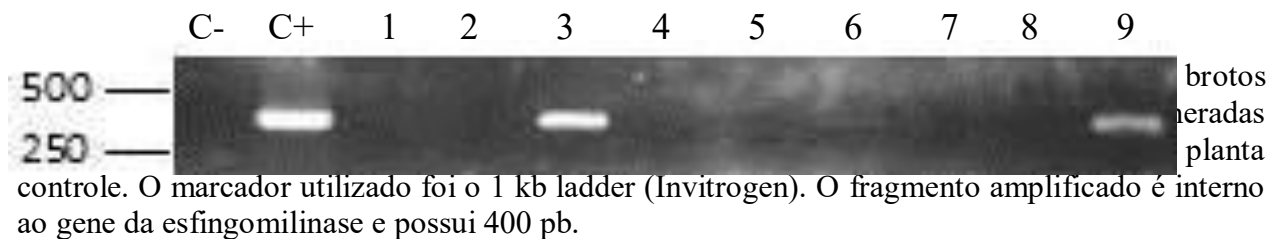


Figura 21: Processo de desenvolvimento e microenxertia dos brotos de laranja regenerados. (A) Explantes em meio de regeneração com seleção. (B) Microenxertia dos brotos regenerados em porta enxertos de laranja cultivados *in vitro* (C) Explantes microenxertados mantidos *in vitro* para o desenvolvimento de raízes nos porta enxertos.

Inicialmente, as plantas microenxertadas que apresentaram o desenvolvimento das raízes foram aclimatadas em casa de vegetação, no entanto, com o desenvolvimento das plantas novos ramos não transgênicos surgiram originados do “porta enxerto” e foram removidos, com a retirada dos novos ramos “ladrões” a planta parou de se desenvolver e entrou no processo de senescência, ocasionando sua morte.

Novas transformações foram realizadas e novos meios de cultura foram utilizados para o alongamento dos explantes. Assim que confirmada a presença do gene da esfingomielina nessas plantas, estas serão microenxertadas e aclimatadas em casa de vegetação.

DISCUSSÃO

Desde os primeiros trabalhos sobre transformação genética de citros mediada por *Agrobacterium*, descrito em PEÑA *et al.* (1995), observamos um progresso significativo nos últimos anos (GONG e LIU, 2013). A facilidade de obtenção de material vegetal e relativa simplicidade, tornou esse procedimento uma opção interessante, pois permite um planejamento de experimentos nos quais muitas etapas podem ser ajustadas para uma cultivar específica (ORBOVIC e GROSSER, 2014).

Para a transformação genética e seleção dos explantes obtidos neste estudo, foram utilizados como base os meios de cultura propostos por PEÑA *et al.*, 1995 e GHORBEL *et al.*, 2000. Contudo, durante o processo de transformação genética, foram feitas algumas modificações nos meios de cultura e a eficiência de regeneração do explantes. Apesar disso, foi observada uma oscilação na eficiência de transformação e a utilização de canamicina como agente de seleção não impediu o aparecimento de brotos não transformados (escapes).

Com o desenvolvimento das brotações transgênicas *in vitro*, surgiram novos desafios que foram alongar e enraizar o brotos GM obtidos. A indução de raízes *in vitro* em citros é relativamente difícil, e por este motivo, os brotos transgênicos da laranjeira devem ser enxertados (PEÑA *et al.*, 1995). Esta técnica requer um trabalho manual minucioso, pois além de posicionar corretamente os vasos condutores de ambas as estruturas, cavalo e cavaleiro, é necessário manter as duas partes unidas.

Apesar do desenvolvimento das raízes no cavalo possibilitar a transferência dos explantes para a casa de vegetação, com o desenvolvimento das raízes começam a surgir novas brotações a partir do porta-enxerto. O desenvolvimento de “ramos ladrões” no porta-enxerto ou cavalo, compete fortemente com o desenvolvimento do enxerto, tendo levado a entrar no processo de senescência. Assim um novo processo de enxertia *ex vitro* passa a ser uma alternativa para o desenvolvimento das plantas enxertadas *in vitro*.

As principais estratégias, via engenharia genética que vêm sendo utilizados na busca de resistência à patógenos de citros envolvem a introdução de genes que codificam proteínas relacionadas à ativação dos sistemas de defesa local, que atuam induzindo a apoptose das células infectadas ou pela ativação de uma resistência sistêmica (AZEVEDO *et al.*, 2006; BARBOSA-MENDES *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2013). Genes que codificam proteínas PRR'S foram

expressos em citros e estimularam o reconhecimento de PAMP's aumentando a resposta de defesa contra a infecção (MENDES *et al.*, 2010; SENDIN *et al.*, 2012).

Como forma de controle para o HLB, DUTT *et al.* (2015) realizaram a superexpressão do gene *AtNPR1* e verificaram uma resistência ao HLB com redução da severidade da doença e Hao *et al.* (2017) expressaram o gene da tionina endógeno de laranja modificada e observaram uma redução significativa nos sintomas do cancro cítrico ocasionado por *Xanthomonas citri*, e uma diminuição no crescimento bacteriano *C. Liberibacter asiaticus*.

Os resultados mostrados nessa tese apontam para uma nova possibilidade a ser explorada, visando-se engenheirar resistência a bactérias patogênicas em citros. O processo de transformação e fenotipagem de laranjeira é muito demorado e as plantas obtidas deverão ser desafiadas no futuro para que essa hipótese seja testada.

CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento de novas tecnologias foi possível além de elucidar os mecanismos moleculares por trás do processo de biocontrole exercido pelo *Trichoderma*, a clonagem de um gene diferencialmente expressos durante o antagonismo.

Com a construção do vetor para a transformação genética mediada por *Agrobacterium* foi possível gerar plantas de fumo que expressam constitutivamente o gene da esfingomielinase.

Neste estudo não foi possível comprovar a hipótese que a esfingomielinase pudesse atuar diretamente na inibição de fungos patogênicos. Os bioensaios das plantas GM com o fungo *S. sclerotiorum* não demonstrou resistência.

