

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA - FAV**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO TRANSIENTE DE GENES CANDIDATOS À  
RESISTÊNCIA A PATÓGENOS EM TABACO**

**JÚLIA MARIA SILVA MARTINS**

**BRASÍLIA - DF  
2022**

JÚLIA MARIA SILVA MARTINS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO TRANSIENTE DE GENES CANDIDATOS À  
RESISTÊNCIA A PATÓGENOS EM TABACO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Banca Examinadora da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária como exigência final para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Michelle Souza Vilela

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Miranda Brasileiro

**BRASÍLIA - DF  
2022**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO TRANSIENTE DE GENES CANDIDATOS À  
RESISTÊNCIA A PATÓGENOS EM TABACO**

**JÚLIA MARIA SILVA MARTINS**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO SUBMETIDO À FACULDADE DE  
AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA,  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE ENGENHEIRO  
AGRÔNOMO.**

**APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA EM 25/08/2022**

**BANCA EXAMINADORA**

*Michelle S. Vilela*

---

**MICHELLE SOUZA VILELA, Dr<sup>a</sup>. Universidade de Brasília  
Professora da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – UnB  
(ORIENTADORA) CPF: 919.623.401-23; e-mail: michellevilelaunb@gmail.com**

*Ana Cristina*

---

**ANA CRISTINA MIRANDA BRASILEIRO, Dr<sup>a</sup>. Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia  
(COORDINADORA) CPF: 343.420.281-15; e-mail: ana.brasileiro@embrapa.br**

*Antônio Alves de O. Júnior*

---

ANTÔNIO ALVES DE OLIVEIRA JÚNIOR, Universidade de Brasília  
Doutorando da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – UnB  
(EXAMINADOR) CPF: 701.080.381-14; e-mail: agrounb.antonio@gmail.com



---

PEDRO SOUZA BERBERT, Dr. Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, UnB  
(EXAMINADOR) CPF: 013.739.481-08; e-mail: psberbert@gmail.com

BRASÍLIA - DF  
AGOSTO / 2022

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me guiado e abençoado por toda a minha jornada e me auxiliado a perceber a minha real vocação, aquilo que faz meus olhos brilharem.

À toda a minha família por ser o meu porto seguro. Agradeço especialmente a minha mãe, ao meu irmão, a minha avó, ao meu avô e a minha prima Ingrid por terem me ouvido explicando, do nada, conceitos e curiosidades agronômicas, e por terem sido cuidadosos e respeitado meu espaço quando eu estava tão atarefada que achava que não aguentaria mais. Amo muito vocês. Agradeço enormemente ao meu pai por ter sido a primeira pessoa a me encorajar a entrar na área que amo. Saudades.

Agradeço também às minhas amigas, Laryssa, Lays e Rebeca, com quem compartilhei sonhos e que cresceram comigo em muitos aspectos desde o Ensino Fundamental e Médio, e me ouviram repetindo durante essa jornada até a faculdade que amo usar jaleco, ter aulas de laboratório, biologia e saídas para o campo. Agradeço também aos amigos que fiz na faculdade, especialmente à Giullia, Samara, João e Luiz, com quem compartilhei risadas, conhecimentos, lágrimas e os mais diversos momentos. Vocês foram os presentes que a agronomia me deu, e quero levá-los para a vida toda. Agradeço também ao Igor, que sempre esteve ao meu lado, mesmo quando eu não me dava conta, e sempre acreditou em mim e me incentivou a buscar o meu melhor. Você é incrível.

Sou grata à Universidade de Brasília, por ter expandido a minha visão de mundo, fomentando sempre o desejo de ser parte ativa da sociedade e lutar pelos meus ideias e sonhos. Também sou muito grata aos meus professores, por terem me guiado e transmitido conhecimento, incentivando sempre a buscar mais e ir além. Agradeço de coração principalmente a minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Michelle Souza Vilela e ao Dr. José Ricardo Peixoto, grandes mestres, que foram capazes de falar sobre seus conhecimentos com tanto amor que me fizeram amar mais ainda o melhoramento de plantas, mostrando que mais do que a teoria, a prática e vivência é essencial.

Agradeço à minha também orientadora, Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Miranda Brasileiro, e à Dr<sup>a</sup>. Patrícia Messemberg Guimarães, que me acolheram e viram em mim potencial para agregar mais à equipe. Sou grata a toda a equipe do LPP3, Embrapa Cenargen, que foram sempre muito receptivos e também muito responsáveis ao ensinar os procedimentos e rotina do laboratório, sempre me auxiliando da melhor maneira possível, compartilhando experiências.

Por fim, mas não menos importante, sou grata aos meus filhotes, Snoopy, Filho, Lulu, Pitoco e Kiko, simplesmente por serem capazes de me arrancar sorrisos e acalmar meu coração.

## RESUMO

Com o objetivo de evitar grandes perdas agrícolas por ataque de patógenos e aumentar a produtividade das culturas de interesse agrônômico, diversas estratégias de melhoramento genético foram desenvolvidas, sendo a transgenia uma das mais importantes na atualidade e fazendo assim necessária a busca por genes de resistência. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo a testagem da expressão transiente dos genes *AdEXLB8* e *AsNBSG29* em folhas destacadas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), a fim de verificar se esta expressão seria capaz de gerar reações de hipersensibilidade (HR) à inoculação com o nematoide das galhas, *Meloidogyne incognita*, ou de evitar a HR causada pela infecção pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Três experimentos foram conduzidos com diferentes tratamentos no Laboratório de Interação Molecular Planta Praga III (LPP3) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde as folhas inoculadas foram deixadas no escuro e avaliadas após uma semana. Como resultado, foi visto que os genes avaliados não causaram HR nas folhas de tabaco inoculadas com *M. incognita*, mas foram capazes de reduzir ou inibir a HR causada por *P. syringae*, mostrando que o uso da expressão transiente é vantajoso no que diz respeito à avaliação preliminar de sintomas visíveis em plantas.

Palavras-chave: *Nicotiana tabacum*, hipersensibilidade, expressão transiente, *Meloidogyne incognita*, *Pseudomonas syringae*.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO   | 8  |
| 2. OBJETIVOS  | 10 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL  | 10 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS  | 10 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA  | 11 |
| 3.1. ESTRESSE BIÓTICO E ABIÓTICO EM PLANTAS   | 11 |
| 3.2. NEMATOIDES DE PLANTAS  | 12 |
| 3.2.1. <i>Meloidogyne</i> spp. ou NEMATOIDES FORMADOTRES DE GALHA   | 13 |
| 3.3. <i>Pseudomonas syringae</i>  | 14 |
| 3.4. RESISTÊNCIA DE PLANTAS A FITOPATÓGENOS E A REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE  | 15 |
| 3.5. GÊNERO <i>Arachis</i> E A SUA IMPORTÂNCIA NA PROSPECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA  | 16 |
| 3.6. O USO DE <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NA TRANSGENIA  | 17 |
| 3.7. GENES CANDIDATOS À RESISTÊNCIA   | 18 |
| 4.1. LOCAL  | 20 |
| 4.2. MATERIAL VEGETAL E GERMINAÇÃO DE PLANTAS DE TABACO   | 20 |
| 4.3. PLANTIO DAS SEMENTES TRANSGÊNICAS  | 21 |
| 4.4. TRANSFORMAÇÃO DE <i>Agrobacterium</i>  | 21 |
| 4.5. TESTES DE HIPERSENSIBILIDADE   | 22 |
| 4.5.1. EXPERIMENTO 1: INOCULAÇÃO DE <i>Meloidogyne incognita</i> EM FOLHAS DESTACADAS DE TABACO   | 22 |
| 4.5.2. EXPERIMENTO 2: INOCULAÇÃO DE <i>P. syringae</i> e <i>M. incognita</i> EM FOLHAS DESTACADAS DE TABACO                                 | 24 |
| 4.5.3. EXPERIMENTO 3: ANÁLISE DE RESISTÊNCIA A <i>P. syringae</i> EM FOLHAS DESTACADAS DE PLANTAS DE TABACO GENETICAMENTE MODIFICADAS (GMs) | 26 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO   | 28 |
| 5.1. EXPERIMENTO 1  | 28 |
| 5.2. EXPERIMENTO 2  | 30 |
| 5.3. EXPERIMENTO 3  | 33 |
| 6. CONCLUSÃO  | 36 |
| 7. REFERÊNCIAS  | 37 |

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas estão constantemente sujeitas a ataques de fitopatógenos responsáveis por desencadear uma série de reações que levam ao mau funcionamento de células e tecidos. Tais alterações podem ocasionar mudanças que resultam em dano parcial ou morte da planta (AGRIOS, 1997). Anualmente, segundo dados publicados pela FAO em 2021, os gastos relacionados a doenças de plantas no mundo giram em torno de 220 bilhões de dólares, sendo que cerca de 40% da produção agrícola é perdida devido ao ataque de insetos-praga e patógenos de plantas, como fungos, bactérias, vírus e nematoides.

No que se refere a nematoides, as perdas do setor agrícola brasileiro correspondem a cerca de R\$ 35 bilhões anuais (MACHADO, 2015). O gênero *Meloidogyne*, conhecido popularmente como “nematóide formador de galhas” é considerado o de maior importância mundial, pois leva à hiperplasia e hipertrofia dos tecidos após a infecção (FERRAZ E BROWN, 2016), causando prejuízos tanto no desenvolvimento quanto na produtividade das plantas. Dentro de populações bacterianas, o gênero *Pseudomonas* é conhecido por ser um dos mais importantes no que diz respeito a fitopatologia (YOUNG, 2010). A maioria das espécies são patogênicas apenas para um número limitado de hospedeiros, e a minoria responsável por afetar mais de um hospedeiro, como a espécie *P. syringae* (YOUNG, 2010), que possui identificados 60 patovares, cada um infectando um grupo característico de plantas hospedeiras (XIN et al, 2018).

A resistência de plantas a doenças configura-se como a capacidade das plantas de prevenir, retardar ou evitar a atividade desses patógenos em seus tecidos (NOJOSA et al., 2005). É um elaborado sistema de defesa primariamente ligado ao reconhecimento do patógeno que protege as plantas contra sua invasão e que envolve mecanismos fisiológicos, moleculares, físicos e bioquímicos, que ativarão os genes de defesa ou aumentarão a produção de enzimas relacionadas à defesa (VAN LOON e VAN STRIEN, 1999).

Com todos esses fatores em vista, o estudo da engenharia genética vem contribuindo para o avanço da agricultura, proporcionando além do desenvolvimento de plantas com melhores características agrônômicas, cultivares com maior resistência a pragas e doenças. A busca por soluções inovadoras tem levado ao

desenvolvimento de plantas transgênicas cuja inserção de um ou mais genes exógenos pode modificar ou adicionar características desejáveis já identificadas em outra espécie para a melhoria da cultura em estudo (PATERNIANI, 2001; RODRIGUES, 2020).

