

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

LEONARDO FERREIRA DA SILVA



EXPRESSÃO DE OXALATO DESCARBOXILASE DE *Flammulina* sp. EM
Nicotiana tabacum INDUZ RESISTÊNCIA A NEP II DE *Moniliophthora*
perniciosa E OXALATO

ILHÉUS - BAHIA
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LEONARDO FERREIRA DA SILVA

**EXPRESSÃO DE OXALATO DESCARBOXILASE DE *Flammulina* sp. EM
Nicotiana tabacum INDUZ RESISTÊNCIA A NEP II DE *Moniliophthora*
perniciosa E OXALATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Área de Concentração: Melhoramento de Plantas e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa.

**ILHÉUS - BAHIA
2010**

LEONARDO FERREIRA DA SILVA

EXPRESSÃO DE OXALATO DESCARBOXILASE DE *Flammulina* sp. EM
Nicotiana tabacum INDUZ RESISTÊNCIA A NEP II DE *Moniliophthora*
perniciosa E OXALATO

Ilhéus, BA, 05/07/2010.



Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa - DS
DCB/UESC
(Orientador)



Dr. Carlos Priminho Pirovani - DS
DCB/UESC



Dr. Francisco José Lima Aragão - DS
EMBRAPA/CENARGEN



Dr. Ronan Xavier Corrêa - DS
DCB/UESC

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, Márcia e Eurico,
pelo exemplo de luta e perseverança.**

*“Jamais considere seus estudos uma obrigação,
mas uma oportunidade invejável...
para aprender a conhecer a
influência libertadora da beleza do reino do espírito,
para seu próprio prazer pessoal e
para proveito da comunidade a qual
seu futuro trabalho pertencer.”*

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fidelidade e misericórdia.

Aos meus pais e irmã, pelo amor incondicional.

A Eng^a Shymena Guedes, pelo auxílio, força, incentivo e amor.

Ao professor e orientador Dr. Márcio Costa, pelos ensinamentos, pela disponibilidade, paciência, e por acreditar no desafio.

À Dr^a. Fabiene Michelli e Dr^a Karina Peres Gramacho pelo incentivo e orientação.

Ao Dr. Ernane Ronie Martins e Dr^a Lourdes Silva Figueiredo, (UFMG) pelos vastos ensinamentos e eterna amizade.

Ao professores Ronan Corrêa, Júlio Cascardo e Dário Ahnert, pela compreensão.

Ao PPGPV, pela oportunidade.

Aos colegas da Proteômica Cristiano e Juliano, pelas imprescindíveis contribuições e auxílio.

Aos amigos Júnea, Marília, Emerson, Igor e Vinícius pelo especial apoio durante todo tempo.

Em especial à amiga e conterrânea Luciana Cidade, pelo auxílio, ensinamentos paciência.

Aos colegas e amigos que tive o prazer em conhecer através do LCT, Jamilly, Laís, Carol, Fabiana, Amanda, Lívia Tharcilla e Tahise.

E a todos que de perto ou mesmo de muito longe torcem e acreditam que “vai dar certo!!!”

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	12
1.INTRODUÇÃO	14
2.OBJETIVOS	17
2.1 Geral.....	17
2.2 Específicos	17
3.REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1. O cacauero	18
3.2. Aspectos bioquímicos e moleculares da interação planta-patógeno	19
3.3. O patossistema cacau- <i>M. perniciosa</i>	22
3.4. Envolvimento do oxalato de cálcio no patossistema cacau- <i>M. perniciosa</i>	25
3.5. Bioquímica da síntese e degradação do ácido oxálico em plantas.....	27
3.6. Oxalato descarboxilase (OXDC).....	29
3.7. Proteínas NEP	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1. Material biológico.....	37
4.1.1. Obtenção de plantas de <i>N.tabacum</i>	37
4.1.2. Estirpe de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e plasmídeo	37
4.2. Transformação genética de <i>N. tabacum</i>	38
4.3. Enraizamento e aclimação das plantas transformadas.....	39
4.4. Caracterização molecular	40
4.4.1. Extração de DNA genômico	40
4.4.2. PCR.....	40
4.4.3. Análise de expressão do gene <i>oxdc</i> nas plantas transgênicas pela técnica da RT-PCR	41
4.5. Caracterização bioquímica	41
4.5.1. Degradação e produção de ácidos orgânicos envolvidos na atividade de OXDC em plantas transgênicas de <i>N. tabacum</i>	41

4.6. Teste de resistência das plantas transgênicas ao ácido oxálico.....	42
4.7. Ensaio de resistência das plantas transgênicas a proteína NEP II de <i>M. pernicios</i>	43
4.8. Teste de acúmulo de H ₂ O ₂	44
5. RESULTADOS.....	45
5.1. Obtenção de plantas transgênicas de <i>N. tabacum</i>	45
5.2. Análise da expressão do gene <i>oxdc</i> em plantas transgênicas	47
5.3. Análise da funcionalidade do gene <i>oxdc</i> nas plantas transgênicas	48
5.4. Resistência das plantas transgênicas ao ácido oxálico	50
5.5. Resistência das plantas transgênicas a NEPII de <i>M. pernicios</i>	52
5.6. Detecção in situ de H ₂ O ₂	54
6. DISCUSSÃO	56
6.1. Obtenção e caracterização molecular e bioquímica das plantas transgênicas de <i>N. tabacum</i>	56
6.2. Plantas transgênicas de <i>N. tabacum</i> para o gene <i>oxdc</i> apresentam resistência ao Ácido Oxálico.....	56
6.3. Plantas transgênicas de <i>N. tabacum</i> para o gene <i>oxdc</i> apresentam resistência a NEP II de <i>M. pernicios</i>	58
6.4. Plantas transgênicas de <i>N. tabacum</i> apresentam resistência a fatores que induzem explosão oxidativa.....	61
6.5. A explosão oxidativa pode ser a causa de efeito maior no processo de morte celular em tecidos infectados por <i>M. pernicios</i>	62
7. CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

RESUMO

SILVA, Leonardo Ferreira da, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, julho de 2010. **Expressão de oxalato descarboxilase de *Flammulina* sp. em *Nicotiana tabacum* induz resistência a NEP II de *Moniliophthora perniciosa* e oxalato.** Orientador: Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa. Co-orientadores: Dra. Fabienne Michelli e Dra. Karina Peres Gramacho.

O declínio da cacauicultura baiana ocorreu na última década, devendo-se principalmente ao ataque da vassoura-de-bruxa, causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (Stahel). Com o advento de novas tecnologias, ações que visam reduzir os efeitos causados pelo patógeno têm sido intensificadas, principalmente no que se refere à elucidação dos mecanismos bioquímicos e genéticos que modulam a interação cacau-*M. perniciosa*. Trabalhos prévios demonstraram que alguns compostos estão diretamente relacionados com esse patossistema, como a proteína NEP (*Necrosis and Ethylene-Inducing Proteins*) do fungo e a presença de cristais de oxalato de cálcio em tecidos infectados, possivelmente envolvidos no processo de explosão oxidativa na célula vegetal. A oxalato descarboxilase (OXDC) é uma enzima produzida por fungos e bactérias que cataliza a degradação do ácido oxálico, a forma solúvel de oxalato, em ácido fórmico e CO₂, compostos não tóxicos para as plantas. A expressão transgênica de OXDC em plantas tem demonstrado conferir resistência a fitopatógenos que utilizam ácido oxálico/oxalato como mecanismo de patogenicidade. No presente estudo, plantas de *Nicotiana tabacum* foram transformadas com o gene *oxdc* de *Flammulina* sp. com o objetivo de avaliar o seu efeito na resistência das plantas a fatores que induzem a morte celular em tecidos infectados por *M. perniciosa*. Experimentos de transformação genética mediada por *Agrobacterium* permitiram a obtenção de 12 linhagens transgênicas de *N. tabacum*, representando eventos de transformação distintos. Caracterizações moleculares e bioquímicas das plantas confirmaram a inserção e expressão do gene *oxdc* em todas as linhagens obtidas, bem como a sua funcionalidade em

degradar ácido oxálico. A análise da resistência das plantas a adição de ácido oxálico a 20mM demonstrou que as linhagens transgênicas apresentaram sintomas de estresse menos severos do que as plantas controle (não-transformada). Quanto a avaliação da resistência a NEPII de *M. perniciosa*, o gene *oxdc* foi capaz de conferir resistência a proteína, inoculada a $1,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, em todas as linhagens transgênicas avaliadas. O gene *oxdc* também foi capaz de inibir a formação de ROS em plantas transgênicas inoculadas tanto com ácido oxálico quanto com MpNEPII, separadamente ou em conjunto. Coletivamente, os resultados obtidos no presente estudo confirmam o potencial do gene *oxdc* em conferir resistência a *M. perniciosa* e sugerem ainda que a explosão oxidativa, provocada tanto por MpNEPII como pela degradação de oxalato pela oxalato oxidase endógena, pode ser o efeito principal no processo de morte celular em tecidos infectados pelo fitopatógeno.

Palavras chave: Oxalato descarboxilase, NEPII, *Moniliophthora perniciosa*, Análise funcional

ABSTRACT

SILVA, Leonardo Ferreira da, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, July 2010. **Expression of the oxalate decarboxylase from *Flammulina* sp. in *Nicotiana tabacum* induce resistance to NEP II by *Moniliophthora perniciosa* and oxalate** Advisor: Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa. Committee members: Dr. Fabiene Michelli and Dr. Karina Peres Gramacho.

The decline of the cacao production in Bahia occurred in the last decade, mainly due to the attack of the witches broom disease, caused by the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa* (Stahel). With the advent of new technologies, actions aiming to reduce the effects caused by the phytopathogen have been intensified, mainly those related to the clarification of the genetical and biochemical mechanisms that modulate the interaction cacao-*M. perniciosa*. Previous works have demonstrated that some compounds are directly related with this pathosystem, including NEP (Necrosis and Ethylene-Inducing Proteins) and calcium oxalate crystals, possibly involved in the process of oxidative burst in the plant cell. Oxalate decarboxylase (OXDC) is an enzyme produced by fungi and bacteria that catalyzes the degradation of oxalic acid in CO₂ and formic acid, compounds that are non-toxic to the plants. Transgenic expression of OXDC in plants has shown to confer resistance against phytopathogens that use oxalic acid/oxalate as a pathogenicity mechanism. In the present study, plants of *Nicotiana tabacum* were transformed with *oxdc* from *Flammulina* sp., aiming to evaluate its effect in the resistance of plants against the factors that induce programmed cellular death in tissues infected by *M. perniciosa*. Experiments of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation allowed the obtention of 12 transgenic lines, representing distinct transformation events. Molecular and biochemical characterizations of the plants confirmed the insertion and expression of OXDC in all transgenic lines, as well as its functionality in to detoxify oxalic acid. Analysis of the resistance of the plants to the application of 20 mM oxalic acid showed that the transgenic plants displayed stress symptoms less severe than the non-transformed plants. In the

evaluation of the resistance to NEPII of *M. perniciosa*, *oxdc* was able to confer resistance to 1,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ MpNEPII in all transgenic plants evaluated. *oxdc* was also able to inhibit ROS formation in the transgenics plants inoculated with oxalic acid, MpNEP II, or the combination of both compounds. Collectively, the results obtained in the present study confirm the potential of *oxdc* to confer resistance against *M. perniciosa* and further suggest that the oxidative burst, triggered by both MpNEPII and calcium oxalate degradation by the endogenous oxalate oxidase, may be the key mechanism involved in programmed cell death of tissues infected by the phytopathogen.