As plantas transgênicas de tabaco geradas contendo o gene da esfingomielinase demonstraram uma redução dos sintomas ocasionados por *Pseudomonas syringae* e uma redução na quantificação de *Xillela fastidiosa*.

Com o estabelecimento de um sistema de transformação genética de laranjeira foi possível obter plantas transgênicas de citros expressando o gene da esfingomielinase.

O enraizamento de plântulas de citros é um fator limitante, isto requer a microenxertia dos explantes gerados. O desenvolvimento de raízes nos porta enxertos permite a transferência das plantas para o solo, contudo um melhor desenvolvimento da parte aérea das plantas enxertadas é necessário.

PERSPECTIVAS

Para a continuação desse trabalho propõe-se:

- Realizar análises moleculares de *Southern blot* para detecção da integração da esfingomielinase nas linhagens de laranja GM
- Avaliar por RT-PCR o acúmulo do transcrito do gene da esfingomielinase
- Realizar bioensaios nas linhagens de laranja GM para avaliar a resistência contra bactérias fitopatogênicas,
- Investigar alterações metabólicas relacionadas ao mecanismo de defesa utilizando sequenciamento de última geração RNA-seq.
- Comparar o perfil de lipídios das plantas transgênicas em relação às selvagens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAZADEH, R.; ZAMANI, M.; MOTALLEBI, M.; MORADYAR, M.; JAHROMI, Z. M. Co-transformation of canola by chimeric chitinase and *tlp* genes towards improving resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, 32(144), 2016.

ALAN, A. R.; BLOWERS, A.; EARLE, E. D. Expression of a magainin-type antimicrobial peptide gene (MSI-99) in tomato enhances resistance to bacterial speck disease. **Plant Cell Reports**, 22:388–396, 2004.

ALI, S.; GANAI, B. A.; KAMILI, A. N.; BHAT, A. A.; MIR, Z. A.; BHAT, J. A.; TYAGIA, A.; ISLAM, S. T.; MUSHTAQ, M.; YADAV, P.; RAWAT, S.; GROVER, A. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. **Microbiological Research**, 212–213:29–37, 2018.

ANDRADE, S. A. de; MURAKAMI, M. T.; CAVALCANTE, D. P.; ARNI, R. K.; TAMBOURGI D. V. Kinetic and mechanistic characterization of the Sphingomyelinases D from *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, 47:380–386, 2006.

ASATO, F.P. Eficiência da pulverização de inseticida na borda dos talhões no manejo do Huanglongbing. Fundo de defesa da citricultura. **Dissertação de mestrado**, 2018.

AZEVEDO, F. A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; ALMEIDA, W.A.B.; SCHINOR, E.H.; PIO, R.; BARBOSA, J.M.; GUDETTI-GONZALEZ, S.; CARRER, H.; LAM, E. Genetic transformation of ‘Rangpur’ lime (*Citrus limonia* Osbeck) with the bO (bacterio-opsin) gene and initial evaluation for *Phytophthora nicotianae* resistance. **Plant Molecular Biology Reporter**, 24:185-196, 2006.

BAILEY, B.A.; BAE H.; STREM, M. D.; ROBERTS, D. P.; THOMAS S. E. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. **Planta**, 224:1449–1464, 2006.

BALAJI, V.; SMART, C. D. Over-expression of snakin-2 and extensin-like protein genes restricts pathogen invasiveness and enhances tolerance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). **Transgenic Research**, 21:23–37, 2012.

BARANSKI, R. KLOCKE, E.; NOTHNAGEL, T. Chitinase CHIT36 from *Trichoderma harzianum* enhances resistance of transgenic carrot to fungal pathogens. **Journal Phytopathology**, 156: 513-521, 2008

BARBOSA-MENDES, J.M.; MOURÃO FILHO, F.A.; BERGAMIN, A.F.; HARAKAVA, R.; BEER, S.V.; MENDES, B.M.J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. *Hamlin* with hrpN gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. **Scientia horticultrae**, 122:109-115, 2009

BASSANEZI, R.B., SILVA JUNIOR, G.S., FEICHTENBERGER, E., BELASQUE JUNIOR, J., BEHLAU, F., WULFF, N.A. Doenças dos Citros. In: AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A. Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas. 5. ed. Ouro Fino: **Agronômica Ceres**, 271-306. 2015.

BEHLAU, F.; BELASQUE JÚNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A; LEITE JUNIOR, R.P. Incidência e severidade de cancro cítrico em laranja ‘Pêra Rio’ sob condições de controle químico e proteção com quebra-vento. **Fitopatologia Brasileira**. 32:311-317, 2007

BELASQUE Jr.; J.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P.; BASSANEZI, R. B. AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. Controle do huanglongbing no estado de São Paulo, Brasil, **Citrus Research & Technology**, 31(1): 53-64, 2010.

BERBERT, P.S. Expressão do gene da esfingomielinase de *Trichoderma* em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). UNB, **Dissertação mestrado**, 2015

BHAT, R.A.; PANSTRUGA, R. Lipid rafts in plants. **Planta**, 223: 5–19, 2005.

BIEBERICH, E. Integration of glycosphingolipid metabolism and cell-fate decisions in cancer and stem cells: review and hypothesis. **Glycoconjugate Journal**, 21:315–327, 2004.

BOCK, C. H., PARKER, P. E., AND GOTTWALD, T. R. Effect of simulated wind-driven rain on duration and distance of dispersal of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from canker-infected citrus trees. **Plant Disease**. 89:71-80, 2005

BOLAR, J. P.; NORELLI, J. L.; WONG, K.-W.; HAYES, C. K.; HARMAN, G. E.; ALDWINCKLE, H. S. Expression of endoquitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. **Phytopathology** 90:72-77, 2000.