Por ser um processo longo e laborioso, a validação *in planta* de genes candidatos ao melhoramento é feita inicialmente por meio do uso de plantas modelo antes de sua transferência para a cultura-alvo. A expressão dos transgenes em sistemas modelo pode ser estável, quando a expressão ocorre de forma sistêmica na planta e o transgene é transmitido para as próximas gerações, ou transiente, quando a expressão dos transgenes ocorre por um curto período de tempo e somente no local que recebeu o DNA exógeno. Em ambos os sistemas, a expressão é influenciada por fatores como efeitos de posição e o número de cópias do transgene no genoma (KOHLI et al, 2006; REED e OSBOURN, 2018).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da eficácia de genes candidatos na indução de resistência a fitopatógenos por meio de sua expressão transiente em folhas destacadas de tabaco (*Nicotiana tabacum*).

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento de um protocolo de expressão transiente de dois genes candidatos (*AdEXLB8* e *AsNBS29*) em folhas destacadas de tabaco (*Nicotiana tabacum*).
- Desenvolvimento de um protocolo de inoculação de *Meloidogyne incognita* e *Pseudomonas syringae*, de modo isolado ou combinado, em folhas destacadas de tabaco (*Nicotiana tabacum*).
- Avaliação fenotípica dos efeitos expressão transiente de dois genes candidatos (*AdEXLB8* e *AsNBS29*) na infecção de *Meloidogyne incognita* e *Pseudomonas syringae*, de modo isolado ou combinado, em folhas destacadas de tabaco (*Nicotiana tabacum*).

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. ESTRESSE BIÓTICO E ABIÓTICO EM PLANTAS**

O estresse abiótico é um fator limitante que afeta o desenvolvimento e a produtividade de campos agricultáveis ao redor do mundo (HOSSAIN et al., 2012; WARSI et al., 2021), sendo mais comumente os causados pela deficiência hídrica, excesso de temperatura, irradiação ou salinidade, bem como pela presença de metais pesados (ALVES, 2016; DE OLIVEIRA et al., 2019; CAMPOS et al., 2021)

Inicialmente o estresse abiótico afeta tanto a parte subterrânea quanto a parte aérea das plantas, desencadeando sinais que alteram o metabolismo do vegetal (KOMATSU e HOSSAIN, 2013). As consequências, que variam entre redução da taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>, taxa de crescimento, potencial hídrico, tamanho das células, taxa de transpiração e abertura dos estômatos são um compilado de fatores que interferem na fotossíntese podendo resultar na morte da planta (BEGCY et al., 2012; CAMPOS et al., 2021).

Outro fator limitante que prejudica o crescimento e desenvolvimento de plantas é o estresse biótico causado por organismos vivos como vírus, bactérias, fungos, insetos e nematoides.

São conhecidos como insetos-praga aqueles capazes de causar danos expressivos na agricultura, principalmente sob elevada densidade populacional (SANTOS, 2011; DE ABREU et al., 2015). Para se proteger do ataque de insetos-praga a que estão suscetíveis, as plantas então desenvolveram ao longo do tempo mecanismos capazes de defendê-las do ataque de uma ampla gama de insetos-praga a que estão suscetíveis (MINGOSSI, 2013), seja através de respostas locais ou sistêmicas que resultam na ativação de uma cascata de genes de defesa (LÉON et al., 2001; RHODEN et al., 2019). Os danos causados por insetos podem ocorrer em todas as partes vegetais, sendo mais recorrentes aqueles que se caracterizam pela herbivoria de folhas e raízes de plantas, além da transmissão de doenças pelo aparelho bucal do inseto durante a sucção de seiva. Além dos insetos as plantas estão sujeitas a uma variedade de ataque de fitopatógenos, como fungos, bactérias, vírus, nematoides capazes de causar doenças em plantas, ou seja, o mal funcionamento de

células e tecidos por agente patogênico, conduzindo a sintomas e mudanças que podem resultar em dano parcial ou na morte da planta (AGRIOS, 1997).

Atualmente, a fitopatologia trabalha com 7 princípios distintos que visam o controle de doenças, sendo eles baseados em 3 frentes distintas. Dois deles são focados no meio ambiente como a evasão, e a regulação que levam a alteração do ambiente visando desfavorecer a doença. Outros dois têm como objetivo focar no patógeno: ou seja, a exclusão, que previne a entrada do patógeno na área, e a erradicação, que busca a eliminação do patógeno de uma área em que já foi introduzido. Além dos três princípios focados na planta hospedeira: proteção (impedimento do contato direto entre planta e patógeno por meio de barreira protetora), imunização (desenvolvimento de plantas resistentes ou imunes) e terapia (tratamento de plantas doentes) (ROESE, 2021).

Segundo dados publicados pela Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO) em 2021, anualmente até 40% da produção agrícola mundial é perdida com pragas, sendo gastos com insetos-praga cerca de US\$70 bilhões, ao passo que esse valor chega a US\$220 bilhões no que diz respeito a doenças de plantas.

### **3.2. NEMATOIDES DE PLANTAS**

Nematoides constituem um diverso grupo de invertebrados microscópicos que podem ser encontrados tanto de forma livre em solos e em ambientes aquáticos, como de forma parasitária em animais, insetos e plantas (RITZINGER, 2010). Atualmente foram descritas aproximadamente 30.000 espécies de nematoides, sendo 15% desse total composto por parasitas de plantas (FERRAZ E BROWN, 2016).

Os fitonematoides geralmente possuem formato vermiforme (cilíndrico com as extremidades afiladas), medindo entre 0,2 mm e 3 mm de comprimento, possuem aparelho bucal composto por um estilete capaz de retirar substâncias nutritivas das plantas e injetar compostos tóxicos na célula vegetal (EMBRAPA). No que se refere a hábitos alimentares, os nematoides parasitas de plantas podem ser divididos em 3 categorias, ectoparasitas, aqueles que não penetram nos tecidos vegetais; endoparasitas migratórios, aqueles que penetram nas raízes, locomovem-se e buscam outra planta hospedeira quando esta encontra-se em decomposição; e os

endoparasitas sedentários, que uma vez que adentram o sistema radicular não retornam ao solo, aumentando significativamente em largura não podendo locomover-se (MICHEREFF, 2001; MOENS et al., 2009).

O ataque por fitonematoides nas raízes dificulta a absorção de água e nutrientes pela planta, o que pode ser percebido na parte aérea, através do amarelecimento e murchamento das folhas, menor crescimento da planta, entre outros (EMBRAPA). Entretanto, devido à não especificidade dos sintomas, que podem facilmente ser confundidos com a ação de outras pragas ou até mesmo por estresse abiótico, o ataque por nematoides pode não ser interpretado de forma correta, confundindo o produtor que pode recorrer a práticas errôneas elevando assim os custos de produção (FERRAZ E BROWN, 2016).

A ação dos nematoides é refletida nas perdas quantitativas e qualitativas das culturas cultivadas, diminuindo assim a eficiência produtiva e trazendo gastos com nematicidas e outras medidas de controle, além de restringir a exportação de produtos agrícolas e florestais (JUVENIL e LOPES, 2018). No mundo, as perdas anuais em lavouras causadas por fitonematoides são estimadas em 12,3% (HASSAN et al, 2013), no cenário brasileiro é estipulado que esse montante renda prejuízos de cerca de R\$ 35 bilhões anualmente (MACHADO, 2015).

### **3.2.1. *Meloidogyne* spp. ou NEMATOIDES FORMADOTRES DE GALHA**

Dentre os nematoides, o gênero *Meloidogyne* é considerado o de maior importância em termos econômicos mundiais, sendo comumente conhecidos como formadores de galhas. O parasitismo tem início com a penetração do juvenil infectante (J2) que se locomove intercelularmente até a alcançar a zona de diferenciação celular no tecido radicular, onde se aloja e conforme se alimenta muda do formato filiforme para salsichoide, perdendo assim a mobilidade (FERRAZ E BROWN, 2016). As galhas são assim formadas como consequência direta da interação trófica das fêmeas de *Meloidogyne* nas raízes, causando distúrbios fisiológicos que acarretam na hiperplasia e hipertrofia dos tecidos (COLLANGE et al., 2011).

Dentro do gênero, existem quatro espécies de maior importância econômica, sendo elas *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. hapla*, as três primeiras encontradas no mundo todo, principalmente em áreas de clima tropical e subtropical

(COLLANGE et al., 2011). A patogenicidade e população de *M. incognita* são afetadas pela textura, temperatura e umidade do solo, visto que essa espécie se desenvolve melhor em solos com mais baixo teor de argila e maior teor de areia (JARABA-NAVAS et al, 2007; WENDIMU, 2021), tem sua penetração reduzida em solos mais úmidos (KIM et al., 2017), e possui melhor desenvolvimento em solos com temperaturas entre 25 e 30°C (EISENBACK e TRIANTAPHYLLOU, 1991).

As perdas causadas por *M. incognita* sozinho giram em torno de U\$100 bilhões por ano ao redor do mundo (MUKHTAR et al., 2020), evidenciando assim a importância de técnicas efetivas para o controle desse nematoide, uma vez que a sua erradicação é inviável. Dentre as principais formas de controle estão o uso de nematicidas sintéticos e botânicos, bactérias e fungos nematófagos, óleos essenciais e cultivares resistentes (SUBEDI et al., 2020).

### **3.3. *Pseudomonas syringae***

O gênero *Pseudomonas* além de ser amplamente encontradas em diversos ambientes possui diversas características importantes, o que fez com que ao longo dos anos as espécies de bactérias do gênero fossem amplamente estudadas. Estudos têm revelado um grupo de organismos com características bioquímicas e metabólicas interessantes, o que torna o gênero perfeito para análises genéticas (HOLLOWAY, 1969). As espécies saprófitas do gênero são conhecidas pela capacidade que esses organismos possuem em degradar diversos compostos orgânicos, como aqueles que são substratos ou intermediários de vias metabólicas familiares, além de compostos aromáticos, derivados halogenados e uma ampla e variada gama de resíduos recalcitrantes que são raramente ou pouco degradados por outros organismos (PALLERONI, 1993).

Para mais, o gênero possui muitas espécies patogênicas para humanos e animais (PALLERONI, 1993), além de ser conhecido por ser um dos mais importantes no que diz respeito a populações de bactérias fitopatogênicas (YOUNG, 2010). No que diz respeito às espécies fitopatogênicas, é sabido que a maioria de suas espécies são patogênicas apenas para um número limitado de hospedeiros, sendo a minoria responsável por afetar mais de um hospedeiro, como a espécie *P. syringae* (Young,

2010), que possui identificados 60 patovares, cada um infectando um grupo característico de plantas hospedeiras (XIN et al, 2018).