Key words: Oxalate decarboxylase, NEPII, *Moniliophthora perniciosa*, functional analysis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Catabolismo do ácido oxálico pela enzima oxalato oxidase, 29 formando dióxido de carbono e peróxido de hidrogênio.....
- Figura 2:** Estrutura enzimática da OXDC evidenciando a característica 30 bicupin e o sítio de ligação com o manganês.....
- Figura 3:** Catabolismo do ácido oxálico pela enzima oxalato descarboxilase 30 OXDC de *F. velutipes*, gerando como subprodutos ácido fórmico, CO₂ e H₂O.
- Figura 4:** Relações evolutivas para a produção de OXDC entre fungos..... 32
- Figura 5:** Modelo da estrutura a baixa resolução (20 Å) da MpNEP I 35 utilizando o programa DAMM.....
- Figura 6:** Modelo da estrutura a baixa resolução (20 Å) obtido para MpNEP II 35 mediante utilização do programa DAMMIN.....
- Figura 7:** Mapa do vetor pCambOXDC utilizado em experimentos de 38 transformação genética de *N. tabacum*.....
- Figura 8:** Obtenção de linhagens transgênicas de *N. tabacum*. **A)** Processo de regeneração *in vitro* das linhagens transgênicas com ênfase nas etapas de regeneração de brotos e enraizamento. **B)** Diagnóstico de integração do 45 T-DNA em plantas de tabaco via PCR utilizando oligonucleotídeos para os genes *hptII*.e *oxdc*.....

Figura 9: Expressão do gene <i>oxdc</i> em plantas transgênicas de <i>N. tabacum</i> . A) Amplificação dos fragmentos dos genes <i>oxdc</i> e 18S rRNA em plantas transgênicas via RT-PCR B) Abundância relativa da expressão de <i>oxdc</i> nas diferentes linhagens transgênicas avaliadas.....	47
Figura 10: – Quantificação do ácido oxálico em folhas de plantas transgênicas e controle (não-transformada) de <i>N. tabacum</i> , 24 h após a inoculação de 20 mM de ácido oxálico.....	48
Figura 11: Detecção de ácido fórmico em folhas de <i>N. tabacum</i> após inoculação com ácido oxálico a 20 mM durante 24h.....	49
Figura 12: Inoculação de diferentes concentrações de ácido oxálico em folhas de plantas não-transformadas de <i>N. tabacum</i>	50
Figura 13: Inoculação de 20 mM de ácido oxálico (24h) em plantas controle (C- e C+) e transformadas de <i>N. tabacum</i>	51
Figura 14: Inoculação de 20 mM de ácido oxálico (48h) em plantas controle e transformadas de <i>N. tabacum</i>	51
Figura 15: Folhas de plantas de <i>N. tabacum</i> 24 h após a inoculação de MpNEPII.....	53
Figura 16: Avaliação da perda do conteúdo de água em folhas de plantas de <i>N. tabacum</i> , 96 h após a inoculação com 1,4 mM de MpNEP II.....	54
Figura 17: Produção de peróxido de hidrogênio em tecido foliar de <i>N. tabacum</i> inoculado com 20 mM de ácido oxálico, 0,5 µM de MpNEP II e a combinação dos fatores nas mesmas concentrações	55

1. INTRODUÇÃO

A região sul do estado da Bahia proporciona à cultura do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) condições edafoclimáticas ideais para seu desenvolvimento e produção, o que tornou a região a principal produtora de cacau do Brasil, chegando a responder por 95% da produção nacional, representando 50% das exportações do estado (TEIXEIRA et al., 2002). Entretanto, por volta do ano de 1989, a doença conhecida por vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo basidiomiceto hemibiotrófico *Moniliophthora* (= *Crinipellis*) *perniciosa* (Stahel) Aime & Philips-Mora, que é endêmico da região Amazônica, se instalou nas áreas produtoras de cacau no sul da Bahia trazendo perdas incalculáveis na produção (PEREIRA et al., 1990). Anteriormente a doença já havia provocado colapso produtivo e econômico em regiões cacauzeiras do Suriname, Trindad e Equador (ANDEBRHAN et al., 1988). No Sul da Bahia a severidade de abrangência da doença se deve ao fato de que a extensa área contínua cultivada com cacau, sendo boa parte com cultivares tradicionais susceptíveis, associado a regularidade de distribuição das chuvas, favorece o surto de crescimento das plantas ao longo do ano, tornando propícias as condições para o rápido desenvolvimento e disseminação do fungo nas lavouras (DIAS, 2001).

Com o objetivo de minimizar os danos causados pelo patógeno, várias são as medidas desenvolvidas por pesquisadores e adotadas por produtores. Dentre as principais, se destacam o controle químico, podas fitossanitárias, controle biológico e o melhoramento genético (LEAL JÚNIOR, 2006). Desde a década de 1990, a poda fitossanitária associada ao controle genético já era adotada como a medida mais eficaz de manejo pela maioria dos países produtores de cacau da Amazônia (ANDERBRHAN et al., 1993). Programas de melhoramento de cacauzeiros já deram os primeiros resultados, produzindo clones com diferentes graus de resistência à doença e alta produtividade. No entanto, considerando a variabilidade do patógeno e o número restrito de acessos com características de resistência, a obtenção de novas fontes de resistência ao *M. perniciosa* tem sido umas das prioridades dos programas de

melhoramento conduzidos pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira -

CEPLAC (LEAL JÚNIOR, 2006).

Diante das restrições apresentadas por cada uma dessas medidas, estudos de biologia molecular e engenharia genética surgem como importantes ferramentas na investigação de mecanismos desencadeados na interação cacau-*M. perniciosa*. O sequenciamento de bibliotecas de interações cacau-*M. perniciosa* (GESTEIRA et al., 2007) permitiram a identificação de sequências homólogas a genes conhecidos por conferir resistência a fitopatógenos, tais como o da proteína de ligação a selênio (selenium binding protein – SBP) e o gene MLO, modulador de defesa e morte celular programada (ZHOU et al., 2002; SAWADA et al., 2004). Vários outros genes descritos na literatura e disponíveis para pesquisa são conhecidos por conferir resistência a fitopatógenos e apresentam potencial para estudos de resistência à vassoura-de-bruxa. Dentre esses, inclui-se o gene da oxalato descarboxilase (OXDC), primeiramente isolado do basidiomiceto *Flammulina velutipes*, que possui a capacidade de catalizar a degradação do ácido oxálico em ácido fórmico e dióxido de carbono (MEHTA; DATTA, 1991). Estudos têm demonstrado a capacidade desse gene em a conferir resistência de plantas de tabaco, tomate e alface ao fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (AZAN et al., 2000; DIAS et al., 2006). O envolvimento do ácido oxálico no processo de interação compatível entre cacau-*M. perniciosa* tem sido confirmado em estudos prévios (VILLELA DIAS, 2007). Portanto, *oxdc* apresenta-se como um gene candidato de resistência ao fitopatógeno *M. perniciosa*.

No presente estudo, plantas transgênicas de *N. tabacum* contendo o gene *oxdc* foram obtidas e caracterizadas em nível molecular e bioquímico. Todas as linhagens transgênicas analisadas expressaram o gene *oxdc* e foram capazes de degradar o ácido oxálico. A análise dos efeitos da inoculação de ácido oxálico e proteína NEP II de *M. perniciosa* nas plantas transgênicas demonstraram a resistência das plantas a ambos os fatores envolvidos no processo de interação cacau-*M. perniciosa*. As plantas transgênicas mostraram redução dos sintomas típicos de estresse oxidativo causados por esses fatores, quando inoculados separadamente ou em combinação, apresentando

consequentemente maior resistência a necrose. Os resultados obtidos reforçam o potencial do gene *oxdc* em conferir resistência ao *M. perniciosus*.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo geral do presente estudo foi introduzir o gene *oxdc* de *Flammulina velutipes* em plantas de *Nicotiana tabacum* e avaliar a resistência das plantas transgênicas a fatores que induzem morte celular em tecidos infectados por *Moniliophthora perniciosa*.

2.2. Específicos

- Produzir linhagens geneticamente modificadas de *N. tabacum* contendo o gene *oxdc* de *F. velutipes* e caracterizá-las em nível molecular e bioquímico;
- Analisar a resistência das plantas transgênicas ao ácido oxálico (OxA) e a proteína NEPII de *M. perniciosa* (MpNEPII);
- Analisar a reação das plantas transgênicas ao estresse oxidativo causado por OxA, MpNEPII e a combinação de ambos os fatores;
- Determinar a viabilidade do uso do gene *oxdc* em experimentos de transformação genética de *Theobroma cacao*, visando avaliar sua funcionalidade na interação cacau-*M. perniciosa*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O cacauero

O cacauero (*Theobroma cacao* L) é um arbusto perene (4 a 8 m de altura), diplóide, contendo 20 cromossomos, pertencente à família Malvaceae e nativa das florestas tropicais úmidas da planície da bacia Amazônica, embora seu centro de diversidade se estenda por toda região da América central (PURDY; SCHMIDT, 1996). A domesticação da espécie ocorreu no período Pré-Colombiano por civilizações Astecas e/ou Maias, sendo os frutos amplamente utilizados desde como moeda de troca, produção de bebidas e em cerimônias religiosas (COE; COE 1996; MOTAMAYOR et al., 2002; EMCH, 2003). Existem dois grupos genéticos de cacauero originais: a Criollo, que está presente a oeste dos Andes e México, e a Forasteiro, presente no Brasil, leste da cordilheira dos Andes e Guianas. Um híbrido dessas duas espécies originou a variedade conhecida como Trinitário (MOTAMAYOR et al., 2002). Atualmente, a cultura do cacauero já é difundida entre os trópicos úmidos, sendo considerado de suma importância econômica para países do Pacífico, Sul da Ásia Oriental, Oeste e Central da África, Central e sul da América e Caribe (WOOD; LASS, 1985).