BORNER G.H.H.; SHERRIER, D;J;, WEIMAR, T.; MICHAELSON, L.V.; HAWKINS, N;D.; MACASKILL, A.; NAPIER, J.A.; BEALE, M.H.; LILLEY, K.S.; DUPREE, P. Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts. **Plant Physiology**, 137: 104–116, 2005.

BOSCARIOL, R. L.; MONTEIRO, M.; TAKAHASHI, E. K.; CHABREGAS, S. M.; VIEIRA, M. L. C.; VIEIRA, L. G. E.; PEREIRA, L. F. P.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; CARDOSO, S. C.; CHRISTIANO, R. S. C. *Attacin* A gene from *Tricloplusia ni* reduces susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* ‘Hamlin’. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 131: 530–536. 2006

BOUTROT, F.; ZIPFEL, C. Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, 55:257–86, 2017.

- BOVÉ, J.M.; AYRES A.J. Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo state: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. **IUBMB Life**, 59: 346–354, 2007.
- BRAND, G. D.; MAGALHÃES, M. T. Q.; TINOCO, M. L. P.; ARAGÃO, F. J. L.; NICOLI, J.; KELLY, S. M.; COOPER, A.; BLOCH, C. JR. Probing protein sequences as sources for encrypted antimicrobial peptides. **PLOS ONE**, 7(9), 2012.
- BROTMAN, Y.; KAPUGANTI, J. G.; VITERBO, A. Quick guide - Trichoderma. **Magazine Current Biology**, 20(9):390–391, 2010.
- BUNDÓ, M.; MONTESINOS, L.; IZQUIERDO, E.; CAMPO, S.; MIEULET, D.; GUIDERDONI, E.; ROSSIGNOL, M.; BADOSA, E.; MONTESINOS E.; SEGUNDO, B. S.; COCA M. Production of cecropin A antimicrobial peptide in rice seed endosperm. **BMC Plant Biology**, 14(102), 2014.
- CANTEROS, B.I. Management of citrus canker in Argentina. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, 2:696-704, 2004.
- CARDOSO, S. C.; BARBOSA-MENDES, J. M.; BOSCARIOL, R. L.; CHRISTIANO, R. S. C.; BERGAMIN FILHO, A.; VIEIRA, M. L. C.; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) expressing the attacin A gene for resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plant Molecular Biology Reporter**, 28:185-192, 2010
- CARPENTER, M. A.; STEWART, A.; HIDGWAY, H. J. Identification of novel *Trichoderma hamatum* genes expressed during mycoparasitism using subtractive hybridisation. **FEMS Microbiology Letters**, 251:105–112, 2005
- CASERTA R., SOUZA-NETO R. R., TAKITA M. A., LINDOW S. E. DE SOUZA A. A. Ectopic expression of *Xylella fastidiosa* *rpfF* conferring production of 1 diffusible signal factor in transgenic tobacco and citrus alters pathogen behavior and reduces disease severity. **Molecular Plant Microbe Interactions**. 30(11):866-875 2017.
- CEASAR, S. A.; IGNACIMUTHU S. Genetic engineering of crop plants for fungal resistance: role of antifungal genes. **Biotechnol Letters**, 34:995–1002, 2012.
- CHAKRABARTI, A.; GANAPATHI, T.R.; MUKHERJEE, P.K.; BAPAT, V.A. MSI-99, a magainin analogue, imparts enhanced disease resistance in transgenic tobacco and banana. **Planta**, 216(4): 587-596, 2003.
- CHEN, X.; BARNABY, J. Y.; SREEDHARAN, A.; HUANG, X.; ORBOVIC, V.; GROSSER, J. W.; WANG, N. DONG, X. SONG, W. Y. Over-expression of the citrus gene CtNH1 confers resistance to bacterial canker disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 84:115-122, 2013
- CHEN, X.; BARNABY, J. Y.; SREEDHARAN, A.; HUANG, X.; ORBOVIC, V.; GROSSER, J. W.; WANG, N. DONG, X. SONG, W. Y. Over-expression of the citrus gene CtNH1 confers

resistance to bacterial canker disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 84:115-122, 2013.

CHILTON, M. D.; CURRIER, T. C.; FARRAND, S.K.; BENDICH, A. J.; GORDON, M.P.; NESTER, E. W. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage not detected in crown gall tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 71 (9): 3672-3676, 1974.

CHIYAKA, C.; SINGERA, B. H.; HALBERT, S. E.; MORRIS, Jr. J. G.; BRUGGENA, A. H. C. Modeling Huanglongbing transmission within a citrus tree. **PNAS**, 109(30): 12213–12218, 2012.

CLARKE, C. J.; SNOOK, C. F.; TANI, M.; MATMATI, N.; MARCHESINI, N.; HANNUN, Y. A. The Extended Family of Neutral Sphingomyelinases. **Biochemistry**, 45(38): 11247- 11256, 2006

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. **Approved Standard-Ninth Edition**. 32(2), 2012

CUI, H.; XIANG, T.; ZHOU, J.M. Plant immunity: a lesson from pathogenic bacterial effector proteins. **Cellular Microbiology**, 11(10):1453–1461, 2009

CUNHA, N. B. DA.; COBACHO, N. B.; VIANA, J. F.C.; LIMA, L. A.; SAMPAIO, K. B.O.; DOHMS, S.; S.M.; FERREIRA, A. C.R.; FUENTE-NÚÑEZ, C. DE LA.; COSTA, F. F.; FRANCO, O. L.; DIAS, S. C. The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. **Drug Discovery Today**, 22(2), 2017.

DANA, M. M, PINTOR-TORO, J.A. CUBERO, B. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. **Plant Physiology**. 142:722-730, 2006

DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, 411, 2001.

DE SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; COLETTA-FILHO, H. D.; CALDANA, C.; YANAI, G. M.; MUTO, N. H.; DE OLIVEIRA, R. C.; NUNES, L. R.; MACHADO, M. A. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. **FEMS Microbiology Letter**, 237:341–353, 2004.