Em 1966, Lelliot et al. realizaram testes com o objetivo de diferenciar fitopatógenos fluorescentes do gênero *Pseudomonas*, que dividiu as espécies em 5 grupos, baseados em testes de produção de levana, atividade oxidase, capacidade de apodrecer batata, produção de arginina diidrolase e reação de hipersensibilidade em tabaco, chamados de LOPAT. Apesar da composição da espécie *P. syringae* e seus patovares ser originalmente organizada baseada nos resultados dos testes, apresentando resultado negativo para atividade oxidase, capacidade de apodrecer batata, produção de arginina diidrolase e positivo para reações de hipersensibilidade em tabaco; além disso, estudos subsequentes apontam para a possibilidade de expansão do grupo, incluindo outras espécies intimamente relacionadas (YOUNG, 2010).

### **3.4. RESISTÊNCIA DE PLANTAS A FITOPATÓGENOS E A REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE**

Quando se fala sobre doenças de plantas, é sabido que na natureza a doença é a exceção e não a regra, visto que estas desenvolveram ao longo de seu processo evolutivo múltiplos mecanismos de defesa (AGRIOS, 1997; QUIRINO et al., 2010). Logo, mesmo expostas continuamente ao ataque de patógenos, as plantas não permitem a sua entrada de forma passiva (EMBRAPA, 2008).

A resistência de plantas a doenças causadas por patógenos é definida como a capacidade das plantas de prevenir ou retardar a entrada de fitopatógenos, ou ainda evitar a atividade desses microrganismos em seus tecidos (NOJOSA et al, 2005). Os mecanismos de defesa da planta são primariamente ativados quando esta reconhece o patógeno, emitindo assim uma série de sinais que desencadearão a ativação dos genes de defesa ou aumentarão a produção de enzimas relacionadas à defesa (VAN LOON e VAN STRIEN, 1999; RHODEN et al., 2019).

As respostas de defesa podem ser classificadas como pré e pós-formadas. As pré-formadas são aquelas já presentes na planta antes da presença do patógeno, podendo ser barreiras estruturais como tricomas, cutícula, estômatos e vasos condutores, ou bioquímicas como fenóis, alcaloides, fototoxinas, glicosídeos

cianogênicos e glicosídeos fenólicos. Os pós-formados são aqueles formados após o reconhecimento do patógeno, podendo ser estruturais como a lignificação, suberificação, tiloses, camadas de abscisão e formação de papilas, ou bioquímicos como a formação de radicais livres e o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas-PR (DA SILVA, 2008).

A reação de hipersensibilidade (HR) é um dos mecanismos de defesa mais efetivos da natureza (DA SILVA, 2008), conhecida como a interação a nível celular do produto do gene de resistência e do produto do gene de avirulência no contato planta-patógeno (VALE et al., 2001). Tal reação é caracterizada como uma rápida morte celular no local da infecção (DURRANT e DONG, 2004), que ocorre devido a alterações na plasmalena, síntese de fitoalexinas, liberação de eletrólitos, rápida agregação citoplasmática, entre outras reações que resultam em halos necróticos que confinam o patógeno (DA SILVA, 2008).

### **3.5. GÊNERO *Arachis* E A SUA IMPORTÂNCIA NA PROSPECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA**

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma planta oleaginosa cultivada exclusiva da América do Sul, sendo encontradas no Brasil 64 de suas espécies silvestres, com 46 sendo exclusivas do país (SILVA, 2008). O amendoim é rico em óleos, proteínas e vitaminas, sendo um dos grãos mais consumidos no mundo. No Brasil, a safra de 2020/2021 produziu cerca de 595 mil toneladas, sendo no geral destinada à subsistência, tendo em vista que seu excedente é comumente comercializado com pequenas fábricas de doces e empacotadoras (CONAB, 2021).

As espécies silvestres de amendoim possuem grande diversidade genética, representando assim uma fonte de genes que podem ser usados no melhoramento genético do amendoim cultivado (HILU e STALKER, 1995). A transferência de genes de interesse agrônômico é possível entre espécies do gênero *Arachis* tanto por meio do melhoramento convencional, através de cruzamentos complexos, quanto por meio da engenharia genética (KUMAR e KIRTI, 2011), sendo que o último método amplia o leque de possibilidades também para outras espécies cultivadas.

A contribuição genética de espécies selvagens torna-se especialmente relevante se tratando de resistência a estresses bióticos e abióticos, principalmente quando a

espécie cultivada apresenta baixa variabilidade genética e a pressão de seleção resulta em biótipos virulentos de pragas e patógenos (RAO et al., 2003). Em *A. stenosperma* foi detectada reação de hipersensibilidade pós-penetração por *M. arenaria*, sugerindo que esse amendoim silvestre possua mecanismo de defesa bioquímico que bloqueia o desenvolvimento e a reprodução do nematoide (PROITE, 2007). Além disso, a perscrutação de genes oriundos do gênero *Arachis* que conferem resistência a nematoides das galhas tem mostrado resultados frutíferos, conforme sugerem estudos (PEREIRA, 2017; PROITE, 2007).

### **3.6. O USO DE *Agrobacterium tumefaciens* NA TRANSGENIA**

A *Agrobacterium tumefaciens* é uma bactéria fitopatogênica presente no solo que afeta ampla gama de espécies, causando tumores nos tecidos vegetais, sendo popularmente conhecida como galha-da-coroa (SUBRAMONI et al., 2014). A formação dos tumores nas plantas é resultado do estímulo a divisões celulares causado por produtos gênicos codificados por um segmento de DNA (T-DNA) transferido da bactéria para a planta hospedeira (ZUPAN et al., 2000).

A expressão do T-DNA leva a produção de uma grande quantidade de citocinina (CK), ácido indolacético (AIA) e opinas, sendo os dois primeiros responsáveis pela indução da hiperplasia e hipertrofia dos tecidos, levando à formação de tumores, ao passo que as opinas servem como fonte de nutrientes, bem como sinalizadora para promover a regulação da virulência (SUBRAMONI et al., 2014).

Nos anos 80, com o avanço da engenharia genética, foi visto que o T-DNA bacteriano pode ser manipulado de forma a portar genes de interesse agrônômico, sem o comprometimento da transferência e integração ao DNA da planta (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998). Dessa forma, *Agrobacterium* spp. passou a ser visto como um vetor natural de transformação, e com os avanços do estudo da biologia celular e molecular vegetal, abriu um amplo leque de perspectivas no que diz respeito a introdução de genes exógenos em plantas (ANDRADE et al., 2003).

Ao longo dos anos, para a definição de protocolos para transformação de plantas de interesse, foram utilizadas plantas-modelo, como fumo (*Nicotiana tabacum*) e *Arabidopsis thaliana*, assim conhecidas por apresentarem menor porte, ciclo mais curto, maior quantidade de sementes e genoma relativamente curto. Posteriormente,

esses protocolos foram adaptados para a transformação das espécies alvo, que por sua vez costumam ser mais resistentes à transformação (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998).

### 3.7. GENES CANDIDATOS À RESISTÊNCIA

Com o avanço da biologia molecular e celular vegetal, foi possível a clonagem de genes de resistência contra pragas (R genes), que podem ser agrupados em diferentes classes, sendo que alguns possuem sequências que podem ser encontradas numa região denominada NBS (Nucleotide Binding Site) ou ainda nucleotídeos trifosfatados (DEYOUNG e ROGER, 2006). A caracterização molecular de genes de resistência em plantas mostrou que estes genes codificam proteínas com motivos estruturais comuns, o que indica que foi conservada durante a evolução tanto a sinalização de defesa, quanto o reconhecimento de patógenos (GOMES, 2005).

Para o reconhecimento dos fitopatógenos, as plantas desenvolveram diversos receptores intracelulares imunes, também conhecidos como NLRs, compostos por um NBS central e um domínio terminal rico em leucinas (leucine-rich repeat, também conhecido como LRR), que são responsáveis pela mediação do reconhecimento específico dos efetores dos patógenos (JONES e DANGL, 2006).

Um dos genes candidatos à resistência, denominado *AsNBSG29*, um gene NLR isolado de *Arachis stenosperma*, que apresentou em estudos anteriores in silico regulação positiva em *A. stenosperma* em resposta a infecção com *Cercosporidium personatum* (GUIMARÃES et al., 2012), radiação ultravioleta (MARTINS et al., 2022). infecção com *Meloidogyne arenaria* (com 3, 6 e 9 dias após inoculação) (GUIMARÃES et al., 2015), além de efeitos significativos na redução de lesões causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em tabaco (GUIMARÃES et al., 2022).

O outro candidato à resistência, *AdEXLB8*, codifica uma Expansina-like B (EXLB), vale ressaltar que as Expansinas são uma superfamília de enzimas envolvidas no remodelamento da parede celular, através do aumento da extensibilidade e relaxamento da tensão existente nas paredes das células vegetais (COSGROVE, 2000). Portanto, por possuir peptídeos sinalizadores direcionados à parede celular e estruturas previstas para atuarem como a de outras expansinas, a EXLB provavelmente também tem como alvo modificações da parede celular

(COSGROVE, 2015). Em 2015, Guimarães et al. obteve resultados positivos através da transcriptoma de raízes de *Arachis stenosperma* inoculadas com *Meloidogyne arenaria*, tornando assim o gene um candidato potencial à resistência a nematoides.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. LOCAL

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga III (LPP3), no prédio de Biotecnologia (PBI) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

### 4.2. MATERIAL VEGETAL E GERMINAÇÃO DE PLANTAS DE TABACO

Foram semeadas sementes de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) em substrato (Caroline Soil, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil) esterilizado por autoclave. As plântulas foram crescidas em câmara de crescimento sob luz artificial branca ( $120 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ ) com fotoperíodo de 12 horas, a  $25 \pm 2$  °C por três semanas. Após esse período, 20 plântulas foram transplantadas para copos plásticos de 500 mL (Figura 1), contendo novo substrato autoclavado, permanecendo nas mesmas condições de câmara de crescimento por mais quatro semanas.



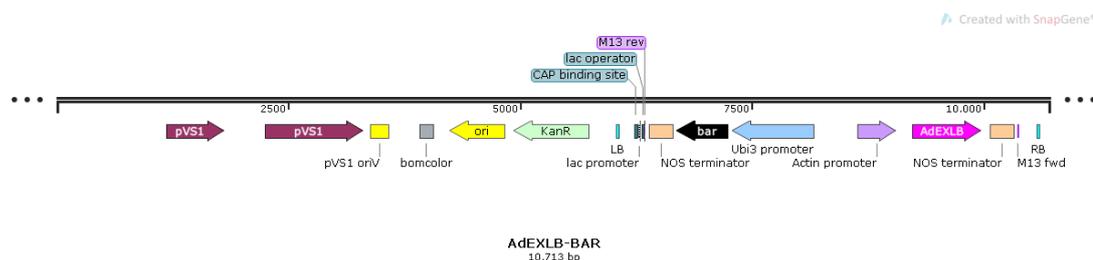
**Figura 1.** Plantas de tabaco com quatro semanas após a semeadura em copos de 500 mL contendo substrato autoclavado.