A amêndoa do fruto, quando fermentada, seca, torrada e prensada, fornece manteiga e massa de cacau, matérias primas fundamentais para a indústria de chocolates, confeitos e cosméticos, mercado que movimenta aproximadamente 56 bilhões de dólares por ano (PIASENTIN; KLARE-REPNIK, 2004)

No Brasil, há registros de que o cultivo do cacauero foi iniciado em 1711, no estado do Pará. Porém, a introdução da cultura na Bahia, se deu por volta do ano de 1746, com o plantio de algumas mudas as margens do rio Pardo, atual município de Canavieiras. Seis anos após, foram realizados os primeiros plantios no município de Ilhéus, de onde se iniciou a produção em larga escala, fazendo do estado da Bahia o maior produtor nacional do fruto (GUERREIRO; PARAÍSO, 2001). Proporcionalmente, além da cultura representar umas das principais atividades econômicas para a região, possui ainda um importante caráter conservacionista do ponto de vista agroecológico.

Isso se deve às práticas de cultivo em consórcio com outras plantas sob o sistema Cabruca, que se caracteriza pela implantação da lavoura no interior dos fragmentos de Mata Atlântica nativa, em função da importância do sombreamento e da umidade, requeridos pelo cacauzeiro. Essa atividade desestimula o desmatamento desordenado para implantação de culturas de menor valor econômico, permitindo a lavoura funcionar como corredor de passagem da fauna silvestre (ALGER; CALDAS, 1996), contribuindo para a manutenção e aumento da biodiversidade e agrobiodiversidade regional.

No ano de 1989, houve o primeiro registro para o fungo *M. pernicioso* em lavouras cacauzeiras na região sul da Bahia, provocando desde então, perdas expressivas de produção da commodity, e transformando o Brasil de exportador de cacau em importador do produto (SUMÁRIO, 2003). Essa situação, associada a queda dos preços internacionais do produto, afetou consideravelmente a situação sócio-econômica e o equilíbrio ecológico das regiões produtoras do fruto no país, onde cerca de 2,5 milhões de pessoas dependem dessa atividade (GARCIA, 2007).

3.2. Aspectos bioquímicos e moleculares da interação planta-patógeno

A co-evolução das plantas e dos microrganismos fitopatogênicos tem resultado em mecanismos de comunicação mútua cada vez mais sensíveis e versáteis, que se iniciam logo após o contato entre patógeno-hospedeiro. Essa comunicação intervém grande variedade de sinais físicos e químicos (elicitores), que dão origem a uma série de transdução de sinais capazes de induzir a expressão de vários genes, tanto da planta quanto do patógeno, induzindo a uma resposta de resistência ou a susceptibilidade, em função do tipo da interação e condições ambientais (KOLATTUKUDY, 1995).

Originalmente, o termo elicitor foi utilizado para moléculas que possuíam a capacidade de induzir a produção de fitoalexinas. Atualmente, o termo é comumente utilizado para denominar compostos que estimulem qualquer forma de defesa da planta, podendo pertencer a um grande número de diferentes classes de compostos, incluindo oligossacarídeos, peptídeos, proteínas e lipídeos (MONTESANO et al., 2003). Elicitores atuam em baixas concentrações

em nível celular como compostos sinalizadores, e estão envolvidos em diversos processos de resposta a estresses ambientais (HAHN et al., 1996).

Um dos primeiros eventos detectáveis após a interação planta-patógeno é o fluxo de íons através da membrana plasmática, provocando uma explosão do metabolismo oxidativo, levando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que por sua vez ativam genes de defesa e a produção de metabólitos antimicrobianos (MACMILLAN, 2002). O ácido salicílico (AS) e o óxido nítrico (NO) potencializam as repostas dependentes de ROS. Outros eventos iniciais descritos durante a interação planta-patógeno são o influxo de Ca^{2+} , a fosforilação/desfosforilação de proteínas e a síntese de proteínas relacionadas com patogenicidade (MAYER et al., 2001). A colonização parasítica de plantas por patógenos acontece através de uma reprogramação do sistema de defesa da planta mediante proteínas efetoras da doença que são secretadas pelo patógeno (HUITEMA et al., 2004). Dependendo do alvo do efector, estes podem ser classificados em (i) efetores apoplásticos (secretados no espaço extracelular da planta onde interagem com moléculas-alvo extracelulares e/ou receptores de superfície) ou (ii) efetores citoplasmáticos (translocados dentro das células da planta mediante estruturas especializadas como vesículas e haustórios) (KAMOUN, 2006). Como uma medida defensiva, as células do hospedeiro podem reconhecer moléculas-chave do patógeno e iniciar o processo de morte celular evitando a disseminação e limitando a propagação da infecção para células sadias (NIMCHUK et al., 2003).

A resistência hospedeiro-específica (*host resistance*) é a resistência do cultivar ou genótipo quando baseado na teoria gene-a-gene, descrita em 1955 por H. H Flor, constituindo a base molecular da interação planta-patógeno, resultando no reconhecimento dos genes *avr* (avirulence) do patógeno pelas proteínas oriundas dos genes *R* (Resistance) da planta hospedeira. Nesse caso, é dito que ocorre uma interação incompatível, pois o produto dos genes *R* e *Avr* são complementares, tornando-se o patógeno avirulento e a planta resistente. Algumas proteínas *Avr* são efetoras de patogenicidade, podendo suprimir a ação de proteínas de defesa vegetal. A fim de que o patógeno obtenha sucesso na colonização do hospedeiro, ele precisa quebrar a barreira física para a colonização, e produzir proteínas e fitotoxinas que inativam ou bloqueiam a defesa da planta. Alguns exemplos são AVR2 e AVR4 de

Cladosporium fulvum e AvrBs3 de *Xanthomonas* sp e coronatina de *Pseudomonas syringae*. AVR4 é produzido pelo patógeno *C. fulvum* no momento que ocorre sua interação com o hospedeiro. Essa molécula se liga à quitina da parede celular do fungo, protegendo-a contra ação de quitinases produzidas pelo hospedeiro, garantindo assim sua integridade celular e aumentando sua virulência contra o hospedeiro (VAN LOON et al., 2006). A Resposta de hipersensibilidade (HR) constitui a resposta local primária de plantas a patógenos, geralmente associada com a resistência a doenças (STASKAWIEZ et al., 1995). O processo de morte celular programada pode estar relacionado também com susceptibilidade a doenças promovendo a disseminação e agressividade de patógenos necrotróficos (GREENBERG, 2004).

A classificação dos microrganismos fitopatogênicos em biotrófico e necrotrófico se dá em função do modo de obtenção de nutrientes. Patógenos biotróficos vivem e obtêm nutrientes de tecidos vivos, enquanto necrotrófico matam e se alimentam de tecido morto (AGRIOS, 1997). No entanto, alguns patógenos possuem as duas formas de nutrição, que varia com o estágio da infecção e o grau de especificidade entre patógeno e hospedeiro, estes denominados de hemibiotróficos.

A resistência mediada pelos genes *R* é associada com a ativação da via de sinalização que leva a produção de proteínas relacionadas a patogenicidade (*Pathogenesis related – PR*), que desencadeiam a resposta HR, estando relacionada principalmente a mecanismos de infecção de patógenos biotróficos. Por outro lado, patógenos necrotróficos que se beneficiam da morte celular do hospedeiro não são limitados pela resposta HR, sendo os mecanismos de defesa desencadeados por um conjunto de respostas ativadas pela sinalização por ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) (GLAZEBROOK, 2005).

Os fitormônios apresentam um papel importante na sinalização das respostas das plantas na interação com microrganismos. As plantas produzem uma grande variedade de hormônios que possuem papéis importantes no desenvolvimento e metabolismo, assim como nas respostas a estresses bióticos e abióticos. As infecções resultam em mudança no nível dos fitormônios e os fitopatógenos têm desenvolvido mecanismos para manipular

essa rede regulatória em seu benefício, produzindo compostos análogos de forma a burlar o sistema de defesa do hospedeiro e/ou facilitar a patogênese (BARI; JONES, 2009). Embora as vias de defesa relacionadas a AS e AJ/ET serem geralmente antagônicas, a interação é mediada por diferentes reguladores, como a proteína NPR1 (SPOEL et al., 2007), o fator de transcrição WRKY 70 (LI et al., 2003) e a proteína quinase MP4 (BRODERSEN et al., 2006), sugerindo que a rede de sinalização de defesa ativada e utilizada pela planta é dependente da natureza do patógeno e do seu modo de patogenicidade (BARI; JONES, 2009).

No tocante aos mecanismos de ação de patógenos hemibiotróficos, o complexo ambiente molecular que se estabelece com o hospedeiro inicia-se na superfície da folha. Uma estratégia geral de fungos na fase biotrófica consiste em invadir tecidos do hospedeiro causando o mínimo de danos nas células da planta, gerando uma relação estável fungo-planta (GARCIA, 2007). PANSTRUGA (2003) observou que na presença de um fungo biotrófico, as respostas de defesa induzidas são fracas ou transientes. Essa tolerância ao patógeno sugere que a entrada nos tecidos da planta é acompanhada pela supressão microbiana das respostas de defesa do hospedeiro e/ou da morte da célula.

Organismos que permanecem na fase biotrófica durante longo tempo causam mudanças nos padrões de translocação de nutrientes dentro da planta, tornando o sítio de infecção num dreno nutricional essencial para o fungo acessar às reservas do hospedeiro, sendo essa disponibilidade de nutrientes um fator fundamental na infecção patogênica (MAYER, 2001).

3.3. O patossistema cacau- *M. pernicioso*

Desde o declínio da cacauicultura no sul da Bahia, causado pela introdução do basídiomiceto *M. pernicioso* em áreas produtoras, provocou esforços concentrados de diversas instituições, com o objetivo de desenvolver estudos que visam minimizar os efeitos causados pelo fungo, principalmente no que se refere à elucidação dos mecanismos bioquímicos e genéticos que modulam a interação planta-patógeno.

Em função da complexidade do processo de interação entre cacau-*M. pernicioso* e do alto nível de dano econômico e social provocado pelo patógeno, foi iniciado no ano 2001 o projeto genoma de *M. pernicioso* (<http://www.lge.ibi.unicaMp.br/vassoura>), com o objetivo de identificar genes que codifiquem proteínas potencialmente relacionadas com o desenvolvimento da doença (GARCIA, 2007). Dentre as várias informações obtidas, a análise do genoma de *M. pernicioso* revelou através de bioinformática, que uma porção significativa do genoma do fungo está envolvida na adaptação a estresses e necrose do tecido vegetal (MONDEGO et al., 2008), confirmando a alta especificidade da interação cacau- *M.pernicioso*. Os resultados desses trabalhos permitiram a formulação de um modelo para o mecanismo de ação do patógeno, na tentativa de compreender a biologia do fungo, assim como a natureza da interação com o seu hospedeiro natural *Theobroma cacao*.