DIAS-LOPES, C.; NESHICH, I. A. P.; NESHICH, G.; ORTEGA1, J. M.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLORTEGU1, C.; MOLINA, F.; FELICORI1, L. Identification of New Sphingomyelinases D in Pathogenic Fungi and Other Pathogenic Organisms. **FEBS Letters**, 584:1887–1894, 2013

DIM, C.; EZENEKWE, U. Does agriculture matter for economic development? Empirical evidence from Nigeria. **Journal of Finance & Economics**, 1(1):61-77, 2013.

DUAN, C.-G.; WANG, C.-H.; GUO H.-S. Application of RNA silencing to plant disease resistance. **Silence**, 3:5, 2012

DUTT, M.; BARTHE, G.; IREY, M.; GROSSER, J. Transgenic citrus expressing an Arabidopsis npr1 gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening) **PLOS ONE**, 10(9): 2015.

ERPEN, L.; MUNIZ, F. R.; MORAES, T. de S.; TAVANO, E. C. da R. Análise do cultivo da laranja no Estado de São Paulo de 2001 a 2015. **Revista iPecege**, 4(1):33-43, 2018.

FADEL, A. L.; STUCHI, E. S.; CARVALHO, S. A.; FEDERICI, M. T. COLETTA-FILHO, H. D. Navelina ISA 135: A cultivar resistant to citrus variegated chlorosis. **Crop protection**. 64:115-121, 2014.

FAO, The role of agriculture in the development of least-developed countries and their integration into the world economy, **Food and Agriculture Organization**. Rome, 2002

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations (Acesso em 10 de junho de 2018) <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

FISCHER, R.A.; BYERLEE, D.; EDMEADES. G.O. Crop yields and global food security: will yield increase continue to feed the world? **ACIAR: Australian Centre for International Agricultural Research**, 158, 2014.

FLORES-DÍAZ, M.; MONTURIOL-GROSS, L.; NAYLOR, C.; ALAPE-GIRÓN A.; FLIEGERD A. Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as virulence factors. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 80 (3), 2016.

FRANCO, A.S.M. O suco de laranja brasileiro no mercado global. **Análise conjuntural**, 38:11-12, 2016.

FUKUTA, S.; KAWAMOTO, K.; MIZUKAMI, Y.; YOSHIMURA, Y.; UEDA, J.; KANBEI M. Transgenic tobacco plants expressing antimicrobial peptide bovine lactoferricin show enhanced resistance to phytopathogens. **Plant Biotechnology**, 29:383–389, 2012.

FUNDECITRUS. FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA Inventário de árvores do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro: retrato dos pomares em março de 2017, Araraquara,SP:**Fundecitrus**, 2017a 95 p.

FUNDECITRUS. FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Estimativa da safra de laranja 2018/19 do cinturão citrícola de são paulo e triângulo/sudoeste mineiro. Araraquara, SP: **Fundecitrus**, 2018

FUNDECITRUS. FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Levantamento de doenças dos citros: HLB, CVC e Cancro cítrico no cinturão citrícola de são paulo e triângulo/sudoeste mineiro 2017. Araraquara,SP: **Fundecitrus** 2017.b 56 p.

FURMAN, N.; KOBAYASHI, K.; ZANEK, M. C.; CALCAGNO, J.; GARCIA, M. L.; MENTABERRYA A. Transgenic sweet orange plants expressing a dermaseptin coding sequence show reduced symptoms of citrus canker disease. **Journal of Biotechnology**, 2013.

GAO, A. G.; HAKIMI, S. M.; MITTANCK, C. A.; WU, Y.; WOERNER, B. M.; STARK, D. M.; SHAH, D. M.; LIANG, J.; ROMMENS. C.; M.;T. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. **Nature Biotechnology**, 18, 2000.

GHAG, S. B.; SHEKHAWAT, U. K. S.; GANAPATHI, T. R. Petunia floral defensins with unique prodomains as novel candidates for development of *Fusarium* wilt resistance in transgenic banana plants. **PLOS ONE**, 7(6), 2012.

GHORBEL, R.; DOMÍNGUEZ, A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Tree Physiology**, 20:1183–1189, 2000.

GONG, X.-Q.; LIU, J.-H. Genetic transformation and genes for resistance to abiotic and biotic stresses in Citrus and its related genera. **Plant cell tissue organ culture**, 113:137–147, 2013.

GONI, F.M.; ALONSO, A. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. **FEBS letters**, 531(1):38-46, 2002.

GORELIK, A.; ILLES, K.; HEINZ L; X.; SUPERTI-FURGA, G.; NAGAR, B. Crystal structure of mammalian acid sphingomyelinase. **Nature communications**, 2016.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J.H.; SCHUBERT, T.S. Citrus canker: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**. 2002

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; CUBERO, J.; ACHOR, D. S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular plant pathology**, 5(1), 1–15, 2004.

GROVER, A.; GOWTHAMAN, R. Strategies for development of fungus-resistance transgenic plants. **Current Science**,84(3)330-340, 2003.

HACQUARD, S.; SPAEPEN, S.; GARRIDO-OTER, R.; SCHULZE-LEFERT, P. Interplay between innate immunity and the plant microbiota. **Annual Review of Phytopathology**, 55:565–89,2017.

HALL, D. G.; RICHARDSON, M. L.; AMMAR, EL-D.; HALBERT, S. E. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 146: 207–223, 2013.