### 4.3. PLANTIO DAS SEMENTES TRANSGÊNICAS

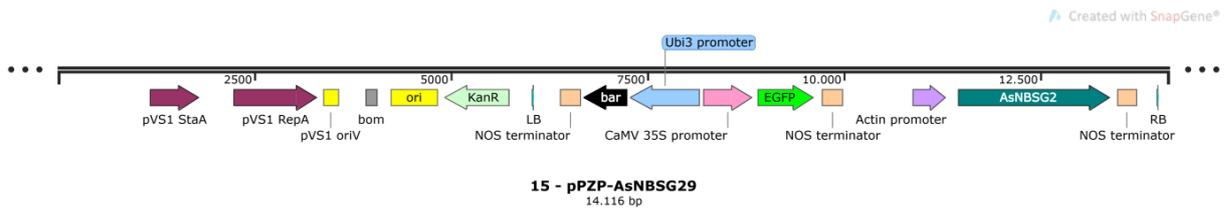
Para avaliar a efetividade da expressão do gene que codifica a expansina-like B de *Arachis duranensis* (*AdEXLB8*) no controle da infecção dos fitopatógenos foi selecionada uma linhagem (*AdEXLB\_OE-10*) geneticamente modificada (GM) previamente obtida (BRASILEIRO et al., 2021). Para a semeadura e o transplante das plantas transgênicas foi realizado o mesmo procedimento feito com as sementes não-transgênicas descrito acima.

### 4.4. TRANSFORMAÇÃO DE *Agrobacterium*

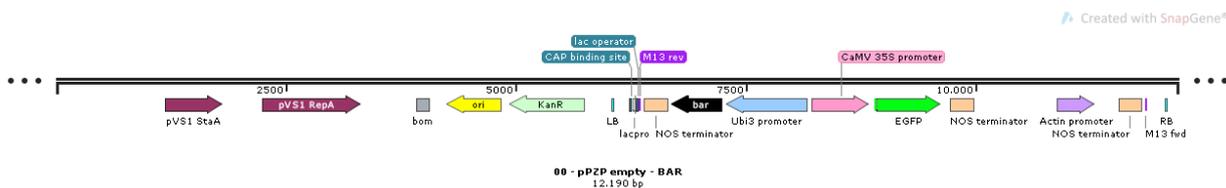
Para analisar a eficiência da expressão transiente na indução de defesa, a cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* 'GV3101' foi transformada com dois genes candidatos (*AdEXLB8* e *AsNBS29*), potencialmente envolvidos na resposta de hipersensibilidade. Para a construção dos vetores binários, as sequências codantes do gene *AdEXLB8* (753 pb) e *AsNBSG29* (1.920 pb) foram clonadas no sítio XhoI do vetor binário pPZP-BAR (Mota et al., 2021), produzindo, respectivamente, os vetores pPZP\_*AdEXLB8* (Figura 2) e pPZP\_*AsNBSG29* (Figura 3), além do vetor piramidado pPZP\_*AsNBSG29:AdEXLB8*. Nestes vetores, os genes *AdEXLB8* e *AsNBS29* estão sob o controle do promotor actin 2 de *Arabidopsis thaliana* e do terminador NOS de *Agrobacterium*. Além destes vetores, o vetor pPZP-BAR (Mota et al., 2021) sem os genes candidatos (pPZP\_Empty) foi utilizado como controle negativo em nossos ensaios (Figura 4).



**Figura 2:** Representação esquemática do vetor pPZP\_*AdEXLB* (10.713 pb) contendo o cassete do gene que codifica a expansina-like B de *Arachis duranensis* (*AdEXLB8*) sob o controle do promotor actin 2 de *Arabidopsis thaliana* e do terminador NOS de *Agrobacterium* no sítio XhoI do vetor binário pPZP-BAR (Mota et al., 2021).



**Figura 3:** Representação esquemática do vetor pPZP\_AsNBSG29 (14.116 pb) contendo o cassete do gene que codifica o NBS29 de *Arachis stenosperma* (*AdEXLB8*) sob o controle do promotor actin 2 de *Arabidopsis thaliana* e do terminador NOS de *Agrobacterium* no sítio XhoI do vetor binário pPZP-BAR (Mota et al., 2021).



**Figura 4:** Representação esquemática do vetor pPZP-Empty (12.190 pb) vazio, isto é, não contendo os genes candidatos.

## 4.5. TESTES DE HIPERSENSIBILIDADE

### 4.5.1. EXPERIMENTO 1: INOCULAÇÃO DE *Meloidogyne incognita* EM FOLHAS DESTACADAS DE TABACO

O Experimento 1 foi realizado a fim de testar e verificar se os genes *AsNBSG29* e *AdEXLB8* possuíam potencial para causar reações de hipersensibilidade a *Meloidogyne incognita* em folhas destacada de tabaco, assim como observado anteriormente por Xiao et al. (2021) com o gene *PsoRPM3*.

Para realizar o experimento de infiltração de nematoides em folhas destacadas de tabaco, foram inicialmente coletados, ao longo de uma semana, juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, isolados de tomateiros (*Solanum lycopersicum*) infectados com *Meloidogyne incognita*, até a concentração final de 800 nematoides por mililitro.

Para avaliar a expressão transiente dos transgenes nas plantas não-GM, três culturas de *Agrobacterium tumefaciens* cepa 'GV3101' contendo os vetores binários

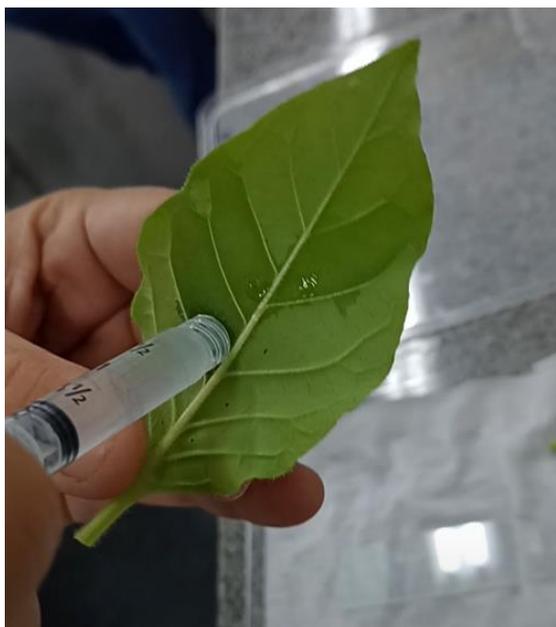
pPZP\_AdEXLB8, pPZP\_AsNBSG29 ou pPZP\_Empty, foram cultivadas em meio YEP (30 mL) com canamicina (30 µl) e gentamicina (30 µl), sob agitação de 180 rpm a 28 °C. Quando a OD<sub>600</sub> das culturas atingiu aproximadamente 0,8, as células bacterianas foram centrifugadas durante 20 minutos a 10.000 rpm e logo em seguida ressuspensas em tampão de infiltração composto por 10 mM de MES-NaOH (pH 5,2), 10 mM de MgCl<sub>2</sub> e 100 µl de acetoseringona, sendo agitado a 180 rpm por mais 20 minutos em temperatura ambiente.

Dezesseis placas de Petri quadradas (20 cm x 20 cm) foram montadas com duas folhas de papel toalha e 1 folha de papel Germitest cortado nas dimensões da placa. Ao todo, 56 folhas de tabaco, com cerca de 10 cm de comprimento cada, foram coletadas de plantas crescidas em câmara de crescimento, dispostas sobre as placas e separadas em oito tratamentos (Tabela 1). Cada tratamento foi constituído por sete folhas, divididas em duas placas, a primeira contendo quatro folhas furadas (oito furos folha<sup>-1</sup>), e a segunda composta por três folhas controle, sem furo. O furo foi realizado imediatamente antes do ensaio utilizado uma agulha (4 mm). As placas montadas foram umedecidas com água destilada a fim de evitar a murcha das folhas.

**Tabela 1.** Tratamentos realizadas em folhas de plantas não-transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) com ou sem furos (Experimento 1).

| <b>Tratamentos (inoculações) realizados em plantas não-transgênicas de tabaco</b>  |
|--|
| <i>Meloidogyne incognita</i>   |
| <i>Agrobacterium</i> contendo o vetor pPZP_Empty                                   |
| <i>Agrobacterium</i> contendo o vetor pPZP_AsNBSG29                                |
| <i>Agrobacterium</i> contendo o vetor pPZP_AdEXLB8                                 |
| <i>Meloidogyne incognita</i> + <i>Agrobacterium</i> contendo o vetor pPZP_Empty    |
| <i>Meloidogyne incognita</i> + <i>Agrobacterium</i> contendo o vetor pPZP_AsNBSG29 |
| <i>Meloidogyne incognita</i> + <i>Agrobacterium</i> contendo o vetor pPZP_AdEXLB8  |
| MES  |

Os nematoides suspensos (J2 de *M. incognita*) em água destilada foram imediatamente inoculados nas folhas por meio de uma seringa sem agulha (Figura 4), sendo 0,5 mL de inóculo por folha. Em seguida, as placas contendo as folhas inoculadas foram levadas para a câmara de crescimento, dessa vez permanecendo no escuro por 24 horas antes da inoculação com *Agrobacterium tumefaciens*.

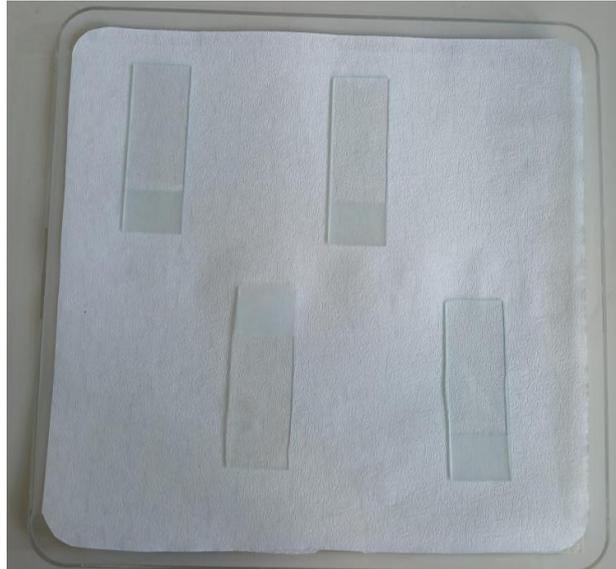


**Figura 4.** Inoculação de *M. incognita* realizada com o auxílio de seringa sem agulha em folha destacada de tabaco.

No dia seguinte, cada folha foi re-inoculada com 0,5 mL da suspensão de bactéria(s) com os vetores por meio de uma seringa sem agulha. As folhas então voltaram para a câmara de crescimento, onde permaneceram no escuro e seu fenótipo monitorado e fotografado ao longo de uma semana.