M. pernicioso penetra nos tecidos em desenvolvimento mediante a germinação dos basidiósporos sobre a cutícula ou na base dos tricomas, emitindo tubos germinativos que penetram nos tecidos (EVANS, 1979). As hifas do fungo se desenvolvem no apoplasto celular onde liberam uma série de elicitores, que ativam vários mecanismos de respostas da planta, como o aumento considerável das espécies reativas de oxigênio e a produção de etileno.

A partir de uma desordem fisiológica/hormonal, provocada pela colonização do fungo em sua fase biotrófica, ocorre na planta infectada uma hipertrofia dos tecidos e um crescimento desordenado de brotos, criando o aspecto de uma vassoura (vassoura verde). Após o início da necrose dos ramos infectados denominados de vassouras secas, em torno de dois meses após a infecção, ocorre a mudança de fase de vida do fungo (de biotrófico para necrotrófico), quando se dá a dicarionização dos micélios. Por ser um fungo homotático, essa transição ocorre sem a necessidade do cruzamento entre indivíduos. Depois da completa colonização nos tecidos mortos, o micélio necrotrófico dá origem aos basidiocarpos, que após períodos de seca e chuva, produzem basidiósporos, que ao serem levados pela água ou vento, reiniciam o ciclo de vida do fungo. A liberação dos basidiósporos acontece durante a noite, provavelmente pela sensibilidade dos esporos à luz ultravioleta (CEITA et al., 2007). Somente na fase necrotrófica do fungo, e em condições de alta

umidade, os basidiósporos podem ser produzidos. Visto que a proliferação do fungo depende de períodos alternados de seca e umidade, esse fungo se estabeleceu muito bem no estado da Bahia, que possui condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento de basidiósporos durante o ano todo (FRANCO, 2008).

Vários trabalhos confirmam que o mecanismo de resistência observado em plantas de *T. cacao* contra *M. perniciosa* caracteriza-se pela contenção do crescimento micelial no material resistente e na manutenção dos sintomas manifestados pela doença (FRIAS et al., 1995; SILVA et al., 1999). Resultados de estudos histológicos de tecidos de plantas de *T. cacao* infectadas por *M. perniciosa* revelaram um crescimento abundante de micélio em materiais susceptíveis infectados, e uma correlação parcial entre menor colonização de tecidos e a resistência determinada pela menor incidência da doença. Os componentes de resistência podem ser evidenciados pelo estudo da expressão de genes envolvidos na resposta de defesa. Os genes da resposta de defesa podem ser classificados como envolvidos no reconhecimento do patógeno e no mecanismo de defesa propriamente dito. Os genes responsáveis pelo reconhecimento e transdução de sinal são considerados como genes de resistência, já os genes de defesa codificam para proteínas relacionadas com a patogênese (HAMMOND-KOSACK., 1996). A função dos genes responsáveis pela defesa é conter a invasão, o crescimento e a reprodução do patógeno no interior da planta. A avaliação da indução desses genes pode indicar quando e como os genes estão atuando. Em cacau, genes associados à resistência e defesa foram identificados em bibliotecas de ESTs de folhas e sementes, e bibliotecas obtidas a partir de folhas tratadas com elicitores de resistência do tipo Benzothiadazole (BHT), etileno, metil jasmonato e NEP 1- elicitor protéico purificado de *Fusarium oxysporium* (VERICA et al., 2004). A geração de ESTs da interação *T. cacao* x *M. perniciosa* foi primeiramente reportada por GESTEIRA et al. (2007), utilizando meristemas infectados de duas diferentes variedades de cacau, uma suscetível (Catongo) e outra resistente (TSH 1188), gerando cerca de 6884 sequências correspondentes a 2926 consensos de sequências únicas (unigenes). LEAL JÚNIOR (2007) obteve 187 unigenes das variedades ICS 39 (genótipo suscetível) e CAB 214 (resistente) de cacau, utilizando a abordagem de bibliotecas SSH. Genes Análogos de Resistência

(GAR) e genes de defesa também foram buscados, utilizando a abordagem de amplificação com iniciadores degenerados para regiões conservadas de transcrição, para posterior localização nos mapas genéticos. A construção de bibliotecas SSA também tem se mostrado eficiente na obtenção de sequências relativas a resposta de defesa ao organismo com qual interage (FERNANDEZ et al., 2004; LU et al., 2004). No entanto, devido a baixa representatividade de genes do patógeno nas bibliotecas, a probabilidade de identificar esses genes do patógeno torna-se difícil. Uma forma direcionada para a identificação de genes potencialmente responsáveis pela virulência e patogenicidade seria através do conjunto de genes induzidos no cultivo *in vitro* sob falta de carbono ou nitrogênio, induzindo a ativação de genes expressados durante a patogênese, que apresentam na região promotora locais para acoplamento de fatores de transcrição ligados ao metabolismo de nitrogênio (LEAL JR, 2006).

3.4. Envolvimento do oxalato de cálcio no patossistema cacau- *M. perniciosa*

Estudos recentes evidenciaram um envolvimento do oxalato de cálcio (OxCa) durante o processo de Morte Celular Programada (PCD), etapa presente na interação compatível entre *T. cacao* x *M. perniciosa*. CEITA et al. (2007) observaram um expressivo incremento de cristais de OxCa em células de cacau durante o processo de infecção de cultivares susceptíveis no período de 33 dias após a inoculação (DAI) com esporos do patógeno. No entanto, 55 DAI houve um rápido decréscimo de COC nos tecidos infectados, comprovando a associação com a progressão dos sintomas da vassoura-de-bruxa. A alteração no fluxo de íons (influxo de Ca^{2+} e afluxo de K^+ e Cl^-) através da membrana está intimamente relacionada com a alteração do conteúdo de Ca na célula e corresponde a uma das respostas mais antigas descritas como respostas de plantas ao ataque por patógenos. Com o aumento do efluxo de cálcio intracelular, ocorre um incremento do cálcio citosólico (CHRISPEELS et al., 1999). A união subsequente de cálcio e calmodulina, quinases, fosfatases, fosfolipases, nucleases e proteinases dependentes de Ca^{2+} facilita a transmissão de sinal dirigido para a ativação de uma resposta celular específica (BLUMWALD et al., 1998).

Vários trabalhos já apresentaram o envolvimento do oxalato em interações planta-patógeno. CESNNA et al. (2000), avaliando os mecanismos fisiológicos do ácido oxálico durante a infecção por *Sclerotinia sclerotiorum*, observaram que a explosão oxidativa é suprimida na presença do oxalato produzido pelo fungo. Por outro lado, linhagens mutantes de *S. sclerotiorum* não patogênicas, deficientes na produção do oxalato, foram incapazes de induzir a explosão oxidativa no hospedeiro. Observações indicam que os efeitos inibitórios do oxalato são em maior parte independente de sua acidez e afinidade para o cálcio, podendo inibir uma etapa de sinalização relacionada a ativação da oxidase de influxo de Ca^{2+} para o citosol. Especulações a respeito do mecanismo ou dos mecanismos de que a secreção do oxalato pode realçar a virulência de *Sclerotinia* centra-se atualmente em três mecanismos de ação. Primeiramente, porque diversas enzimas de fungos secretadas durante a invasão de tecidos de planta (ex.: poligalacturonase) têm atividades máximas em baixo pH. Segundo, porque o oxalato pode ser diretamente tóxico às plantas hospedeiras, presumivelmente por causa de sua acidez, a secreção do oxalato foi sugerida enfraquecer a planta, facilitando desse modo a invasão. Finalmente, a quelatação do Ca^{2+} pelo ânion oxalato foi proposta comprometer função do Ca^{2+} durante respostas dependentes da defesa e enfraquecer a parede celular da planta.

Apesar de vários relatos sobre o envolvimento do oxalato em patossistemas, até 2007 não haviam registros do acúmulo de cristais de oxalato de Ca na interação cacau- *M. pernicioso*. Observações em estudos de microscopia de varredura sugerem que o fungo inicialmente poderia produzir cristais de oxalato de cálcio, que posteriormente seriam degradados devido ao aumento dos níveis de oxalato oxidase produzido pela planta (GARCIA et al., 2007). No entanto, CEITA et al. (2007) sugeriram que o influxo intenso de cálcio para o citoplasma desencadeado pela infecção do *M. pernicioso* nas células de cacau pode levar ao seu acúmulo, e conseqüente deposição em forma de cristais de oxalato de cálcio intracelulares. A formação de cristais de OxCa em células de plantas pode funcionar como remoção do cálcio excedente. Dessa forma, não pode ser considerado um processo simples de precipitação, mas sim o resultado de alterações iônicas induzidas por estresse, tal como invasão por patógenos (FRANCESCHI; HONER, 1980). O oxalato

mecanismo que explicaria o envolvimento do oxalato de Ca na patogenicidade não é totalmente conhecido. No entanto, alguns autores afirmam que o oxalato provoca uma diminuição do pH apoplástico, criando um ambiente propício para o aumento da atividade de enzimas celulolíticas e pectinolíticas secretadas pelo fungo, ambas envolvidas na degradação da parede celular da planta (BATEMAN; BEER, 1965). Além disso, o composto poderia quelatar os íons de Ca^{2+} , comprometendo a atividade das respostas de defesa dependente deste elemento. Estudos do genoma de *M. pernicioso* permitiram a identificação de genes codificadores para enzimas de detoxificação do peróxido durante a fase biotrófica, permitindo minimizar os efeitos do estresse oxidativo mediante o desligamento da cadeia principal de transporte de elétrons e a ativação da oxidase alternativa e catalases para detoxificação (CABRERA, 2007).

3.5. Bioquímica da síntese e degradação do ácido oxálico em plantas

O ácido oxálico constitui um dos mais fortes ácidos orgânicos, com valores pKa entre 1,3 a 4,3, sendo comumente utilizado como reagente analítico, além de possuir grandes aplicações industriais e domésticas, que variam desde utilização como descorante na manufatura do couro até componente de soluções para remoção de tintas e verniz. A ocorrência e distribuição do oxalato na natureza é ampla, incluindo animais e fungos. Em plantas, as concentrações mais elevadas do oxalato ocorrem nas folhas e em nível mais baixo nas raízes, podendo variar com a estação, o clima e as condições edáficas. Plantas como ruibarbo (*rhabarbarum Rheum*) tendem a aumentar o conteúdo de oxalato quando maduras. No entanto, outras espécies como espinafre, beterraba e banana possuem um alto incremento de oxalato nos estágios iniciais de desenvolvimento, seguido de um decréscimo em função do amadurecimento (LANE, 1994). O consumo humano de plantas ricas em ácido oxálico pode conduzir a hiperoxalúria, que é reconhecido como um fator de risco para a formação de pedras de oxalato de cálcio. Além disso, a entrada do ácido ascórbico do organismo aumenta os níveis urinários do oxalato, que poderiam conduzir à formação de cálculos renais e em outras regiões do sistema urinário.