- HANADA, K. Sphingolipids in infectious. **Japanese Journal of. Infectious Diseases**, 58:131-148, 2005
- HAO, G.; STOVER, E.; GUPTA, G. Overexpression of a modified plant thionin enhances disease resistance to citrus canker and huanglongbing (HLB). **Frontiers in Plant Science**, 7, 2016.
- HAO, G.; ZHANG, S.; STOVER E. Transgenic expression of antimicrobial peptide D2A21 confers resistance to diseases incited by *Pseudomonas syringae* pv. tabaci and *Xanthomonas citri*, but not *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **PLOS ONE**, 12(10), 2017
- HAREJI, S.; KILLINY, N. E. L.; MOHTAR, C.; DAWSON, W. O. DOWDA, S. *Citrus tristeza virus*-based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease (Huanglongbing). **Journal of Biotechnology**, 176:42-19, 2014
- HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, 158:17–25, 2012.
- HILL, B. L.; PURCELL, A.H. Acquisition and redention of *Xylella fastidiosa* by efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. **Phytopathology**, 85(2):209-212, 1994.
- HIROOKA, T.; ISHII, H. Chemical control of plant diseases. **Journal of General Plant Pathology**, 79:390–401, 2013.
- HORSCH, R. B.; FRY, J.; HOFFMANN, N.; NEIDERMEYER, J.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T. Leaf disc transformation. In: GELVIN, S. B.; SCHILPEROORT, R. A.; VERMA D. P. S.: **Plant Molecular Biology Manual**, 1988.
- HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant disease: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, 87:1-7, 2003
- HU, J.; JIANG, J.; WANG, N. Control of citrus huanglongbing (HLB) via trunk injection of plant activators and antibiotics. **Phytopathology**.108(2):186-195. 2018.
- HUANG, Y.; NORDEEN, R. O.; OWENS, M. DI, L. D.; MCBEATH, J. H. Expression of an engineered Cecropin gene cassette in transgenic tobacco plants confers disease resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci*. **Molecular Plant Pathology**, 7:494-499, 1997.
- HYAKUMACHI, M. Research on biological control of plant diseases: present state and perspectives. **Journal of General Plant Pathology**. 79:435–440, 2013.
- ISLAM, A. Fungus resistant transgenic plants: strategies, progress and lessons learnt. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, 16 (2): 117-138, 2006.

KOO, J. C.; CHUN H. J.; PARK, H. C.; KIM, M. C.; KOO, Y. D.; KOO, S. C.; OK, H. M.; PARK, S. J.; LEE, S.-H.; YUN, D.; LIM, C. O.; BAHK, J. D.; LEE S. Y.; CHO, M. J. Over-expression of a seed specific hevein-like antimicrobial peptide from *Pharbitis nil* enhances resistance to a fungal pathogen in transgenic tobacco plants. **Plant Molecular Biology**, 50: 441–452, 2002.

JAYNES, J. M.; NAGPALA, P.; DESTÉFANO-BELTRFIN, L. HUANG, J. H.; KIM, J.; DENNY, T.; CETINER, S. Expression of a Cecropin B lytic peptide analog in tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Science**, 89: 43-53, 1993.

JENKINS, R.W.; CANALS, D.; HANNUN Y.A. Roles and Regulation of Secretory and Lysosomal Acid Sphingomyelinase **Cell signaling**, 21(6): 836–846. 2009

JOHAL, G. S.; BRIGGS, S. P. Reductase activity encoded by the *hm1* disease resistance gene in maize. **Science**, 258(5084):985-987, 1992.

JONES, D. A.; THOMAS, C. M.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; BALINT-KURTI, P. J.; JONES. J. D. G. Isolation of the tomato *cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging **Science**, 266, 1994.

KHALILUEV, M. R.; SHPAKOVSKII, G. V. Genetic engineering strategies for enhancing tomato resistance to fungal and bacterial pathogens. **Russian Journal of Plant Physiology**, 60(6):721–732, 2013.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas and Xanthomonas. **Phytopathology**, 60:969-976, 1970

KHAN, R. S.; IQBAL, A.; MALAK, R.; SHEHRYAR, K.; ATTIA, S.; AHMED, T.; KHAN, M. A.; ARIF, M.; MII, M. Plant defensins: types, mechanism of action and prospects of genetic engineering for enhanced disease resistance in plants. **3 Biotech**, 9:192, 2019.

KITATANI, K.; BALDYS, J. I.; HANNUN, Y. A. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. **Cell signaling**, 20(6): 1010–1018, 2008.

KOURELIS, J.; HOORN, R. A.L. VAN DER. Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. **The Plant Cell**, 30:285–299, 2018.

KUBICEK, C. P.; HERRERA-ESTRELLA, A.; SEIDL-SEIBOTH, V.; MARTINEZ, D. A. DRUZHININA, I. S.; THON, M.; ZEILINGER, S.; CASAS-FLORES, S.; HORWITZ, B. A.; MUKHERJEE, P. K.; MUKHERJEE, M.; KREDICS, L.; ALCARAZ, L. D.; AERTS, A.; ANTAL, Z.; ATANASOVA, L.; CERVANTES-BADILLO, M. G.; CHALLACOMBE, J.; CHERTKOV, O.; MCCLUSKEY, K.; COULPIER, F.; DESHPANDE, N.; DÖHREN, H. V.; EBBOLE, D. V.; ESQUIVEL-NARANJO, E. U.; FEKETE, E.; FLIPPHI, M.; GLASER, F.; ÓMEZ-RODRÍGUEZ, E.; GRUBER, S.; HAN, C.; HENRISSAT, B.; HERMOSA, R.; HERNÁNDEZ-OÑATE, M.; KARAFFA, L.; KOSTI, I.; CROM, S. L.; LINDQUIST, E.; LUCAS, S.; LÜBECK, M.; LÜBECK, P.S.; MARGEOT, A.; METZ, B.; MISRA, M.;

NEVALAINEN, H.; OMANN, M.; PACKER, N.; PERRONE, G.; URESTI-RIVERA, E.; SALAMOV, A.; SCHMOLL, M.; SEIBOTH, B.; SHAPIRO, H.; SUKNO, S.; TAMAYO-RAMOS, J. A.; TISCH, D.; WIEST, A.; WILKINSON, H. H.; ZHANG, M.; COUTINHO, P. C.; KENERLEY, C. M. MONTE, E.; BAKER, S. E.; GRIGORIEV I. V. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. **Genome Biology**, 12, 2011.

