



Desafios na obtenção de resistência à giberela em trigo através de silenciamento gênico por higs

Eduardo André Roesler¹, Renata Gabriela Schroeder¹
Elene Yamazaki Lau^{2(*)}, Ana Karla Machado Wood³
Maria Imaculada Pontes Moreira Lima²
Casiane Salete Tibola², Ana Lídia Variani Bonato²
Caroline Ann Sparks³, Kostya Kanyuka³
Carolina Cardoso Deuner¹, José Maurício Cunha Fernandes²
Kim Hammond-Kosack³

¹Universidade de Passo Fundo, Rodovia BR 285, Km 292,7, CEP 99052-900, Passo Fundo, RS. 2Embrapa Trigo, Rodovia BR 285, Km 294, Caixa Postal 78, CEP 99050-970, Passo Fundo, RS. 3Rothamsted Research, Harpenden, AL5 2JQ, Reino Unido.

(*)Autora para correspondência:
elene.yamazaki-lau@embrapa.br

A giberela de trigo, causada principalmente pelo fungo *Fusarium graminearum*, é uma das doenças mais importantes desta cultura. Os sintomas da doença incluem branqueamento das espiguetas, aristas arqueadas, manchas marrons na gluma ou na ráquis, e grãos esbranquiçados, enrugados, chochos, ásperos e róseos. Além de prejudicar a produção e a qualidade dos grãos, a presença do patógeno pode contaminá-los com micotoxinas, prejudiciais à saúde humana e animal. O uso de cultivares resistentes é um dos pilares do manejo integrado, necessário para reduzir os impactos desta doença. No entanto, a resistência à giberela é quantitativa, muitas vezes ligada a características agronômicas indesejáveis. Atualmente, não há cultivares suficientemente resistentes para conter a doença em anos epidêmicos, com tempo chuvoso e quente. Uma estratégia promissora para o controle da doença é a técnica chamada *Host Induced Gene Silencing* (HIGS) (Koch et al., 2013), baseada no processo de RNA de interferência (RNAi). Nessa abordagem, uma construção gênica que expressa um RNA de fita dupla (dsRNA) do gene alvo no patógeno é introduzida na planta. O dsRNA é cli-

vado, gerando pequenos RNAs, que levam à degradação dos transcritos complementares, silencian- do genes importantes para o desenvolvimento da doença. Estudos anteriores mostraram que HIGS pode conferir resistência a *F. graminearum* em ce- vada, por meio do silenciamento dos genes *Cyp51A*, *Cyp51B* e *Cyp51C*, envolvidos na produção de ergos- terol, constituinte da membrana celular dos fun- gos (Koch et al., 2013), e em trigo, por meio do silenciamento do gene *Chs3b*, uma quitina sintase, que sintetiza a quitina, um componente estrutural da parede celular dos fungos, impor- tante para a patogenicidade (Cheng et al., 2015). Os genes *Tri5* e *Tri6* são importantes na biossíntese de micotoxinas tricotecenos (Kimura et al., 2007), e são potenciais alvos. Neste trabalho, o objetivo foi avaliar a resistência a *F. graminearum* de plantas de trigo contendo duas construções gênicas: uma construção visava os genes *Cyp51a*, *Cyp51b*, *Cyp51c*, *Tri5* e *Tri6* (RNAi-Cyp51-Tri), e a outra, o gene *Chs3b* (RNAi-Chs3b).

A cultivar de trigo BRS Guamirim, moderada- mente resistente à giberela, foi geneticamente modifi- cada com as construções RNAi-Cyp51-Tri e

RNAi-Chs3b em Rothamsted Research, no Reino Unido, por meio de biobalística. A expressão das construções gênicas foi controlada pelo promotor da ubiquitina de milho, que confere altos níveis de expressão em monocotiledôneas, e pelo terminador *nos*. Foram analisadas 17 linhagens na geração T2 ou T3, das quais 3 com a construção RNAi-Cyp51-Tri, 12 com a RNAi-Chs3b e 2 nulas, além dos controles Bobwhite (suscetível) e BRS Guamirim. Foram utilizados dois vasos por genótipo inoculado, além de dois com BRS Guamirim não inoculado, cada vaso com quatro plantas. Doze espigas foram inoculadas, conforme Lima (2014), com 20 µl da solução contendo $5 * 10^4$ conídios/ml de *F. graminearum* (isolado CML3066). A avaliação dos sintomas foi realizada diariamente durante o período de incubação, e após, em intervalo de 2 a 4 dias até o controle não inoculado alcançar o estádio de grão em massa mole. Foi obtida a severidade real, contando-se as espiguetas com sintomas em relação ao total, e calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) com base na severidade. Os grãos de dez das espigas inoculadas foram pesados e avaliados quanto à porcentagem de grãos giberelados, e foram analisados quanto à micotoxina deoxinivalenol (DON) via método ELISA. A expressão dos genes de *F. graminearum* nas espigas de trigo com construções RNAi-Chs3B e RNAi-Cyp51-Tri foi verificada por PCR em tempo real: o RNA foi extraído e o cDNA sintetizado a partir de duas espigas inoculadas das diferentes linhagens, incluindo os controles. A análise de expressão dos genes *Chs3b*, *Cyp51A*, *Cyp51B* e *Tri5* foi realizada utilizando-se o método da quantificação relativa. As médias de severidade final (SF), AACPD, porcentagem de grãos giberelados (GG), peso de grãos (PG) e de expressão relativa foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). O teste post hoc de Wilcoxon com o valor p ajustado pelo método de Bonferroni foi aplicado para comparar as linhagens e os controles.