Estudos anteriores sobre ácidos orgânicos de plantas, incluindo o ácido oxálico suportaram evidências de que a produção deste ácido estaria relacionada com a fotossíntese e o metabolismo de carboidratos. No entanto, experimentos com ruibarbo e begônia indicaram que o ácido oxálico não é diretamente produzido partir da fotossíntese, mas sim sintetizados a partir de precursores da rota fotossintética (ÇALISKAN, 1998).

Várias rotas são propostas para a biossíntese do ácido oxálico em plantas. A formação do ácido orgânico pode se dar a partir da oxidação do glicolato pela ação da enzima glicolato oxidase, ou pela oxidação do oxaloacetato e do ácido ascórbico. O ácido ascórbico utilizado é formado diretamente no interior das células que comportam COC, chamadas de idioblastos (NAKATA, 2003), e configura-se como o principal precursor do ácido oxálico em *T. cacao* (VILLELA DIAS et al., 2007)

O oxalato pode apresentar-se na forma solúvel, como ácido oxálico, ou insolúvel, sob a forma de cristais de oxalato de cálcio (OLIVEIRA et al., 2003). Diversas funções foram propostas para explicar a presença do ácido oxálico nas plantas. Sugeriu-se que o ácido oxálico pode estar relacionado com o equilíbrio iônico, pela capacidade de se ligar a vários íons, formando compostos solúveis e insolúveis. Outra hipótese seria que a síntese do oxalato ocorre para balancear o excesso de cátions inorgânicos (K^+ , Na^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}) sobre ânions (NO_3^- , Cl^- , $H_2PO_4^-$, SO_4^{2-}). A conversão do ácido oxálico em COC também pode ter a função de controle da homeostase celular, a partir da remoção do Ca excedente (ÇALISKAN, 1998).

O processo de degradação do oxalato de Ca em plantas se dá através de oxidação a partir da enzima oxalato oxidase (OXO). A enzima pertence à família das proteínas germin e catalisa a degradação em CO_2 e H_2O_2 (LANE et al., 1993) (Figura 1). Vários trabalhos presentes na literatura demonstram o envolvimento da OXO no aumento de resistência a fitopatógenos (LIANG et al., 2001; LIVINGSTONE et al., 2005). O fluxo de íons através da membrana plasmática provoca uma explosão do metabolismo oxidativo, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS), que por sua vez atuam na ativação de genes de defesa e produção de metabólitos antimicrobianos (MACMILLAN, 2002). A formação de peróxido de hidrogênio, produzido a partir da degradação

do oxalato de Ca pode resultar em níveis tóxicos para a planta e até mesmo para o fungo.

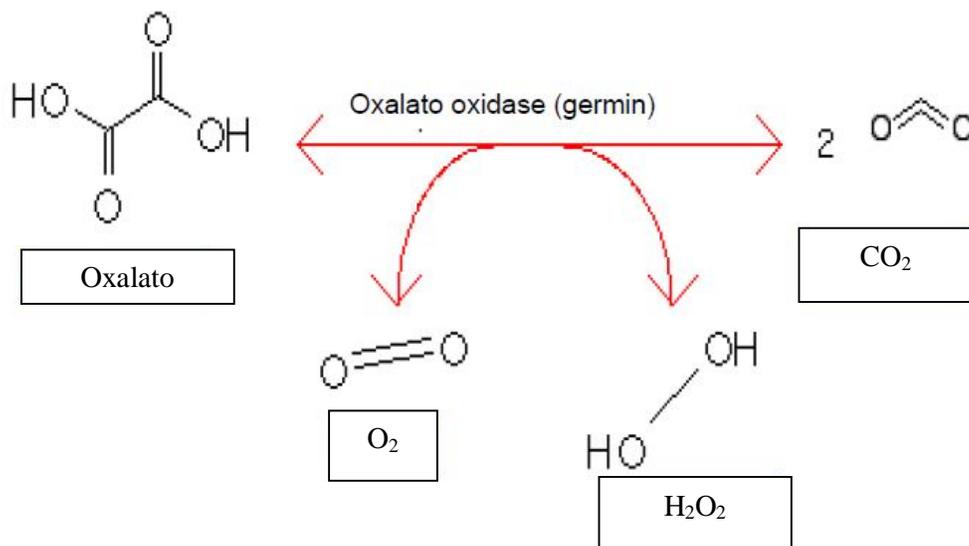


Figura 1 – Catabolismo do ácido oxálico pela enzima oxalato oxidase, formando dióxido de carbono e peróxido de hidrogênio. (Adaptado de CEITA, 2004).

3.6. Oxalato descarboxilase (OXDC)

A oxalato descarboxilase (EC 4.1.1.2) é uma enzima dependente de manganês, com massa molecular de 420 kD presente apenas em fungos e bactérias, que catalisa a conversão do oxalato em formato e dióxido de carbono, seguindo uma proporção equimolar (JAKOBY et al., 1956; KESARWANI et al., 2000, SVEDRUZ'IC' et al., 2005). Sua estrutura revela uma hexâmero simétrico, em que cada monômero pertence à família de proteínas cupin (Figura 2) (ANAND et al., 2002). A enzima é classificada como uma bicupin, visto que possui duas dobras cupin, possivelmente resultante de duplicação gênica. Cada domínio cupin de OXDC contém um sítio de ligação de manganês e é estruturalmente semelhante aos domínios da oxalato oxidase. Quatro resíduos de ligação a manganês (três histidinas e um

glutamato) são conservados, assim como o número de resíduos hidrofóbicos. A diferença mais notável é a presença de Glu333 no sítio de ligação ao metal do segundo domínio cupin de OXDC. Foi postulado que esse domínio é responsável pela atividade descarboxilase e que Glu333 serve como um doador de prótons na produção do formato (ANAND et al., 2002). A função dos outros domínios de OXDC ainda é desconhecida.

A figura 3 demonstra resumidamente o catabolismo do ácido oxálico através da OXDC, gerando CO₂ e ácido fórmico como subprodutos, compostos não tóxicos para plantas, compreendendo, portanto uma rota de alto interesse em estudos de interação planta-patógeno.

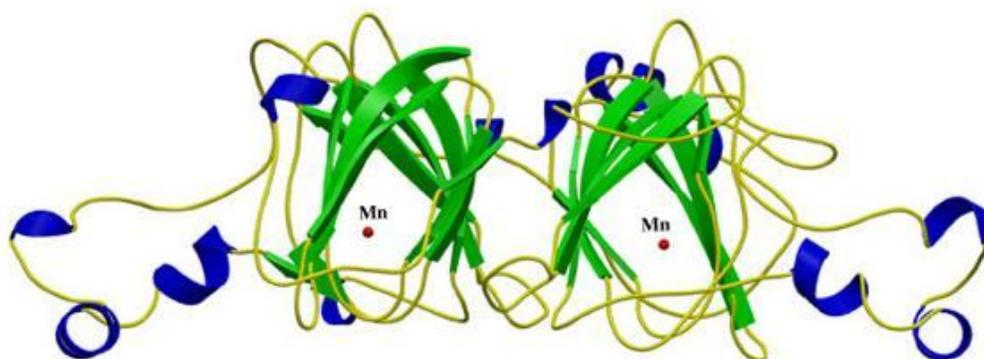


Figura 2 – Estrutura enzimática da OXDC evidenciando a característica bicupin e o sítio de ligação com o manganês. Adaptado de ANAND et al. (2002).

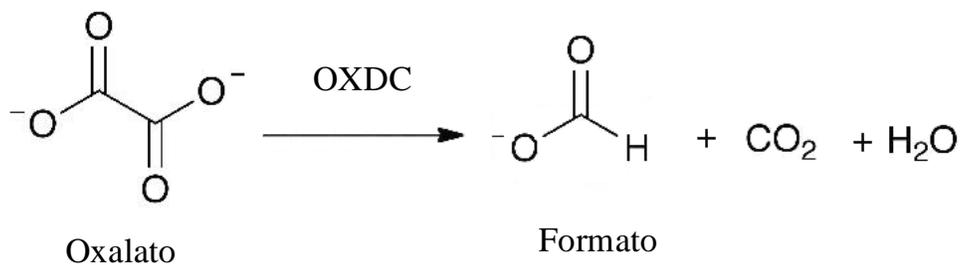


Figura 3 – Catabolismo do ácido oxálico pela enzima oxalato descarboxilase (OXDC) de *F. velutipes*, gerando como subprodutos ácido fórmico, CO₂ e H₂O.

Oxalato Descarboxilases produzidas por fungos são induzidas pela presença de ácido oxálico no meio, e estão diretamente relacionadas com a regulação dos teores intra e extracelulares do composto, que é um dos componentes chave do processo de patogenicidade e/ou colonização do hospedeiro. Alguns autores sustentam a hipótese de que a função principal da OXDC em fungos seria impedir níveis elevados de ácido oxálico intracelular, controlando desse modo o excesso de secreção do ácido. Foi sugerido que OXDC degrada o ácido oxálico extracelular com o objetivo de manter estável os níveis de pH e ânions de oxalato fora das hifas do fungo, propiciando um ambiente ideal para a colonização do patógeno e desenvolvimento da doença (MEHTA; DATTA, 1991; DUTTON et al., 1994).

Vários gêneros de fungos são capazes de produzir OXDC, tais como *Aspergillus* e *Sclerotinia*. (MEHTA; DATTA, 1991; KESARWANI et al., 2000). Essa enzima tem sido considerada como uma molécula de alto potencial agrícola, conferindo a plantas transgênicas resistência a fitopatógenos que provocam grande impacto na produção vegetal. Corroborando com essa teoria, DIAS et al. (2006) produziram plantas transgênicas de alface (*Lactuca sativa*) contendo OXDC de *F. velutipes*. As alfaces transgênicas apresentaram-se resistentes ao *S. sclerotiorum*, fungo responsável pela podridão da alface. A degradação do ácido oxálico em plantas pela rota da OXDC possui a vantagem de não produzir peróxido de hidrogênio como subproduto, suprimindo os efeitos negativos provocado pela explosão oxidativa em alguns processos de interação planta-patógeno. Foi sugerido ainda, que OXDC possui outros potenciais para utilização, como em ensaios clínicos com o ácido oxálico, redução dos níveis tóxicos do ácido em alimentos e outras aplicações biotecnológicas e ambientais.

Uma relação evolutiva entre os organismos capazes de degradar o ácido oxálico tem sido proposta (Figura 4). Recentemente, foi encontrado uma OXDC em *Dichomitus squalens*, sendo a regulação da excreção de OXDC nesse patógeno associada ao processo de degradação da lignina e colonização do hospedeiro (MÄKELÄ et al., 2009).