KUMAR, V.; PARKHI, V.; KENERLEY, C. M.; RATHORE, K. S. Defense related gene expression and enzyme activities in transgenic cotton plants expressing an endoquitinase gene from *Trichoderma virens* in response to interaction with *Rhizoctonia solani*. **Planta**, 230:277–291, 2009.

LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de Vetores para Agrobacterium. In: BRASILEIRO, A. C. M, CARNEIRO, V. T. C. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Embrapa, Brasília. 51-64. 1998.

LAPIN, D.; ACKERVEKEN, G. VAN DEN. Susceptibility to plant disease: more than a failure of host immunity. **Trends in Plant Science**, 18(10), 2013.

LIANG, H.; YAO, N.; SONG, J.T.; LUO, S.; LU, H.; GREENBERG, J. T Ceramides modulate programmed cell death in plants. **Genes & development**, 17:2636–2641, 2003.

LIU, P.G., YANG, Q. Identification of genes with a biocontrol function in *Trichoderma harzianum* mycelium using the expressed sequence tag approach. **Research Microbiology**, 156(3):416-423,2005.

LORITO, M.; WOO, S. L.; HARMAN, G. E.; MONTE, E.; Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. **Annual review of phytopathology**, 48: 395-417, 2010.

LYNCH, D. V.; DUNN, T. M. An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. **New Phytologist**,161: 677–702, 2004.

MACEYKA, M.; PAYNE, S. G.; MILSTIEN, S.; SPIEGEL, S. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis **Biochimica et Biophysica Acta**, 1585:193-201, 2002.

MAHLAPUU, M.; HÅKANSSON, J.; RINGSTAD, L.; BJÖRN, C. Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 6(194), 2016.

MANSY, S. S. Membrane Transport in Primitive Cells. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, (2), 2010.

MARCELINO, L. H. GROOSI DE SÁ, M.F. Detecção e análise de proteínas pela técnica de western blot. In: BRASILEIRO, A. C. M, CARNEIRO, V. T. C. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Embrapa, Brasília. 2 ed.:360-376, 2015.

- MARKHAM, J. E.; LYNCH, D. V.; NAPIER, J. A.; DUNN, T. M.; CAHOON, E. B. Plant sphingolipids: function follows form. **Current Opinion in Plant Biology**, 16:350–357, 2013.
- MARTIN, G. B.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; CHUNWONGSE, J.; FRARY, A.; GANAL, M. W.; SPIVEY, R.; WU, T.; EARLE, E. D.; TANKSLEY, S. D. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. **Science**, 262(5138):1432-1436, 1993.
- MCDONALD, B.A.; STUKENBROCK, E.H. Rapid emergence of pathogens in agro-ecosystems: global threats to agricultural sustainability and food security. **Philosophical transactions B**, 371, 2016.
- MENDES, B. M. J.; CARDOSO, S. C.; BOSCARIOL-CAMARGO, R. L.; CRUZ, R. B.; MOURÃO FILHO, F. A. A; BERGAMIN FILHO, A. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice Xa21 gene. **Plant Pathology**, 59:68-75, 2010
- MILHAS, D.; CLARKE, C.J.; HANNUN, Y. A. Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: Implications for bioactive sphingolipids. **FEBS Letters**, 584:1887–1894, 2010.
- MILLER, J. H. Experiments in molecular genetics. New York: Cold Spring Harbor; 1972.
- MONTERO-BARRIENTOS, M.; HERMOSA, R.; CARDOZA, R. E.; GUTIÉRREZ, S.; NICOLA S, C.; MONTE, E. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum hsp70* gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. **Journal Plant Physiology**, 167:659–665, 2010.
- MONZO, C.; STANSLY, P. A. Economic injury levels for Asian citrus psyllid control in process oranges from mature trees with high incidence of huanglongbing, **PLOS ONE**, 12(4), 2017.
- MOOSA, A.; FARZAND, A.; SAHI, S. T.; KHAN, S. A. Transgenic expression of antifungal pathogenesis related proteins against phytopathogenic fungi – 15 years of success. **Israel Journal of Plant Sciences**, 2017.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, E.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**. 15: 473-497, 1962.
- NAGPURE, A.; CHOUDHARY, B.; GUPTA, R. K. ANAND NAGPURE, BHARTI CHOUDHARY, AND RAJINDER K. GUPTA Chitinases: in agriculture and human healthcare. **Critical Reviews Biotechnology**, Early Online: 1–18, 2013.
- NARAYANAVARI, S. A.; SRITHARAN, M.; HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Multiple leptospiral sphingomyelinases (or are there?). **Microbiology**, 158: 1137–1146, 2012.

NAWROT, R.; BARYLSKI, J.; NOWICKI, G.; BRONIARCZYK, J.; BUCHWALD, W.; GOŹDZICKA-JÓZEPIAK, A. Plant antimicrobial peptides. **Folia Microbiologica**, 59:181–196, 2014.

NEJAT, N.; ROOKERS, J.; MANTRI, N.; CAHILL, D.M. Plant-pathogen interactions: toward development of next-generation disease-resistant plants. **Critical Reviews in biotechnology**, 37(2): 229–237, 2017.

NELSON, R. International plant pathology: past and future contributions to global food security. **The American Phytopathological Society**, 2019 .

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F.F; CRESSONI, F.; KALAKI, R.B. O retrato da citricultura brasileira. Markestrat: Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia, **Citrus BR**, 2010.136p

OMAR, A. A.; MURATA, M. M.; EL-SHAMY, H. A.; GRAHAM, J. H.; GROSSER, J. W. Enhanced resistance to citrus canker in transgenic mandarin expressing Xa21 from rice. **Transgenic Research**, 27:179–191, 2018.

OMOROGIUA, O; ZIVKOVIC, J.; ADEMOH, F.; The role of agriculture in the economic development of Nigeria. **European Scientific Journal**, 10(4):133-147, 2014

ORBOVIĆ, V., & GROSSER, J. W. Citrus transformation using juvenile tissue explants. **Agrobacterium Protocols**, 245–257, 2014.