#### **4.5.2. EXPERIMENTO 2: INOCULAÇÃO DE *P. syringae* e *M. incognita* EM FOLHAS DESTACADAS DE TABACO**

O segundo experimento foi conduzido com nove tratamentos diferentes, desta vez dispondo as folhas destacadas sob lâminas nas placas (Figura 5), evitando assim o contato total das folhas com o papel umedecido. Foram utilizadas quatro folhas destacadas de plantas não-transgênicas de tabaco por tratamento, todas contendo ao todo oito furos.



**Figura 5.** Placa de Petri quadrada montada com papel toalha, folha Germitest e lâminas, para evitar o contato das folhas de tabaco com a umidade.

Neste experimento 2, foram utilizadas, além das cepas desarmadas de *Agrobacterium tumefaciens* contendo os vetores pPZP\_AsNBSG29 e pPZP\_Empty, uma cepa de *Agrobacterium* contendo um gene capaz de suprimir o silenciamento da expressão transiente, induzindo assim a sua ação por mais tempo (Indutor). As bactérias foram cultivadas em meio YEP (30 mL) com canamicina (30 µl) e gentamicina (30 µl), sob agitação de 180 rpm, até atingirem OD<sub>600</sub> próxima a 0,8, conforme descrito acima (item 4.5.1).

A bactéria *Pseudomonas syringae* foi cultivada em (30 mL) meio 523 (KADO e HESKETT, 1970), sob temperatura de 28 °C e agitação de 180 rpm durante 48 horas.

Após o crescimento das bactérias, foram então realizadas combinações (Tabela 2) em tubos Falcons de 15 mL entre as suspensões das bactérias *Pseudomonas syringae* e *Agrobacterium tumefaciens*, de forma que ambas as espécies estivessem em igual proporção. Após a centrifugação durante 20 minutos, as bactérias foram ressuscitadas em água destilada contendo nematoides (375 J2/mL). A ressuspensão das duas bactérias e com os nematoides foi então inoculada nas folhas destacadas (0,5 mL por folha) como descrito acima (item 4.5.1.). Neste Experimento 2, diferentemente do Experimento 1, o pecíolo das folhas foi coberto por chumaço de algodão e umedecido com água destilada, a fim de evitar a desidratação das folhas. Por fim, as folhas foram mantidas em câmara de crescimento, permanecendo no escuro e sendo fotografadas a cada 24 horas por uma semana.

**Tabela 2.** Tratamentos realizadas em folhas de plantas não-transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi)(Experimento 2).

| <b>Tratamentos (inoculações) realizados em plantas não-transgênicas de tabaco</b>            |
|--|
| <i>Meloidogyne incognita</i> + <i>Agrobacterium</i> contendo o vetor pPZP_AsNBSG29           |
| <i>Meloidogyne incognita</i> + <i>Agrobacterium</i> contendo o vetor pPZP_AsNBSG29 + Indutor |
| <i>Meloidogyne incognita</i> + <i>Agrobacterium</i> contendo o vetor Empty                   |
| <i>Meloidogyne incognita</i> + <i>Agrobacterium</i> contendo o vetor Empty + Indutor         |
| <i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Agrobacterium</i> contendo o vetor pPZP_AsNBSG29            |
| <i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Agrobacterium</i> contendo o vetor pPZP_AsNBSG29 + Indutor  |
| <i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Agrobacterium</i> contendo o vetor pPZP_AsNBSG29            |
| <i>Pseudomonas syringae</i> + <i>Agrobacterium</i> contendo o vetor pPZP_AsNBSG29            |
| <i>Pseudomonas syringae</i>  |

#### **4.5.3. EXPERIMENTO 3: ANÁLISE DE RESISTÊNCIA A *P. syringae* EM FOLHAS DESTACADAS DE PLANTAS DE TABACO GENETICAMENTE MODIFICADAS (GMs)**

Para o terceiro experimento, foram utilizadas tanto a estratégia da expressão estável utilizando plantas transgênicas (GM) de tabaco superexpressando o gene *AdEXLB8*, quanto o aumento da resposta quando, à expressão estável, foi acrescentada a expressão transiente.

Dessa forma, o terceiro experimento foi conduzido com cinco tratamentos diferentes (Tabela 3), tanto em plantas transgênicas e como nas plantas não-transgênicas. Após a coleta das folhas estas foram, furadas com agulha (quatro furos/folha) e dispostas sobre as placas (quatro folhas/placa).

**Tabela 3.** Tratamentos realizados em folhas de plantas não-transgênicas e transgênicas (*AdEXLB\_OE-10*) de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) (Experimento 3).

| <b>Tratamentos (inoculações) realizados em plantas não-transgênicas e transgênicas (<i>AdEXLB_OE-10</i>) de tabaco <i>AdEXLB8</i></b> |
|---|
| <i>Pseudomonas syringae</i>   |
| <i>P. syringae</i> + <i>Agrobacterium</i> contendo o vetor pPZP_Empty   |
| <i>P. syringae</i> + <i>Agrobacterium</i> contendo o vetor pPZP_AdEXLB8   |
| <i>P. syringae</i> + <i>Agrobacterium</i> contendo o vetor pPZP_AsNBSG29:AdEXLB8  |

*P. syringae* + *Agrobacterium* contendo o vetor *AsNBSG29*

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. EXPERIMENTO 1

A fim de verificar se os vetores contendo os genes de resistência desencadeariam algum tipo de sintoma visível nas folhas de tabaco, foram realizadas inoculações contendo somente os genes do estudo, tanto em folhas contendo furos, quanto aquelas não furadas, desta forma, pôde-se avaliar que somente a ação da *Agrobacterium* e dos genes não foi capaz de gerar danos às folhas. Além disso, para a mesma finalidade foi feita a inoculação somente com MES, mostrando que a solução em si não é capaz de causar danos.

A partir das fotos retiradas ao longo de cada experimento, foi possível classificar a eficiência dos tratamentos de acordo com os sintomas visíveis de hipersensibilidade.

Após 7 dias de avaliação não foi possível detectar reações de hipersensibilidade a *Meloidogyne incognita* nas folhas destacadas de tabaco selvagem inoculadas com nenhum dos tratamentos (Tabela 4). O resultado difere daquele obtido por Xiao et al. 2021, onde as folhas inoculadas com o gene *PsoRPM3* obtiveram sintomas claros de necrose.

Xiao et al. (2021) mostrou ser possível a obtenção de sintomas de hipersensibilidade a nematoides em folhas destacadas de tabaco ao utilizar o gene *PsoRPM3* oriundo de *Prunus sogdiana* Vassilcz em expressão transiente. A expressão transiente ocorre quando há a expressão heteróloga de um gene independentemente da sua integração ao genoma, não havendo a transferência de genes exógenos para gerações futuras (FISCHER et al., 1999; KOHLI et al., 2006).

A integração estável de genes exógenos introduzidos ocorre em apenas cerca de 0,1% das células transformadas, entretanto, a expressão transiente ocorre em todas as células que receberam o DNA exógeno não sendo influenciada por fatores como efeitos de posição e o número de cópias do transgene no genoma. Além disso, a depender do método utilizado, pode ser observada após 6 a 8 horas, e não ser mais detectada de 7 a 15 dias (KOHLI et al., 2006).

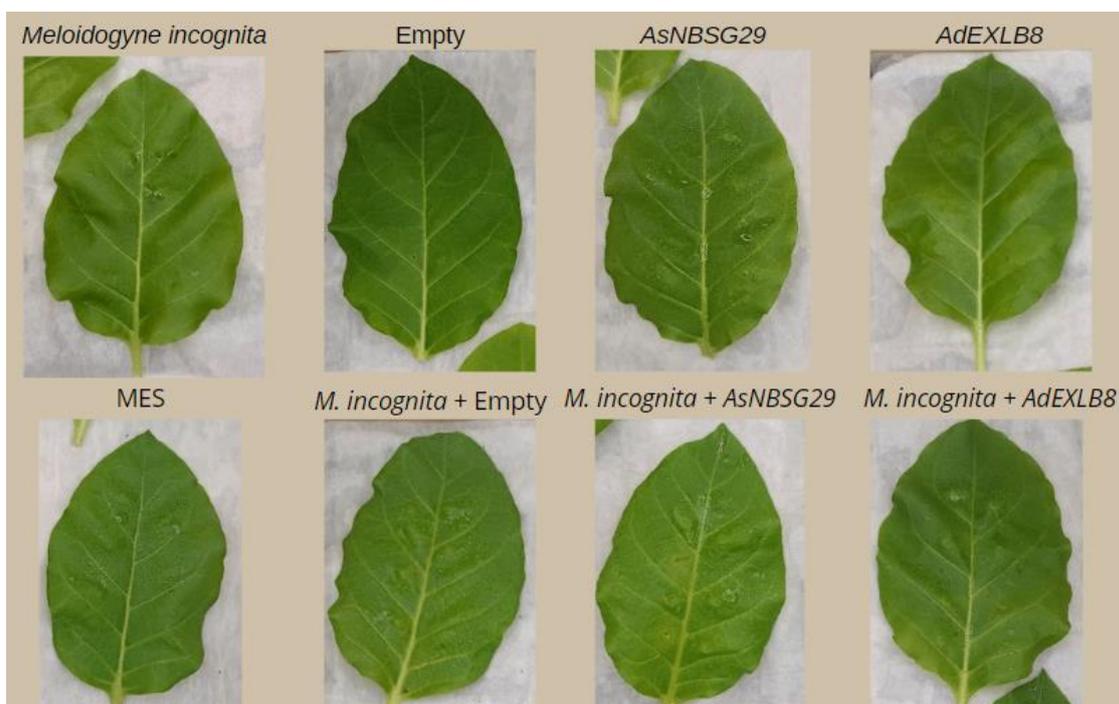
O resultado aponta que o gene *AdEXLB8* não causa sintomas de hipersensibilidade à nematoides, apesar de se mostrar promissor à resistência contra *Meloidogyne* spp., como demonstrado anteriormente por Pereira (2017). Da mesma

forma, as folhas inoculadas com o gene *AsNBSG29* não apresentaram hipersensibilidade contra nematoides nas folhas de tabaco.