Os sintomas de giberela, caracterizados pelo branqueamento das espiguetas, foram observados aos 4 dias após a inoculação (dai), com exceção de duas linhagens, HIGS57 (RNAi-Cyp51-Tri) e HIGS09 (RNAi-Chs3b), nas quais foram visíveis aos 5 dai. Não houve sintomas no controle BRS Guamirim não inoculado, enquanto os controles inoculados [Bobwhite, BRS Guamirim, HIGS19 (nula) e HIGS35 (nula)] mostraram sintomas consistentes, indicando a eficácia da inoculação (Tabela 1). Bobwhite e BRS Guamirim tiveram alta severidade aos 24 dai

(98,0% e 72,9%, respectivamente). A SF média foi de 74,8%, com coeficiente de variação (CV) de 41,1%. As linhagens RNAi-Cyp51-Tri apresentaram SF entre 54,1% e 94,8% e, nas linhagens RNAi-Chs3b, entre 63,2% e 86,6%. Os valores para AACPD foram de 837,3 para Bobwhite e 591,2 para BRS Guamirim, ambos inoculados, com média do ensaio de 610,6 e CV de 46,1%. As linhagens RNAi-Cyp51-Tri apresentaram AACPD entre 458,2 a 837,3 e, nas linhagens RNAi-Chs3b, variou de 357,2 e 767,8. Com exceção de BRS Guamirim não inoculado, os outros genótipos não diferiram significativamente de BRS Guamirim inoculado.

A média de GG foi de 54,82%, com CV de 43,1%; Bobwhite apresentou 75,6% de GG, e BRS Guamirim teve 48,8%. Entre as linhagens RNAi-Cyp51-Tri, a GG variou de 42,5% (HIGS23) a 68,3% (HIGS56). HIGS49 e HIGS05 foram as linhagens RNAi-Chs3b com menor (42,7%) e maior (68,3%) média de GG, respectivamente. HIGS19 (nula) teve média de 72,0%. BRS Guamirim inoculado diferiu significativamente apenas de BRS Guamirim não inoculado. O PG foi afetado, com reduções de 72% em HIGS19 e em HIGS56 (RNAi-Cyp51-Tri) e de 75% em HIGS05 (RNAi-Chs3b), em comparação a BRS Guamirim não inoculado (média de 1,532 g). BRS Guamirim inoculado teve redução de 59%. A linhagem menos afetada foi HIGS23 (RNAi-Chs3b), com 0,771 g, com redução de 49%. Nenhuma linhagem diferiu estatisticamente de Bobwhite e de BRS Guamirim inoculados.

Altos níveis de DON foram registrados, com média de 74.380,9 µg/kg. Bobwhite e BRS Guamirim inoculados apresentaram 127.690 µg/kg e 53.455 µg/kg, respectivamente, enquanto que, nas linhagens HIGS23 (RNAi-Cyp51-Tri) e HIGS09, HIGS13 e HIGS51 (RNAi-Chs3b), os níveis variaram de 33.625,0 µg/kg a 53.102,5 µg/kg, sendo inferiores aos de BRS Guamirim inoculado. Por serem amostras únicas, não foi possível aplicar testes estatísticos.

Quanto à expressão gênica de *F. graminearum* durante a infecção, *Cyp51A* teve redução significativa de 65% e de 68% na expressão em HIGS56 e em HIGS23, em relação a BRS Guamirim inoculado. Apesar de alguma propensão à redução na expressão de *Cyp51B* e de *Tri5* em relação aos controles inoculados, esta não foi significativa. *Chs3b* tendeu a ter menor expressão nas plantas transgênicas do que nos controles, sendo que, em HIGS17, foi significativamente menor do que em HIGS19 (nula), com redução de 56%. A diminuição

Tabela 1. Médias e erro padrão de variáveis relacionadas ao efeito da inoculação de *Fusarium graminearum* (isolado CML3066) em linhagens de trigo oriundas da cultivar BRS Guamirim contendo as construções gênicas RNAi-Cyp51-Tri e RNAi-Chs3b.