OSUSKY, M.; ZHOU, G.; OSUSKA, L.; HANCOCK, R. E.; KAY, W. W.; MISRA S. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. **Nature Biotechnology**, 18, 2000.

PANDOLFI, V.; NETO, J.R.C.F.; DA SILVA, M. D.; AMORIM, L.L.B.; WANDERLEY-NOGUEIRA, A. C.; DE OLIVEIRA SILVA, R. L.; KIDO, E. A.; CROVELLA, S.; ISEPPON, A.M.B. Resistance (R) genes: applications and prospects for plant biotechnology and breeding. **Current Protein and Peptide Science**, 18(4): 323-334, 2017.

PEER, M.; STEGMANN, M.; MUELLER, M. J.; WALLER F. *Pseudomonas syringae* infection triggers de novo synthesis of phytosphingosine from sphinganine in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, 584:4053–4056, 2010.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUARÉZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J. A.; NAVARRO, N. D.V. L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, 104:183-191, 1995.

PERROTTA, C.; CERVIA, D.; PALMA, C. DE.; ASSI, E.; PELLEGRINO, P.; BASSI, M. T.; CLEMENTI, E. The emerging role of Acid Sphingomyelinase in autophagy. **Apoptosis**, 20:635–644, 2015.

PRETTY, J., SUTHERLAND W.J.; JILL AUBURN, J.A.; BAULCOMBE, D.;JEFFREY BENTLEY, M B.; KATRINA BROWN, S. B.;BURKE, J.;CAMPBELL, H.;CHEN, K.;CROWLEY, E.;CRUTE, I.;DOBBELAERE, D.;EDWARDS-JONES, G.; FUNES-MONZOTE, F.;GODFRAY, H.C.J.;GRIFFON M.;GYPMANTISIRI, P.;HADDAD, L.;HALAVATAU, S.; HERREN, H.; HOLDERNESS M., IZAC, A.M.; JONES, M.; KOOHAFKAN, P, LAL, R.;LANG, T.; MCNEELY, J.; MUELLER, A.;NISBETT, N.;NOBLE, A.;PINGALI, P.;PINTO, Y.;RABBINGE. R.;RAVINDRANATH, N. H.;ROLA, A.;ROLING, N.;SAGE, C.;SETTLE, W.; SHA, J. M.; SHIMING, L.; SIMONS, T.; SMITH, P.; STRZEPECK, K.; SWAINE, H.; TERRY , E. TOMICH , T.P. TOULMIN, C.; TRIGO, E.; TWOMLOW, S.; VIS, J. K. WILSON, J.; PILGRIM S. The top 100 questions of importance to the future of global agriculture. **International journal of agricultural sustainability**, 8(4), 2010.

ROLLIN-PINHEIRO, R.; SINGH, A.; BARRETO-BERGTER, E.; DEL POETA, M. Sphingolipids as targets for treatment of fungal infections. **Future medicinal chemistry**, 8(12):1469–1484, 2016.

RONG, W.; QI, L.; WANG, J.; DU L.; XU H.; WANG A. ZHANG Z. Expression of a potato antimicrobial peptide *SN1* increases resistance to take-all pathogen *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in transgenic wheat. **Functional Integrative Genomics**, 13:403–409, 2013.

SAMOLSKI, I.; LUIS, A.; VIZCAÍNO, J. A.; MONTE, E. SUÁREZ, M. B. Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plants, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide microarray **BMC Microbiology**, 9:217, 2009.

SCHERM, B., SCHMOLL, M., BALMAS, V., KUBICEK, C.P., MIGHELI, C. Identification of potential marker genes for *Trichoderma harzianum* strains with high antagonistic potential against *Rhizoctonia solani* by a rapid subtraction hybridization approach. **Current Genetics**, 55(1):81-91, 2008.

SCHUCHMAN, E. H. Acid sphingomyelinase, cell membranes and human disease: Lessons from Niemann–Pick disease. **FEBS Letters**, 584:1895–1900, 2010.

SELS, J.; MATHYS, J.; CONINCK, B. M.A. DE.; CAMMUE, B. P.A.; DE BOLLE M. F.C. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, 46:941–950, 2008.

SENDIN, L.N. FILIPPONE,M.P.; ORCE,I.G. RIGANO,L. ENRIQUE, R. PEÑA, L. VOJNOV, A.A.; MARANO,M,R, CASTANARO,A.P. Transient expression of pepper Bs2 gene citrus limon as an approach to evaluate its utility for management of citrus canker disease. **Plant pathology**, 61:648-657, 2012.

SETTEN, R. L.; ROSSI, J. J.; HAN, S.-P. The current state and future directions of RNAi- based therapeutics. **Nature Reviews**, 2019.

SHARMA, P.; SHARMA, M.; SRIVASTAVA, M. Heterologous expression and characterization of purified partial endochitinase (*ech-42*) isolated from *Trichoderma harzianum*. **African Journal of Biotechnology**, 13(21):2159-2156, 2014.

SILVA, M. S.; ARRAES, F. B. M.; CAMPOS, M. DE A.; GROSSI-DE-SA, M.; FERNANDEZ, D.; CÂNDIDO, E. DE S.; CARDOSO, M. H.; FRANCO, O. L.; GROSSI-DE-SA, M. F. Potential biotechnological assets related to plant immunity modulation applicable in engineering disease-resistant crops. **Plant Science**, 270:72–84, 2018.

SINGH, D.; AMBROISE, A.; HAICOUR, R.; SIHACHAKR, D.; RAJAM, M. V. Increased resistance to fungal wilts in transgenic eggplant expressing alfalfa glucanase gene. **Physiology Molecular Biology Plants**, 20(2):143-150, 2014.

SINHA, R.; SHUKLA, P. Antimicrobial peptides: recent insights on biotechnological interventions and future perspectives. **Protein & Peptide Letters**, 26:79-87, 2019

SMITH, E. L.; SCHUCHMAN, EDWARD H. The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases **The FASEB Journal**, 22, 2008.