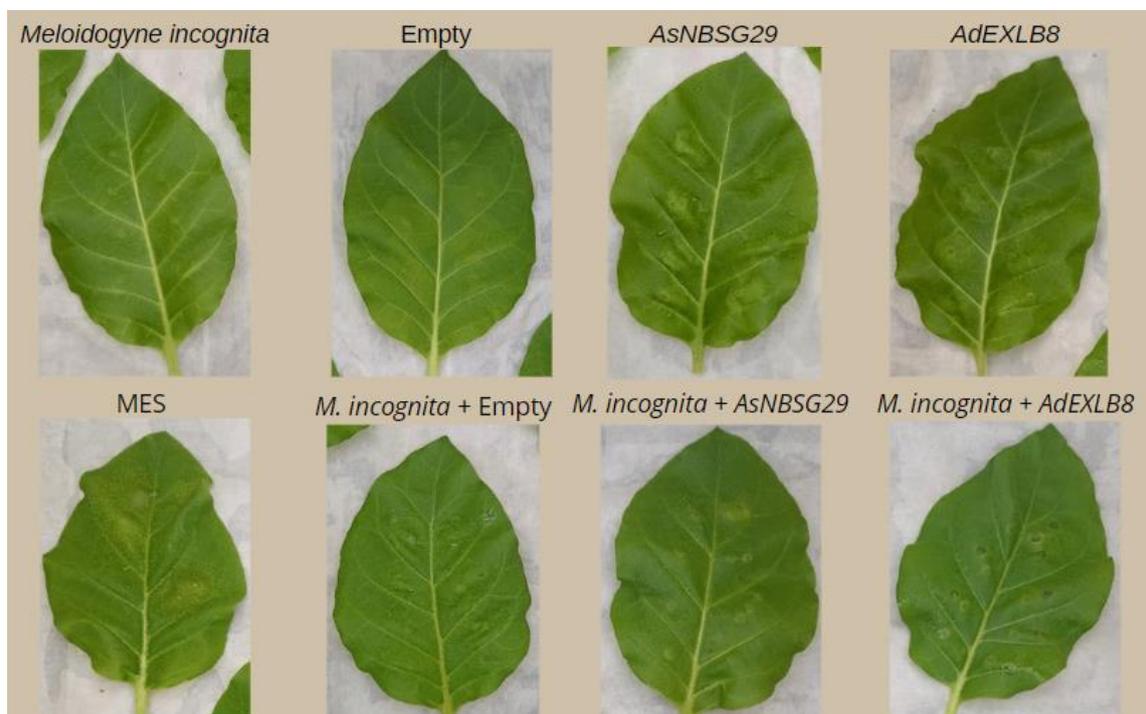
Ademais, foi possível observar que a inoculação em folhas com furos (Figura 6) apresentou resultados mais promissores se comparada com aquela feita por pressão da seringa (Figura 7), visto que existia maior facilidade da entrada do inóculo à parede vegetal daqueles que foram dispostos com furos nas folhas. Foi observado também maior quantidade de danos na região foliar que se encontrava em contato direto com o papel Germitest, apresentando maior propensão a rasgos devido à umidade.

**Tabela 4.** Classificação do nível de sintomas observados nas folhas de tabaco. Os sintomas foram classificados de 0 a 3, sendo 0: nenhuma alteração na folha; 1: presença de pequenos halos amarelados; 2: presença de grandes manchas amarelas; e 3: necrose.

|                                       | Nível de Sintomas |   |   |                  |   |   |   |   |
|---------------------------------------|-------------------|---|---|------------------|---|---|---|---|
|                                       | Folhas sem furos  |   |   | Folhas com furos |   |   |   |   |
| <i>Meloidogyne incognita</i>          | 0                 | 0 | 0 | 0                | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Empty                                 | 0                 | 0 | 0 | 0                | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>AsNBSG29</i>                       | 0                 | 0 | 0 | 0                | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>AdEXLB8</i>                        | 0                 | 0 | 0 | 0                | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>M. incognita</i> + Empty           | 0                 | 0 | 0 | 0                | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>M. incognita</i> + <i>AsNBSG29</i> | 0                 | 0 | 0 | 0                | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>M. incognita</i> + <i>AdEXLB8</i>  | 0                 | 0 | 0 | 0                | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MES                                   | 0                 | 0 | 0 | 0                | 0 | 0 | 0 | 0 |



**Figura 6.** Folhas de tabaco furadas que foram inoculadas com *M. incognita*, MES, vetor vazio, vetor cheio (*AsNBSG29* e *AdEXLB8*) e as suas combinações.



**Figura 7.** Folhas de tabaco sem furos que foram inoculadas com *M. incognita*, MES, vetor vazio, vetor cheio (*AsNBSG29* e *AdEXLB8*) e as suas combinações.

## 5.2. EXPERIMENTO 2

Após os resultados obtidos somente com a inoculação de nematoides, foi decidido que o novo experimento seria focado em comparar a reação das folhas à inoculação com *Meloidogyne incognita* e *Pseudomonas syringae*, a fim de verificar assim a ação dos genes a diferentes tipos de fitopatógenos.

As folhas inoculadas somente com *Pseudomonas syringae* apresentaram amarelecimento ao longo da região infiltrada (Figura 8), resultado semelhante ao observado em Berbert et al. (2022), e confirmando os resultados já detalhados anteriormente por Lelliot et al. (1966) que afirmou que as plantas de *Nicotiana tabacum* possuem reações de hipersensibilidade a *P. syringae*

O tratamento contendo *Pseudomonas* + *AsNBSG29* não apresentou sintomas visíveis de infecção, ao passo que *Pseudomonas* + *AsNBSG29* + Indutor apresentou necrose em 1 das 4 folhas inoculadas, sendo esse um sintoma típico da infecção do patógeno, que é caracterizada por lesões amareladas que podem ser seguidas por necrose da área afetada (Figura 9). Sintomas de necrose também foram observados por Traore et al. (2019), ao inocular *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* em folhas de *Nicotiana benthamiana* e *Nicotiana tabacum*.

Diferentemente do esperado, o tratamento contendo *Pseudomonas* + Empty não apresentou amarelecimento, o que pode indicar a ocorrência de competição entre as duas bactérias pelo sítio de infecção, impossibilitando o aparecimento de sintomas visíveis.

Assim como no Experimento 1, as folhas com os tratamentos contendo *Meloidogyne incognita* + *AsNBSG29*, *Meloidogyne incognita* + Empty e *Meloidogyne incognita* + *AsNBSG29* + Indutor não apresentaram sintomas de hipersensibilidade (Tabela 5). Reforçando a hipótese de que o gene não é capaz de causar necrose quando em contato com o nematoide inoculado nas folhas.

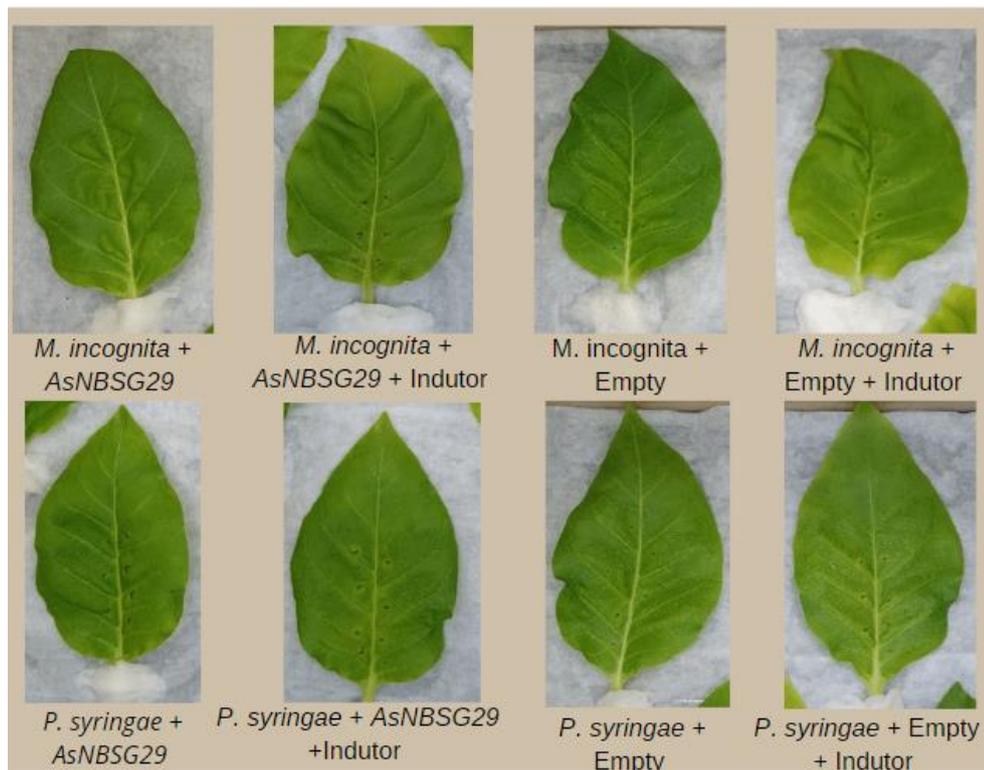
Por fim, foi visto que o algodão posto no pecíolo afim de proporcionar maior absorção de água pelas folhas causou a podridão de algumas hastes devido ao constante contato com o líquido, sendo assim, decidiu-se que para o experimento seguinte seria necessária apenas a presença da lâmina sob a folha, sem o acréscimo de algodão ao pecíolo.

**Tabela 5.** Classificação do nível de sintomas observados nas folhas de tabaco. Os sintomas foram classificados de 0 a 3, sendo 0: nenhuma alteração na folha; 1: presença de pequenos halos amarelados; 2: presença de grandes manchas amarelas; e 3: necrose.

|                                  | Nível de Sintomas   |   |   |   |                    |   |   |   |
|----------------------------------|---------------------|---|---|---|--------------------|---|---|---|
|                                  | <i>M. incognita</i> |   |   |   | <i>P. syringae</i> |   |   |   |
| <b>Empty</b>                     | 0                   | 0 | 0 | 0 | 0                  | 0 | 0 | 0 |
| <b>Empty + Indutor</b>           | 0                   | 0 | 0 | 0 | 0                  | 0 | 0 | 0 |
| <b><i>AsNBSG29</i></b>           | 0                   | 0 | 0 | 0 | 0                  | 0 | 0 | 0 |
| <b><i>AsNBSG29</i> + Indutor</b> | 0                   | 0 | 0 | 0 | 0                  | 3 | 0 | 0 |
| <b><i>P. syringae</i></b>        |                     |   |   |   | 2                  | 2 | 2 | 1 |



**Figura 8.** Folha de tabaco inoculada com *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.



**Figura 9.** Folhas de tabaco inoculadas com diferentes combinações entre os patógenos (*M. Incognita* e *P. syringae*) e os vetores.