Genótipo	N ⁽¹⁾	SF ⁽²⁾ (%)	AACPD ⁽³⁾	GG ⁽⁴⁾ (%)	PG ⁽⁵⁾ (g)
HIGS01 Chs3b	8	89,5 ± 5,5	751,4 ± 68,1	61,9 ± 2,5	0,617 ± 0,03
HIGS05 Chs3b	9	94,8 ± 3,3	744,8 ± 50,9	68,3 ± 5,0	0,379 ± 0,04
HIGS08 Chs3b	10	82,0 ± 9,8	707,0 ± 96,3	59,8 ± 8,4	0,517 ± 0,09
HIGS09 Chs3b	10	71,8 ± 9,0	594,5 ± 85,8	45,4 ± 6,2	0,747 ± 0,07
HIGS13 Chs3b	9	69,8 ± 12,5	554,2 ± 105,8	46,3 ± 8,5	0,603 ± 0,08
HIGS17 Chs3b	10	70,1 ± 7,6	612,1 ± 78,0	46,8 ± 4,6	0,730 ± 0,09
HIGS49 Chs3b	10	79,0 ± 6,4	661,2 ± 71,1	42,7 ± 2,8	0,678 ± 0,05
HIGS51 Chs3b	10	54,1 ± 11,6	394,9 ± 85,8	64,2 ± 9,9	0,513 ± 0,11
HIGS52 Chs3b	9	87,6 ± 5,1	710,4 ± 57,8	66,8 ± 4,6	0,705 ± 0,05
HIGS58 Chs3b	10	91,5 ± 3,7	723,1 ± 82,1	65,1 ± 3,0	0,443 ± 0,04
HIGS60 Chs3b	10	75,2 ± 6,0	625,1 ± 68,8	43,6 ± 3,6	0,635 ± 0,05
HIGS61 Chs3b	10	82,4 ± 4,2	770,8 ± 47,9	48,5 ± 3,2	0,561 ± 0,04
HIGS19 (nula)	10	86,6 ± 9,6	624,1 ± 66,8	72,0 ± 6,6	0,419 ± 0,05
HIGS23 Cyp-Tri	7	77,1 ± 12,3	577,4 ± 96,6	42,5 ± 6,9	0,771 ± 0,11
HIGS56 Cyp-Tri	10	86,5 ± 6,3	840,5 ± 71,5	68,3 ± 4,9	0,426 ± 0,10
HIGS57 Cyp-Tri	7	63,2 ± 8,0	507,7 ± 39,1	56,0 ± 4,3	0,578 ± 0,10
HIGS35 (nula)	10	66,6 ± 9,4	459,8 ± 63,6	53,6 ± 8,1	0,757 ± 0,09
Bobwhite	10	98,0 ± 2,0	763,9 ± 73,8	75,6 ± 2,6	0,689 ± 0,05
BRS Guamirim	10	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,532 ± 0,09
BRS Guamirim inoculado	10	72,9 ± 9,2	593,8 ± 84,4	48,8 ± 3,6	0,627 ± 0,07
Média geral		74,8	610,6	53,8	0,647
CV ⁽⁶⁾ (%)		41,1	46,1	43,1	51,0

⁽¹⁾ Número de repetições de cada tratamento.

⁽²⁾ Severidade final.

⁽³⁾ Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença.

⁽⁴⁾ Porcentagem de grãos giberelados.

⁽⁵⁾ Peso de grãos por espiga,

⁽⁶⁾ Coeficiente de variação.

da expressão indica que as construções gênicas estão silenciando estes genes no patógeno. Diferentemente, Koch et al. (2013) obtiveram quase 100% de redução nos transcritos dos genes *Cyp51*, assim como redução dos sintomas em folhas destacadas de cevada. Espigas de trigo transgênico contendo três construções gênicas separadas, inoculadas artificialmente e naturalmente, apresentaram silenciamento de *Chs3b* entre 40% e 60%, com aumento na resistência a *F. graminearum* (Cheng et al., 2015).

Conclui-se que as construções gênicas RNAi-

-Cyp51-Tri e RNAi-Chs3b reduziram a expressão de *Cyp51A* e de *Chs3b* em duas e em uma linhagens transgênicas de trigo BRS Guamirim, respectivamente. No entanto, apesar de uma leve tendência de superioridade em alguns dos parâmetros estudados, as linhagens não apresentaram melhorias significativas quanto a SF, AACPD, GG e PG. Estudos adicionais são necessários para confirmar se siRNAs estão sendo produzidos nestas plantas, para analisar os níveis de expressão dos genes alvo ainda não verificados, e para testar mais eventos e diferentes isolados do fungo.

Referências

- CHENG, W.; SONG, X.S.; LI, H.P.; CAO, L.H.; SUN, K.; QIU, X.L.; XU, Y.B.; YANG, P.; HUANG, T.; ZHANG, J.B.; QU, B.; LIAO, Y.C. Host-induced gene silencing of an essential chitin synthase gene confers durable resistance to *Fusarium* head blight and seedling blight in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, v.13, p.1335-1345, 2015.
- KOCH, A.; KUMAR, N.; WEBER, L.; KELLER, H.; IMANI, J.; KOGEL, K.H. Host- induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase- encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.110, p.19324-19329, 2013.
- KIMURA, M.; TOKAI, T.; TAKAHASHI-ANDO, N.; OHSATO, S.; FUJIMURA, M. Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.71, p.2105-2123, 2007.
- LIMA, M.I.P.M. **Protocolo usado na Embrapa Trigo para caracterizar o Tipo I e Tipo II de resistência genética à giberela em trigo.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2014. 5p. (Embrapa Trigo. Comunicado técnico, 345).