STEINDORFF, A. S.; SILVA, R. N.; COELHO, A. S. G.; NAGATA, T.; NORONHA, E. F.; ULHOA, C.J. *Trichoderma harzianum* expressed sequence tags for identification of genes with putative roles in mycoparasitism against *Fusarium solani*. **Biological Control**, 2012.

SUÁREZ, B.; REY M.; CASTILLO, P.; MONTE, E. LOBELL, A. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematicidal activity. **Applied Microbiology Biotechnology** 65:46–55, 2004.

TAKAHASHI, Y.; BERBERICH, T.; KANZAKI, H.; MATSUMURA, H.; SAITOH, H.; KUSANO, T.; TERAUCHI R. Serine palmitoyltransferase, the first step enzyme in sphingolipid biosynthesis, is involved in nonhost resistance. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 22(1): 31–38, 2009.

THEVISSSEN, K.; KRISTENSEN, H. H.; THOMMA, B. P.H.J.; CAMMUE, B. P.A.; FRANÇOIS I. E.J.A. Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. **Drug Discovery Today**,12(21/22), 2007.

TROIAN, R. F.; STEINDROFF, A. S.; RAMADA, M. H. S.; ARRUDA, W.; ULHOA, C. J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall degrading enzymes genes. **Biotechnology Letters**, 36(10): 2095-2101, 2014.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERS, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, 44:135–62, 2006.

VAN SCHIE, C. C. N.; TAKKEN, F. L.W. Susceptibility Genes 101: How to be a good host. **Annual Review of Phytopathology**, 52:51–81, 2014.

- VERMA, S. S.; YAJIMA, W. R.; RAHMAN, M. H.; SHAH, S.; LIU, J.-J.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M.; KAV, N. N. V. A cysteine-rich antimicrobial peptide from *Pinus monticola* (PmAMP1) confers resistance to multiple fungal pathogens in canola (*Brassica napus*). **Plant Molecular Biology**, 79:61–74, 2012.
- VIEIRA, P. M. COELHO, A. S. G. STEINDORFF, A. S. SIQUEIRA, S. J. L.; SILVA, R. DO N.; ULHOA, C. J. Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during growth on cell wall of *Fusarium solani* as a tool for biotechnological application. **BMC Genomics**, 14:177, 2013.
- VINALE, F. SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTIC, E. L.;MARRA, R., WOO, S. L.; LORITO, M. *Trichoderma* plant pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, 40:1–10, 2008.
- VOJNOV, A. A.; AMARAL, A. M.; DOW, J. M.; CASTAGNARO, A. P.; MARANO, M. R. Bacterial causing important diseases of citrus utilize distinct modes of pathogenesis to attack a common host. **Applied Microbiology Biotechnology**. 87:467-477, 2010.
- WALLY, O.; JAYARAJ, J.; PUNJA Z. Comparative resistance to foliar fungal pathogens in transgenic carrot plants expressing genes encoding for chitinase, β -1,3-glucanase and peroxidase. **European Journal Plant Pathology**, 123:331–342, 2009.
- WALLY, O.; PUNJA, Z. K. Genetic engineering for increasing fungal and bacterial disease resistance in crop plants. **GM Crops**, 1(4):199-206, 2010.
- WANG, N.; PIERSON, E. A.; SETUBAL, J. C.; XU, J. LEVY, J. G.; ZHANG, Y.; LI, J.; RANGEL, L. T.; MARTINS JR. J. The *Candidatus Liberibacter*–Host interface: insights into pathogenesis mechanisms and disease control. **Annual Review Phytopathology**. 55:451–82, 2017
- WANG, W.; YANG, X.; TANGCHAIBURANA, S.; NDEH, R.; MARKHAM, J. E.; TSEGAYE, Y.; DUNN, T. M.; WANG, G. L.; BELLIZZI, M.; PARSONS, J. F.; MORRISSEY, D.; BRAVO, J. E.; LYNCH, D. V.; XIAOA, S. An Inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, 20:3163–3179, 2008.
- WIT, P. J. G. M. de. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular molecular life sciences**, 64:2726 – 2732, 2007.
- WORRALL, D.; G. C.K.Y.; HETHERINGTON, A. M. Sphingolipids, new players in plant signaling, **TRENDS in Plant Science**, 8(7),2003.
- YEVTUSHENKO, D. P.; ROMERO, R.; FORWARD, B. S.; HANCOCK, R. E.; KAY, W. W.; MISRA, S. Pathogen-induced expression of a cecropin A-melittin antimicrobial peptide gene confers antifungal resistance in transgenic tobacco. **Journal of Experimental Botany**, 56, (416):1685–1695, 2005.

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**; 10(10):1150-1158, 2014.

YU, H.; ZEIDAN Y. H.; WU, B. X.; JENKINS, R. W.; FLOTTE, T .R.; HANNUN, Y. A.; VIRELLA-LOWELL, I. Defective acid sphingomyelinase pathway with *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, 41:367–375, 2009.

ZAIDI, S. S. A.; MUKHTAR, M. S.; MANSOOR, S. Genome editing: targeting susceptibility genes for plant disease resistance. **Trends in Biotechnology**, 36(9), 2018

ZASLOFF M Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature** 415:389-395, 2002.

ZHANG, J.; KHAN, S. A.; HECKE, D. G.; BOCK, R. Next-generation insect-resistant plants: RNAi-mediated crop protection. **Trends in Biotechnology**, 35(9), 2017.

ZHOU, Y.-F.; METCALF, M. C.; GARMAN, S. C.; EDMUNDS, T.; QIU, H.; WEI, R. R. Human acid sphingomyelinase structures provide insight to molecular basis of Niemann–Pick disease. **Nature communications**, 2016.

ZIPFEL, C. Plant pattern-recognition receptors. **Trends in Immunology**, 35(72), 2014.