### 5.3. EXPERIMENTO 3

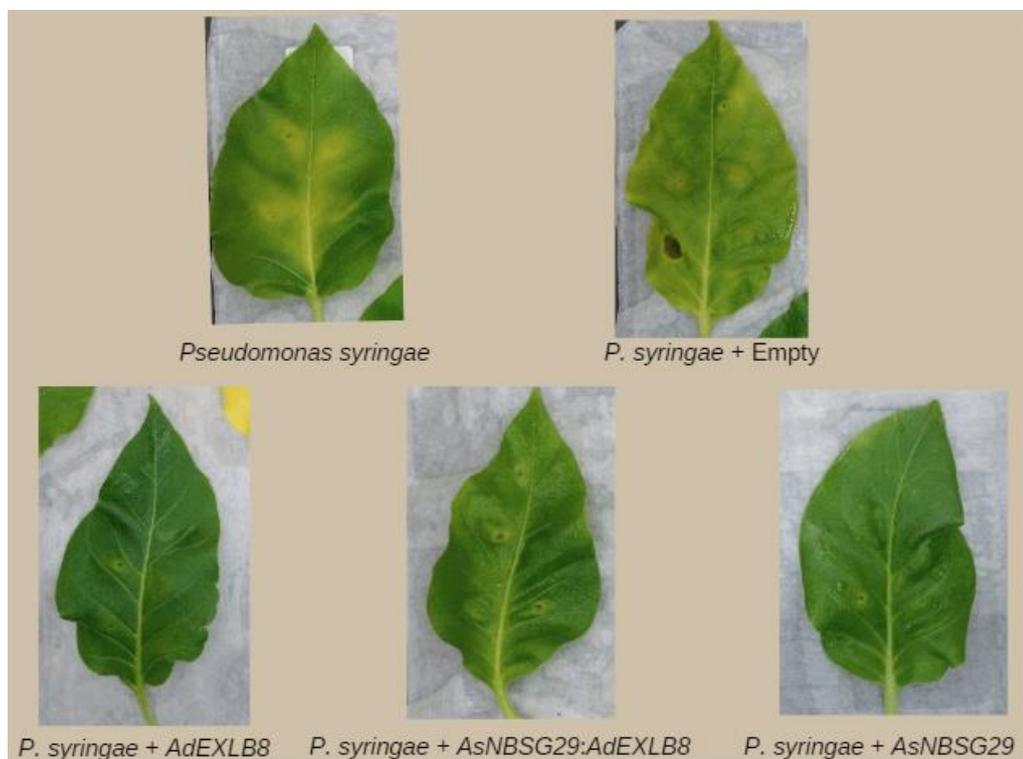
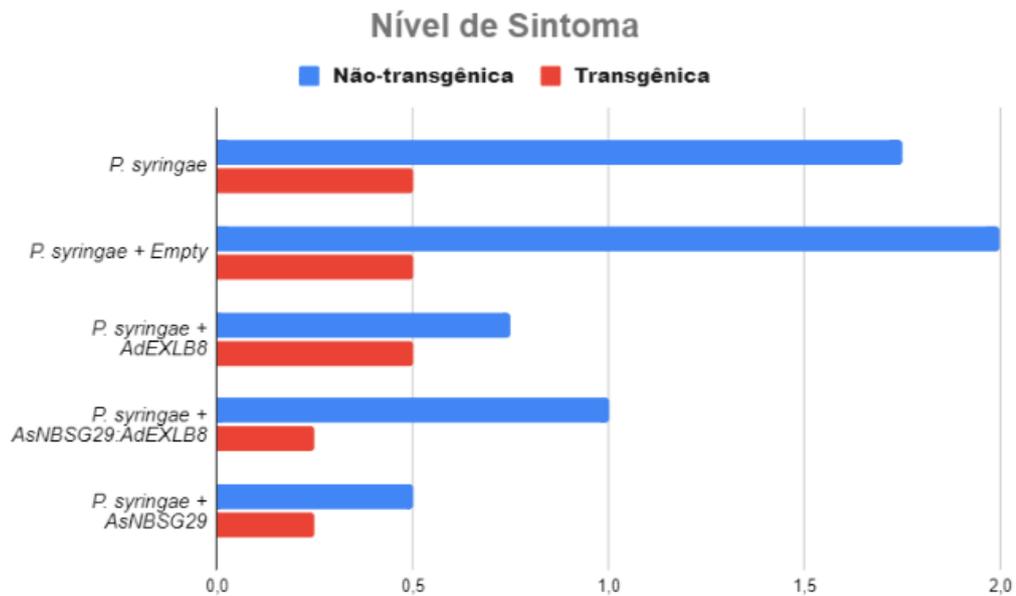
As folhas de tabaco não-transgênico inoculadas apenas com *P. syringae* apresentaram amarelecimento acentuada nas áreas de infiltração do inóculo, enquanto aquelas com *P. syringae* + Empty apresentaram amarelecimento com um fraco halo esverdeado ao redor, indicando que a mistura entre bactérias em si é capaz de afetar a ação da *P. syringae* (Gráfico 1).

As folhas de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi não-transgênicas inoculadas com *P. syringae* + *AdEXLB8* apresentaram leve halo amarelado ao redor dos furos usados para a inoculação (Figura 10). Resultados semelhantes foram observados com a inoculação com *P. syringae* + *AsNBSG29*, cujos halos apresentaram um tom de amarelo levemente mais nítido. A inoculação com *P. syringae* + *AsNBSG29:AdEXLB8* apresentou bons resultados, apesar de menos satisfatórios que aqueles obtidos por *AsNBSG29* e *AdEXLB8*. Tal contenção do amarelecimento característico causado por *Pseudomonas syringae* em *Nicotiana tabacum* também foi observado por Hafez (2012), ao borrifar peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em folhas de tabaco antes de inocula-las com *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola.

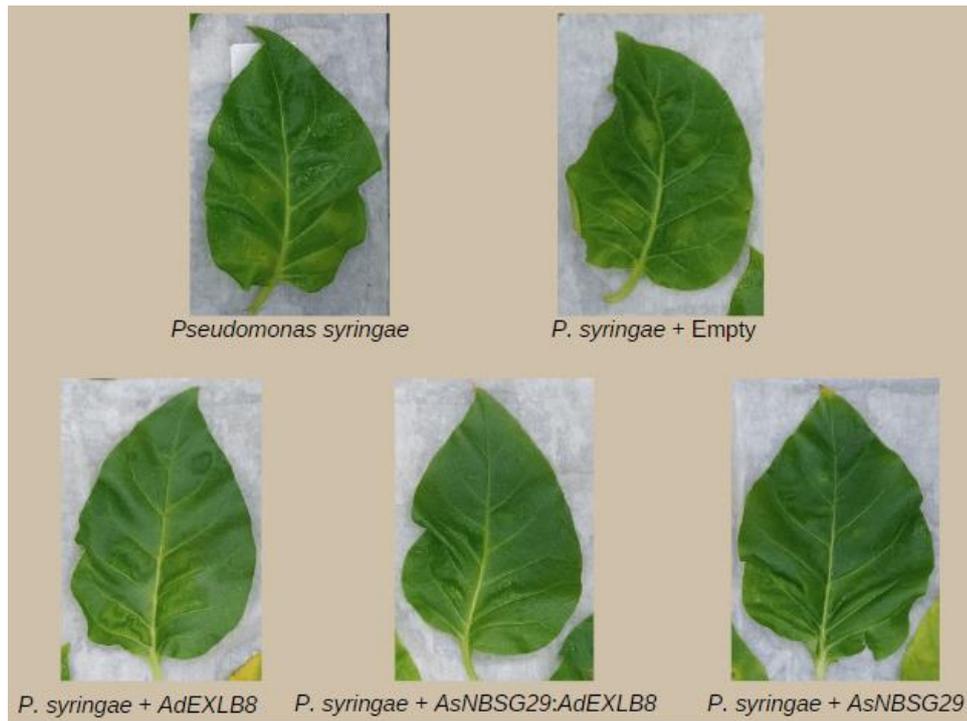
Quanto ao ensaio com as plantas transgênicas *AdEXLB8*, todos os tratamentos (*P. Syringae*, *P. syringae* + *AsNBSG29*, *P. syringae* + *AdEXLB8*, *P. syringae* + *AsNBSG29:AdEXLB8* e *P. syringae* + Empty) demonstraram bons resultados pois as folhas apresentavam pouco ou nenhum amarelecimento ao longo da região onde foi realizada a inoculação (Figura 11). Os dados indicam que plantas transgênicas contendo o gene *AdEXLB8* podem ser capazes de conter a infecção causada por *P. syringae*, visto que foram detectados poucos ou nenhum sinal da reação natural de HR ao patógeno.

Ademais, a inoculação com os vetores *AsNBSG29* e *AsNBSG29:AdEXLB8* foi capaz de conter com maior eficácia o aparecimento de pequenos halos amarelados, se comparado com a inoculação local contendo *AdEXLB8*. Estes resultados indicam que não há um aumento da resistência quando combinados a expressão transiente e a expressão estável, divergindo dos resultados obtidos por Xiao et al. (2021), onde a expressão transiente do gene *PsoRPM3* em uma planta transgênica *PsoRPM3* foi capaz de acentuar a necrose no local inoculado com patógeno.

**Gráfico 1.** Média da classificação do nível de sintomas observados nas folhas de tabaco. Os sintomas foram classificados de 0 a 3, sendo 0: nenhuma alteração na folha; 1: presença de pequenos halos amarelados; 2: presença de grandes manchas amarelas; e 3: necrose.



**Figura 10.** Inoculação de *P. syringae* em folhas de tabaco não-transgênico



**Figura 11.** Inoculação de *P. syringae* em folhas de tabaco transgênico *AdEXLB8*.

## 6. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos nos três experimentos realizados, foi possível concluir que a superexpressão dos transgenes *AdEXLB8* e *AsNBSG29*, apesar de se mostrarem bons candidatos à resistência contra nematoides, não foram capazes de gerar reações do tipo HR em resposta à inoculação com *M. incognita* em folhas de tabaco. Por outro lado, no que se refere a *P. syringae* pv. *tabaci*, a superexpressão dos transgenes *AdEXLB8* e *AsNBSG29* foi capaz de inibir o amarelecimento e necrose comumente relatados após a infecção com este patógeno.

Contudo, faz-se necessária a realização de mais experimentos com os transgenes estudados no presente trabalho, com mais repetições dos tratamentos, a fim de verificar de forma exata os efeitos de sua superexpressão na resposta de resistência.

Além disso, pôde-se constatar que a expressão transiente em folhas destacadas de tabaco é efetiva na pré-seleção e validação in planta de genes de resistência, devido à sua rapidez e praticidade, se comparado ao processo longo e laboroso de obtenção de plantas transgênicas com expressão estável de transgenes.

## 7. REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. Introduction. **Plant pathology**. 4th ed. San Diego: Academic Press, p.3-41, 1997.

ALVES, L. R. Impacto dos metais pesados em solos agrícolas e a comunicação do estresse da raiz para a parte aérea. 2016.

ANDRADE, G. M. de; SARTORETTO, Laudete M.; BRASILEIRO, Ana. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 465-476, 2003.

BEGCY, K. et al. A Novel Stress-Induced Sugarcane Gene Confers Tolerance to Drought, Salt and Oxidative Stress in Transgenic Tobacco Plants. **Plos One**, [s. /], 11 set. 2012.

BERBERT, P. S. et al. Expression of a sphingomyelinase-coding gene from *Trichoderma harzianum* conferred bacterial tolerance in tobacco. **Plant Pathology**, v. 71, n. 5, p. 1048-1055, 2022.

BRASILEIRO, A. C. de M.; CARNEIRO, VT de C. Manual de transformação genética de plantas. **Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen**, 1998.

BRASILEIRO, A. C. de M. et al. Ectopic expression of an expansin-like B gene from wild *Arachis* enhances tolerance to both abiotic and biotic stresses. **The Plant Journal**, v. 107, n. 6, p. 1681-1696, 2021.