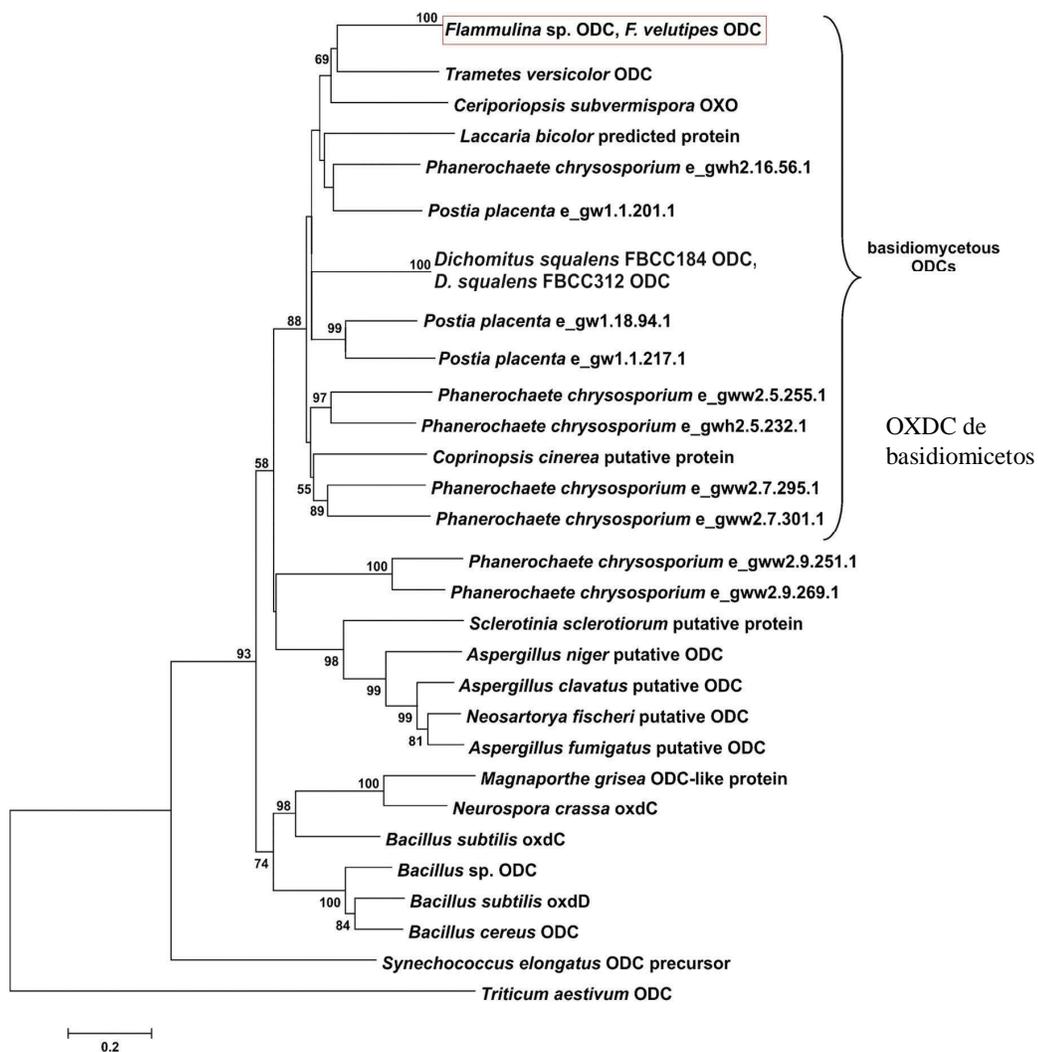


Figura 4 – Relações evolutivas para a produção de OXDC de origem microbiana. (Adaptado de MÄKELÄ et al., 2009).

3.7. Proteínas NEP

Durante o processo de interação planta-patógeno, diversos tipos de substâncias são produzidos por ambos os organismos em uma verdadeira competição bioquímica e genética, a qual geralmente varia entre a secreção de moléculas pelo patógeno e o reconhecimento pelo sistema de defesa da planta, levando a ativação de genes R e conseqüentemente uma resposta do hospedeiro. Alguns elicitores protéicos identificados em oomicetos,

ascomicetos e bactérias possuem a característica comum de induzir necrose no tecido vegetal (MACEDO, 2004). Inicialmente essas proteínas estariam relacionadas a uma transdução de sinal no hospedeiro, que induz a morte celular programada no local da infecção, inibindo a propagação das hifas e o acesso do patógeno a células saudáveis. No entanto, essa circunstância pode ser benéfica a patógenos necrotróficos, que adquiriram evolutivamente a habilidade de manipular a morte celular do hospedeiro em seu benefício (NIMCHUK IEULGEM., 2003; MAYER et al., 2001).

Um indutor de necrose foi identificado e purificado no fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum*, permitindo a obtenção de uma proteína de 24 kDa, cuja inoculação em folhas de *Erythroxylum coca* induziu necrose e aumento da produção de etileno (BAILEY, 1995). A proteína foi capaz de provocar os mesmos sintomas em uma ampla variedade de dicotiledôneas, incluindo *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* e *Theobroma cacao* (MATTINEN et al. 2004; JENNINGS et al., 2001; BAILEY et al., 2005). No entanto, os mesmos efeitos não foram observados em monocotiledôneas. A proteína nomeada Nep1 (**N**ecrosis and **E**thylene **I**nducing **P**rotein) e classificada como uma família nova de elicitores, pois após o sequenciamento não foi observado relação com nenhuma proteína ou domínio funcional conhecido (NELSON et al., 1998). Com o desenvolvimento dos métodos de análises de genômica e proteômica, proteínas semelhantes a Nep1 (NEP Like Proteins: NLPs) têm sido descritas em uma grande variedade de organismos procariotos (ex.: *Bacillus halodurans*, *Streptomyces coelicolor* e *Erwinia spp.*) e eucariotos (ex.: *Fusarium oxysporum*, *Neurospora crassa*, além dos gêneros *Phytium* e *Phytophthora*), expandindo rapidamente essa família de proteínas em termos de tamanho e distribuição.

Estudos recentes tem mostrado um envolvimento de NEPs no processo de interação cacau-*M. pernicioso*. A partir da análise do genoma do patógeno, foi possível identificar três genes codificadores para proteínas indutoras de necrose e etileno (NEPs) descritas em oomicetos, bactérias e alguns fungos ascomicetos (GARCIA, 2007). Os genes codificadores das proteínas NEP de *M. pernicioso* (MpNEPs) parecem estar localizados no mesmo cromossomo e foram nomeados em I e II (Figuras 5 e 6) (o terceiro gene está incompleto) em função da descoberta no genoma (I) ou em uma biblioteca de cDNA de

interação cacau-*M. perniciosa* (II). A clonagem e expressão dos genes codificadores para MpNEPs em sistema heterólogo permitiu a produção das proteínas purificadas em laboratório. MpNEP I e MpNEP II apresentaram alta similaridade em sua sequência de aminoácidos, e assim como outras NLPs, foram capazes de induzir necrose e síntese de etileno tanto em folhas de tabaco quanto em cacau (BAILEY et al., 2000 GARCIA et al., 2007). Ambas as MpNEPs apresentam perfis de expressão diferencial nas fases de vida do fungo, sendo MpNEP1 expressa de forma similar nas fases biotrófica e saprofítica e MpNEP2 expressa principalmente na fase biotrófica. Os exatos mecanismos pelo qual NLPs induzem necrose no tecido foliar não são totalmente conhecidos. No entanto, a ativação dessas proteínas provoca o influxo de Ca^{2+} para o interior da célula, diminuição do pH citosólico, acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), despolarização de membrana e alterações no metabolismo foliar, conduzindo a planta a ativação dos mecanismos de defesa ou a morte do tecido (BAE et al., 2006). Resultados preliminares da imunolocalização das MpNEPs em plantas de cacau mostram que essas se encontram no apoplasto de tecidos infectados. Além disso, parecem acumular externamente a parede de células mortas, sugerindo o forte envolvimento da proteína no processo de interação compatível cacau- *M. perniciosa* (GARCIA et al., 2007). Outra hipótese sugere que NLPs poderiam degradar componentes da parede celular e a necrose poderia ser uma consequência da resposta celular a este processo. JENNINGS et al. (2000) observaram a produção de peróxido de hidrogênio e consequentemente morte celular em cultura de células de tabaco inoculadas com diferentes concentrações de NEP1 extraída de *Fusarium oxysporum*, confirmando o envolvimento ativo dessa proteína na patogenicidade.

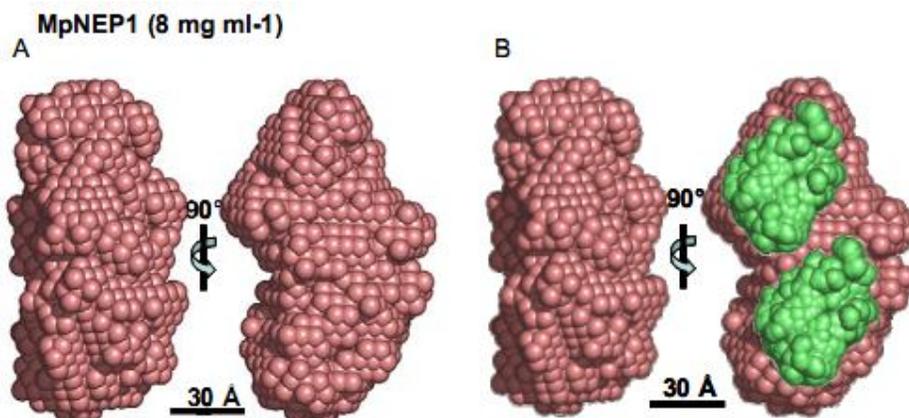


Figura 5 – Modelo da estrutura a baixa resolução (20 Å) da MpNEP I utilizando o programa DAMMIN (A); mesmo modelo com uma rotação de 90° (B). Sobreposição no modelo de dois monômeros da proteína fosfoglicose isomerase (B). Trinta Å é uma referência de tamanho da figura (adaptado de GARCIA, 2007).