CARES E. J. e LOPES C. M. Nematologia no contexto internacional e brasileiro: ameaças à sustentabilidade da agricultura e à segurança alimentar. Temperado, Embrapa Clima. "Anais do 35 Congresso Brasileiro de Nematologia." (2018).

CHU, Y. et al. A technique to study *Meloidogyne arenaria* resistance in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed peanut. **Plant Disease**, v. 98, n. 10, p. 1292-1299, 2014.

COLLANGE, B. et al. Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: The challenge of an agronomic system analysis. **Crop protection**, v. 30, n. 10, p. 1251-1262, 2011.

CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento. "Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, safra 2020/21." *Boletim da safra de grãos* 8: 1-97, 2021.

COSGROVE, D. J. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature**, v. 407, n. 6802, p. 321-326, 2000.

COSGROVE, D. J. Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. **Current opinion in plant biology**, v. 25, p. 162-172, 2015.

DA SILVA, R. A. et al. Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. **Embrapa Agrobiologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2008.

DE ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. da S.; CONTE, H. Controle biológico por insetos parasitoides em culturas agrícolas no Brasil: Revisão de literatura. **Uningá Review**, v. 22, n. 2, 2015.

CAMPOS, A. J. de M; SANTOS, S. M; NACARATH, I. R. F. F. Estresse hídrico em plantas: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e311101523155-e311101523155, 2021.

DE OLIVEIRA, V. F. et al. Tolerância à salinidade no arroz brasileiro: Uma visão geral da variabilidade genética. XXI ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

DEYOUNG, B. J.; INNES, Roger W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. **Nature immunology**, v. 7, n. 12, p. 1243-1249, 2006.

EISENBACK, J. D; TRIANTAPHYLLOU, Hedwig Hirschmann. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: **Manual of agricultural nematology**. CRC Press, 2020. p. 191-274.

EMBRAPA HORTALIÇAS (Brasília). **Doenças causadas por nematoides**. [S. l.], dez. 2006. Disponível em: [https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustriaI\\_2ed/doencas\\_nema.htm](https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustriaI_2ed/doencas_nema.htm). Acesso em: 6 mai. 2022.

EMBRAPA HORTALIÇAS (Brasília). **Doenças causadas por nematoides**. [S. l.]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/hortalicas/tomate-de-mesa/doencas-causadas-por-nematoides>. Acesso em: 8 jun. 2022.

FERNANDES, C. de F. et al. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. **Embrapa Rondônia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.

FERRAZ, L. C. C. B., and D. J. F. Brown. "Nematologia de plantas: fundamentos e importância." *Manaus: Norma Editora* 1 (2016): 251.

FREITAS, F. de O.; PEÑALOZA, A. del P.; VALLS, José Francisco Montenegro. O amendoim contador de história. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2003.

GOMES, L. M. Co. Caracterização parcial de análogos de genes de resistência em duas espécies de eucalipto. 2005.

GUIMARÃES, P. M. et al. Global transcriptome analysis of two wild relatives of peanut under drought and fungi infection. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 1-15, 2012.

GUIMARAES, P. M. et al. Root transcriptome analysis of wild peanut reveals candidate genes for nematode resistance. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0140937, 2015.

HAFEZ, Y. M. et al. Up-regulation of antioxidants in tobacco by low concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suppresses necrotic disease symptoms. **Phytopathology**, v. 102, n. 9, p. 848-856, 2012.

HASSAN, M. Auwal et al. Nematodes threats to global food security. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B–Soil & Plant Science**, v. 63, n. 5, p. 420-425, 2013.

HILU, K. W.; STALKER, H. T. Genetic relationships between peanut and wild species of *Arachis* sect. *Arachis* (Fabaceae): Evidence from RAPDs. **Plant Systematics and Evolution**, v. 198, n. 3, p. 167-178, 1995.

HOLLOWAY, B. W. Genetics of *Pseudomonas*. **Bacteriological reviews**, v. 33, n. 3, p. 419-443, 1969.

HOSSAIN, Z; NOURI, M.; KOMATSU, S. Plant cell organelle proteomics in response to abiotic stress. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 1, p. 37-48, 2012.

JARABA-NAVAS, J.; ROTHROCK, C. S.; KIRKPATRICK, T. L.; "Influence of the soil texture on the interaction between *Meloidogyne incognita* and *Dielaviopsis basicola* on cotton," *Phytopathology*, vol. 97, p. S51, 2007.

JONES, J. DG; DANGL, J. L. The plant immune system. **nature**, v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006.

KADO, C. I. et al. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, n. 6, p. 969-976, 1970.

KAMESWARA RAO, N.; REDDY, L. J.; BRAMEL, P. J. Potential of wild species for genetic enhancement of some semi-arid food crops. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, n. 7, p. 707-721, 2003.

KIM, E. et al. Effects of soil textures on infectivity of root-knot nematodes on carrot. **The plant pathology journal**, v. 33, n. 1, p. 66, 2017.

KOMATSU, S.; HOSSAIN, Z. Organ-specific proteome analysis for identification of abiotic stress response mechanism in crop. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 71, 2013.

KUMAR, K. R. R.; KIRTI, P. B. Differential gene expression in *Arachis diogeni* upon interaction with peanut late leaf spot pathogen, *Phaeoisariopsis personata* and characterization of a pathogen induced cyclophilin. **Plant molecular biology**, v. 75, n. 4, p. 497-513, 2011.

LELLIOTT, R. A.; BILLING, E.; HAYWARD, A. C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. **Journal of applied bacteriology**, v. 29, n. 3, p. 470-489, 1966.

LEÓN, J.; ROJO, E.; SÁNCHEZ-SERRANO, J. J. Wound signalling in plants. **Journal of experimental botany**, v. 52, n. 354, p. 1-9, 2001.

MICHEREFF. S. J.; Conceito e história da Fitopatologia. Universidade Federal Rural de Pernambuco.

LUO, M. et al. Generation of expressed sequence tags (ESTs) for gene discovery and marker development in cultivated peanut. **Crop Science**, v. 45, n. 1, p. 346-353, 2005.

MINGOSSI, F. B. **Estudo dos perfis transcricionais em resposta ao estresse biótico e abiótico em cana-de-açúcar**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MACHADO, A. C. Z. Machado. Ataques de nematoides custam R\$ 35 bilhões ao agronegócio brasileiro. **Revista Agrícola**, [s. l.], 16 nov. 2016. Disponível em: <http://www.ragricola.com.br/ataques-de-nematoides-custam-r-35-bilhoes-ao-agronegocio-brasileiro/>. Acesso em: 8 abr. 2022.

MARTINS, A. C. Q. et al. Transcriptome responses of wild *Arachis* to UV-C exposure reveal genes involved in general plant defense and priming. **Plants**, v. 11, n. 3, p. 408, 2022.

MOENS, M. et al. Meloidogyne species—a diverse group of novel and important plant parasites. **Root-knot nematodes**, v. 1, p. 483, 2009.

MUKHTAR, T. et al. Evaluation of resistance to root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in okra cultivars. **Crop Protection**, v. 56, p. 25-30, 2014.

NOJOSA, G. B. de A.; RESENDE, M. L. V.; RESENDE, A. V. Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, v. 1, n. 1, p. 139-153, 2005.

REED, J.; OSBOURN, A. Engineering terpenoid production through transient expression in *Nicotiana benthamiana*. **Plant cell reports**, v. 37, n. 10, p. 1431-1441, 2018.

PALLERONI, N. J. Pseudomonas classification. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 64, n. 3, p. 231-251, 1993.

PATERNIANI, E. Agricultura sustentável nos trópicos. **Estudos avançados**, v. 15, p. 303-326, 2001.

PEREIRA, B. M. Análise da superexpressão de genes candidatos à resistência a *Meloidogyne* spp. em raízes transgênicas de amendoim e soja. 2017.

PROITE, K. Busca de genes envolvidos na resistência de amendoim silvestre ao nematóide das galhas (*Meloidogyne arenaria*). 2007.

QUIRINO, B. F. et al. Proteomic approaches to study plant–pathogen interactions. **Phytochemistry**, v. 71, n. 4, p. 351-362, 2010.

RITZINGER, C. H. S. P.; FANCELLI, M.; RITZINGER, R. Nematoides: bioindicadores de sustentabilidade e mudanças edafoclimáticas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 1289-1296, 2010.

RHODEN, S. A. *et al.* Aspectos Físicos, Químicos e Genéticos na Interação Patógeno Planta Hospedeira. **RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT**, [s. l.], v. 14, ed. 1, 8 fev. 2019.

RODRIGUES, F. ENGENHARIA GENÉTICA NA AGRICULTURA: MERCADO, BENEFÍCIOS, APROVAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS GENETIC ENGINEERING IN AGRICULTURE: MARKET, BENEFITS, APPROVALS AND FUTURE PERSPECTIVES.

ROESE, A. D. ARTIGO: Como as doenças de plantas funcionam. Embrapa Agropecuária Oeste, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/62870955/artigo-como-as-doencas-de-plantas-funcionam>. Acesso em: 12 abr. 2022.

SANTOS, B. A origem e a importância dos insetos como praga das plantas cultivadas. **Universidade Federal do Paraná–SCB**, 2011.

SECRETARIAT, I. P. P. C. *et al.* **Scientific review of the impact of climate change on plant pests**. FAO on behalf of the IPPC Secretariat, 2021.

SILVA, G. S. Contribuição à taxonomia do gênero *Arachis*-secção *Arachis* à luz do estudo de espécies e híbridos interespecíficos. 2008.

SUBEDI, S; THAPA, B.; SHRESTHA, J. Root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and its management: a review. **Journal of Agriculture and Natural Resources**, v. 3, n. 2, p. 21-31, 2020.

SUBRAMONI, S. *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 322, 2014.

TRAORE, S. M. *et al.* *Nicotiana* species as surrogate host for studying the pathogenicity of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbits. **Molecular plant pathology**, v. 20, n. 6, p. 800-814, 2019.

VALE, F. X. R.; PARLEVLIT, J. E.; ZAMBOLIM, L. Conceitos em resistência de plantas a doenças. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 577-589, 2001.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 55, n. 2, p. 85-97, 1999.

WARSI, M. K.; HOWLADAR, S. M.; ALSHARIF, M. A. Regulon: Uma visão geral do sistema regulador da transcrição do estresse abiótico em plantas e papel nas plantas transgênicas. **Brazilian Journal of Biology** , Embrapa Rondônia, 16 mar. 2021.

XIN, X.; KVITKO, Brian; HE, S. Y. Pseudomonas syringae: what it takes to be a pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 316-328, 2018. YIGEZU WENDIMU, G. Biology, taxonomy, and management of the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in sweet potato. **Advances in Agriculture**, v. 2021, 2021.

Young, J. M. "Taxonomy of *Pseudomonas syringae*." *Journal of plant pathology* (2010): S5-S14.

ZUPAN, J. et al. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. **The plant journal**, v. 23, n. 1, p. 11-28, 2000.