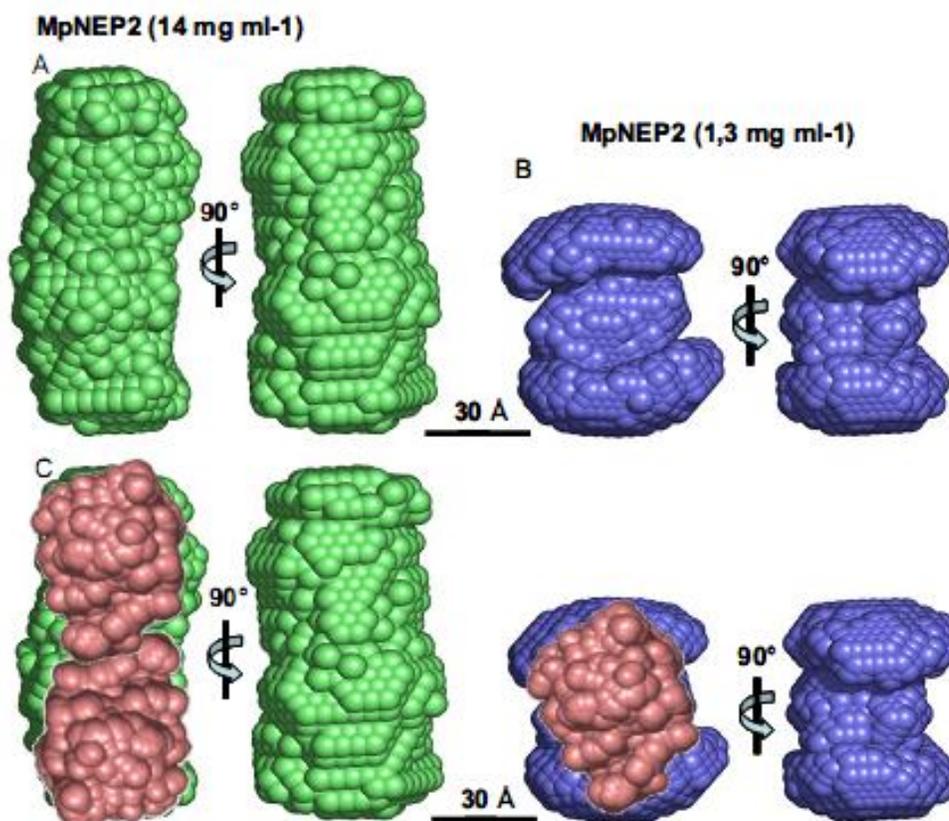


Figura 6 – Modelo da estrutura a baixa resolução (20 Å) obtido para MpNEP II mediante utilização do programa DAMMIN e com giro de 90°. (A) Modelo da

MpNEP II concentrada; (B) Modelo da MpNEP II a baixa concentração; (C) Sobreposição no modelo de dois e um monômeros (respectivamente) da proteína fosfoglicose isomerase tanto no modelo da MpNEP II concentrada (esquerda) quanto diluída (direita). 30 Å é uma referência de tamanho da figura (adaptado de GARCIA, 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material biológico

4.1.1. Obtenção de plantas de *N. tabacum*

Para obtenção de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), sementes da variedade Havana foram introduzidas no laboratório de cultura de tecidos do Centro de Biotecnologia e Genética -UESC para cultivo *in vitro*. Sob condições assépticas, as sementes foram esterilizadas utilizando-se uma solução de álcool etílico 70% (v/v) por um minuto, e solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v) por 2 minutos, seguido por três lavagens com água milli-Q autoclavada de 10 minutos cada. Posteriormente, as sementes foram germinadas em recipiente tipo Magenta® (Sigma Chemical Company, EUA), em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) meia-força, acrescido de vitaminas de Nitsch (NITSCH, 1969), 50 mg L⁻¹ de mio-inositol, 8 g l⁻¹ de ágar, pH 5,7. As sementes foram germinadas em sala de crescimento a 25± 2 °C, com fotoperíodo de 16:8 h (luz:escuro) e 35 µmol fótons m⁻² s⁻¹. As plantas obtidas foram mantidas sob condições de crescimento *in vitro*, em sala de crescimento, e utilizadas como fonte de explantes para os experimentos de transformação genética.

4.1.2. Estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* e plasmídio

A estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105, contendo o vetor pCambOXDC (Figura 7), foi gentilmente cedida pelo Dr. Francisco Aragão (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília). O vetor pCambOXDC contém os genes *hptII* (resistência ao antibiótico higromicina) e *oxdc* (oxalato descarboxilase de *Flammulina velutipes*), sob o controle do promotor constitutivo CAMV 35S duplicado, e uma sequência “enhancer” do alfafa mosaico vírus (AMV).

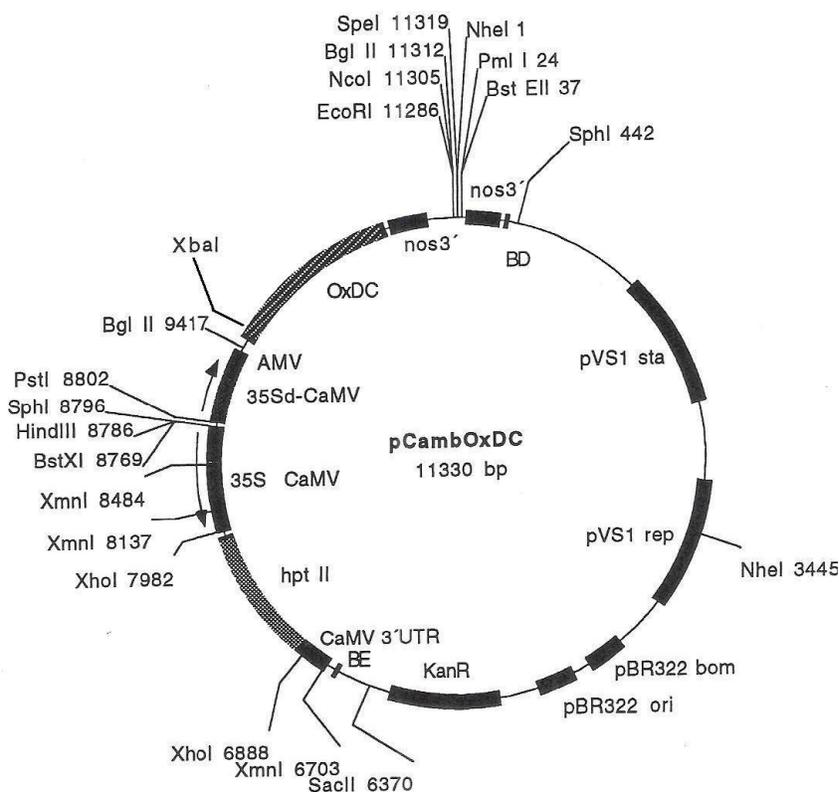


Figura 7 – Mapa do vetor pCambOXDC utilizado em experimentos de transformação genética de *N. tabacum*.

4.2. Transformação genética de *N. tabacum*

As folhas totalmente expandidas de plantas de *N. tabacum* crescidas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes para os experimentos de transformação genética, seguindo a metodologia descrita por BRASILEIRO e CARNEIRO (1998). Sob condições assépticas, as folhas foram excisadas das plantas e, com o auxílio de um bisturi, foram posteriormente cortadas em segmentos de aproximadamente 1 cm². Os explantes foram incubados, durante um período de 24 h, em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 30g l⁻¹ de sacarose, 100 mg l⁻¹ de

mio-inositol e 8 g l^{-1} de ágar (Sigma Chemical Company, EUA), pH 5,7. *A. tumefaciens* foi crescida em 50 ml de meio YEP contendo 50 mg L^{-1} do antibiótico canamicina, por 18h a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 220 rpm. Posteriormente, a cultura bacteriana foi centrifugada a 3.500 rpm, e $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspenso em meio MS-0 líquido e a densidade ótica das culturas foi lida em espectrofotômetro a 600 nm e posteriormente ajustada para 0,6 ($\text{OD}_{600} = 0,6$). Os explantes foram co-cultivados com solução de *Agrobacterium* por 15 minutos em temperatura ambiente, sob gentil agitação. Em seguida, a solução bacteriana foi descartada e o excesso de *Agrobacterium* foi removido colocando-se os explantes sobre papel toalha estéril. Posteriormente, os explantes foram transferidos para meio de co-cultivo (meio MS sólido sem antibióticos e hormônios de crescimento) onde permaneceram incubados por dois dias em sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e ausência de luz. Após esse período, os explantes foram transferidos para meio seletivo de indução de brotos. Esse meio foi composto de sais e vitaminas de MS, 5 mg L^{-1} de BAP, 10 mg L^{-1} de higromicina (Sigma Chemical Company, EUA) e 300 mg L^{-1} de timentim (Smith Kline Beecham Pharmaceuticals, EUA). Os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob temperatura de $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16:8 h (luz:escuro), sendo recultivados a cada 15 dias, até a emissão de brotos.

4.3. Enraizamento e aclimação das plantas transformadas

Os brotos diferenciados e alongados, com aproximadamente um centímetro de comprimento, foram excisados na base e transferidos individualmente para frascos tipo Magenta[®] (Sigma Chemical Company, EUA) contendo meio MS acrescido de 10 mg L^{-1} de higromicina e 300 mg L^{-1} de timentim, e mantidos sobre as mesmas condições de luz e temperatura descritas no item anterior. Os brotos foram recultivados a cada 15 dias até o desenvolvimento completo das raízes. Os brotos com sistema radicular desenvolvido foram transferidos para vasos contendo substrato agrícola autoclavado, e mantidos em câmara úmida com umidade relativa de aproximadamente 70% e temperatura entre 20 e $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 20 dias.

4.4. Caracterização molecular

4.4.1. Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico das plantas de tabaco foi realizada utilizando-se o método CTAB, conforme descrito por BRASILEIRO E CARNEIRO (1998). Aproximadamente 3 g de folhas de cada planta foram maceradas em presença de nitrogênio líquido. Após a adição de 1,5 ml de tampão de extração (2% de CTAB, 1,4 M de NaCl, 20 mM de EDTA, 100 mM de tris-HCl pH 8, 0,2% de β -mercaptoetanol, e 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de proteinase K), as amostras foram incubadas a 65 °C, por 40 minutos, e depois centrifugadas (microcentrífuga Eppendorf 5417 R) a 8.000 rpm por 10 minutos, recuperando-se o sobrenadante. Posteriormente, adicionou-se 800 μl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v), agitando-se as amostras durante 10 minutos, que em seguida foram centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos. Após a recuperação da fase superior, o passo anterior foi repetido por mais uma vez. A precipitação do DNA foi realizada utilizando-se 2 ml de etanol gelado a 70% (v/v). O DNA precipitado foi seco em câmara de fluxo laminar e ressuspendido em 50 μl de tampão TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8) contendo RNase livre de DNase (80 $\mu\text{g ml}^{-1}$). As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 min antes do seu armazenamento a -20 °C. O DNA total foi quantificado por espectrofotometria ($\text{ABS}_{260/280 \text{ nm}}$).

4.4.2. PCR

Com o objetivo de avaliar a inserção do gene OXDC nas plantas transgênicas de *N. tabacum*, foram realizadas análises de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para as sequências referentes aos genes *hptII* (*hpt* F: 5'-CTATTTCTTTGCCCTCGGACGCG3' e *hpt* R: 5'-ATGAAAAAGCCTGAACTCACCGC), e *oxdc* (*oxdc* 873: 5'-TGGGCTCGACAGAGGA-GAAG-3' e *oxdc* 371: 5'-CTCGGCAGCAGAAT-GAGGTC-3'), gerando fragmentos de 900 e 502 pb, respectivamente.

As reações de amplificação foram realizadas em volume de 25 μl , contendo 0,2 mM de cada dNTP, 0,25 mM de cada oligonucleotídeo, 0,2 U de Taq Polimerase e 100 ng de amostra de DNA. As reações foram amplificadas com uma desnaturação inicial de 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min,

62 °C (*hptII*) ou 53°C (OXDC) por 30 segundos, 72°C por 2 min; e uma extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e corados com brometo de etídio.

4.4.3. Análise de expressão do gene OXDC nas plantas transgênicas pela técnica da RT-PCR

O RNA total das folhas de fumo foi extraído pelo método fenol, conforme descrito por BRASILEIRO E CARNEIRO (1998). Em seguida, o RNA foi tratado com duas unidades da enzima DNase livre de RNase, sendo dissolvido no tampão para a DNase e incubado a 37°C. O RNA foi posteriormente recuperado por meio de precipitação com etanol. A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 5 µg de RNA total. Alíquotas de RNA foram tratadas com DNase I, mantendo a reação (10 µL de RNA total, 2,5 mmol l⁻¹ de cada dNTP, 20 U de inibidor de RNase, 0,1 µg µL⁻¹ de hexâmeros randômico e 200 U de *Transcriptase reversa*) a 37°C durante 60 minutos. Em seguida, a enzima foi inativada a 70°C por 10 minutos e depois a reação foi mantida em gelo. O cDNA obtido foi utilizado para detecção da expressão do gene OXDC, através da sua amplificação utilizando os oligonucleotídeos descritos no item anterior. Como controle endógeno, foram utilizados oligonucleotídeos referentes a sequência interna do 18S rRna (5'GAGCTAATACGTGCAACAAACC-3' e 5' AGGGAATTGCTCCTAGGTAA-3'). A abundância relativa de transcritos foi estimada através da quantificação da intensidade de sinal relativa a cada banda presente no gel resultante do PCR, utilizando o software KODAK 1D v 3.5, e posteriormente dividindo-se o resultado da intensidade da banda referente a amplificação de OXDC pela intensidade da banda 18s rRNA, em cada amostra.

4.5. Caracterização bioquímica

4.5.1. Degradação e produção de ácidos orgânicos envolvidos na atividade de OXDC em plantas transgênicas de *N. tabacum*

A avaliação da capacidade de degradação do ácido oxálico interno e, conseqüentemente produção de ácido fórmico, foi realizada através da

quantificação dos dois ácidos orgânicos nas plantas não-transformadas e transgênicas de *N. tabacum*. As amostras de folhas foram submetidas a inoculação *in vitro* com ácido oxálico a 20mM, por um período de 24 h em sala de crescimento, a 25 °C e 16:8 h de luz:escuro. Foram utilizadas 3 repetições por tratamento para obtenção dos dados de média e erro padrão. As análises foram realizadas conforme metodologia adaptada de HOLLOWAY et al. (1989). Cerca de 6 mg do material vegetal liofilizado e macerado foi suspenso em tampão de extração contendo 4 mmol l⁻¹ de H₂SO₄, 5 mmol l⁻¹ de DTT e 0,01% de PVPP a uma concentração de 10 mg L⁻¹. O material vegetal foi agitado no vortex e centrifugado a 14.000 rpm por 20 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado em filtro millipore com 0,45-µm de diâmetro de poro e cerca de 100 µl foi aplicado no HPLC para a análise de detecção do ácido oxálico e do ácido fórmico. Foi utilizada a coluna de exclusão iônica Bio-Rad AMINEX para determinação de ácidos orgânicos HPX-87, 300 x 7,8 mm, fase móvel H₂SO₄ 4 mM, com fluxo de 0,7 ml min⁻¹ e 25 °C, sistema automatizado de cromatografia líquida de alto desempenho ÄKTAbasic™ (GE HealthCare, EUA). Os dados de HPLC foram integrados e analisados em software UNICORN™ v 5.0. Os ácidos oxálico e fórmico foram mensurados a 210 mn. Alíquotas conhecidas dos dois ácidos foram utilizadas para construção da curva padrão.

4.6. Teste de resistência das plantas transgênicas ao ácido oxálico

Folhas fotossinteticamente ativas de plantas selvagens de *N. tabacum* foram testadas quanto à resistência a diferentes concentrações de ácido oxálico (OxA) em fase preliminar, visando a escolha da concentração ótima para os testes com as plantas transgênicas. A metodologia utilizada foi a descrita por KESARWANI et al. (2000) e consistiu na excisão das folhas, seguida por imersão imediata dos pecíolos em solução de OxA com pH ajustado para 4. As concentrações utilizadas no experimento foram 0; 20; 40; 60; 80 e 100 mM de OxA. O tratamento controle foi constituído pela imersão dos pecíolos das plantas não-transformadas (controle) em solução de tampão fosfato, pH 4. Foram utilizadas 3 repetições por tratamento e cada unidade experimental foi constituída por uma folha. As amostras foram mantidas em

sala de crescimento por 24h a 25 °C e 16:8 h de luz:escuro. Posteriormente, as plantas transgênicas e controle (não-transformadas) foram submetidas ao mesmo teste usando a concentração definida no teste preliminar.

4.7. Ensaio de resistência das plantas transgênicas a proteína NEP II de *M. perniciosa*

A proteína NEPII de *Moniliophthora perniciosa* (MpNEPII) foi obtida utilizando a metodologia descrita por MACÊDO (2004). A estirpe de *Escherichia coli* clonada com o gene responsável pela indução de necrose e produção de etileno foi produzida pela estudante de doutorado Joci Neuby Alves Macêdo (laboratório de Biologia Molecular da UESC), e as frações estoques purificadas da proteína, foram cedidas pelo estudante de doutorado Cristiano Villela Dias (Laboratórios de Genômica e Proteômica da UESC).

Folhas fotossinteticamente ativas de plantas de *N. tabacum* foram testadas quanto à resistência a NEPII do fungo *M. perniciosa in vitro*. A metodologia utilizada foi descrita por Garcia et al. (2007), com adaptações, e consistiu na excisão das folhas seguida por imersão imediata dos pecíolos em 1,4 µM de MpNEPII preparada em tampão fosfato, pH 6. As amostras foram submetidas à infiltração a vácuo por 20 minutos, visando o aumento da eficiência de ação da proteína, e posteriormente transferidas para sala de crescimento a 25 °C, sob 16:8 h de luz:escuro. Para esse estudo foram selecionadas as linhagens que apresentaram melhor desempenho nos testes anteriores. As avaliações foram realizadas a partir do início do aparecimento dos sintomas, até a morte completa do tratamento controle, que foi utilizado como referência. Foram utilizadas duas repetições por tratamento, que consistiu nas linhagens transgênicas. Cada folha representou uma unidade experimental.

Como forma de quantificar o efeito do gene OXDC na redução da morte celular provocada pela atividade de MpNEPII, outro experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar a perda de água pelas folhas das plantas submetidas ao estresse pela ação da proteína. O estudo foi conduzido sob as mesmas condições do experimento anterior. As amostras foram pesadas no período de 0 e 96 h após a inoculação com 1,4 µM de MpNEPII e a determinação da perda

de água foi realizada com base na diferença entre os valores da matéria fresca antes e após o estresse. Os resultados foram submetidos a análise estatística pelo teste t em nível de 1% de probabilidade

4.8. Teste de acúmulo de H₂O₂

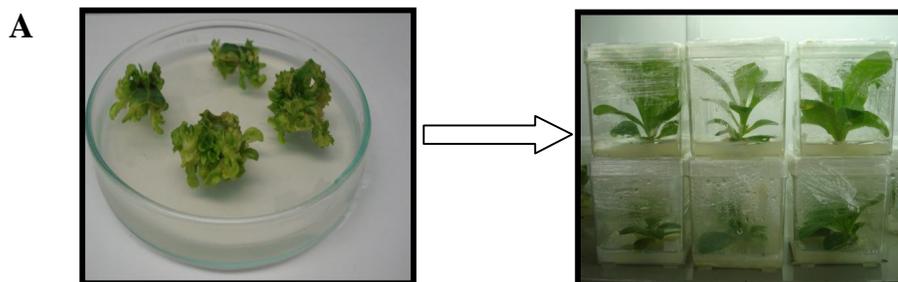
Para avaliar o envolvimento do gene OXDC na detoxificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em células sofrendo processo de morte celular, discos foliares de *N. tabacum* foram submetidos aos seguintes tratamentos: (i) solução contendo 0,5 µM de MpNEP II, (ii) ácido oxálico a 20 mM, pH 4, e (iii) aplicação simultânea de 0,5 µM de MpNEP II + ácido oxálico a 20mM, pH 4. As amostras foram submetidas a infiltração a vácuo com 1 mg ml⁻¹ de 3,3'-diaminobenzidina (DAB)-HCl, por 20 min. Em seguida, as amostras foram incubadas em sala de crescimento a 25 °C e 16:8 h de luz:escuro, por 24h. Após esse período, os discos foliares foram fervidos em etanol 96% por 20 min e posteriormente fotografados em lupa. Os tratamentos controles consistiram na infiltração de água destilada e água destilada + DAB em plantas transgênicas e controle (não-transformada).

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção de plantas transgênicas de *N. tabacum*

A transformação dos explantes de *N. tabacum* com o vetor pCambOXDC permitiu a obtenção de 12 linhagens transgênicas, representando eventos de transformação distintos. O início do cauleamento dos explantes submetidos ao meio de indução de brotos, suplementado com 5 mg L^{-1} de BAP, 10 mg L^{-1} de higromicina (Sigma Chemical Company, EUA) e 300 mg L^{-1} de timentim se deu a partir de 20 dias após a incubação em sala de crescimento. Posteriormente a etapa de formação dos brotos, foi realizada a individualização e transferência dos brotos para meio de alongamento. O crescimento da parte aérea e início da rizogênese se deu 30 dias após a transferência dos brotos para meio de alongamento. Dessa forma, com a metodologia utilizada, foi possível a obtenção de plantas completas por volta de 50 dias após a incubação dos explantes em solução de *Agrobacterium* (Figura 8A). Todas as plantas regeneradas em meio seletivo apresentaram fenótipo normal.

A natureza transgênica das plantas foi inicialmente determinada por meio de reações de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para amplificação dos genes *oxdc* e *hptII*. Para cada gel, uma banda de aproximadamente 500 e 900 kb, correspondente ao tamanho esperado dos fragmentos amplificados foram obtidas em todas as linhagens transgênicas de *N. tabacum* analisadas (Figura 8B e 8C).



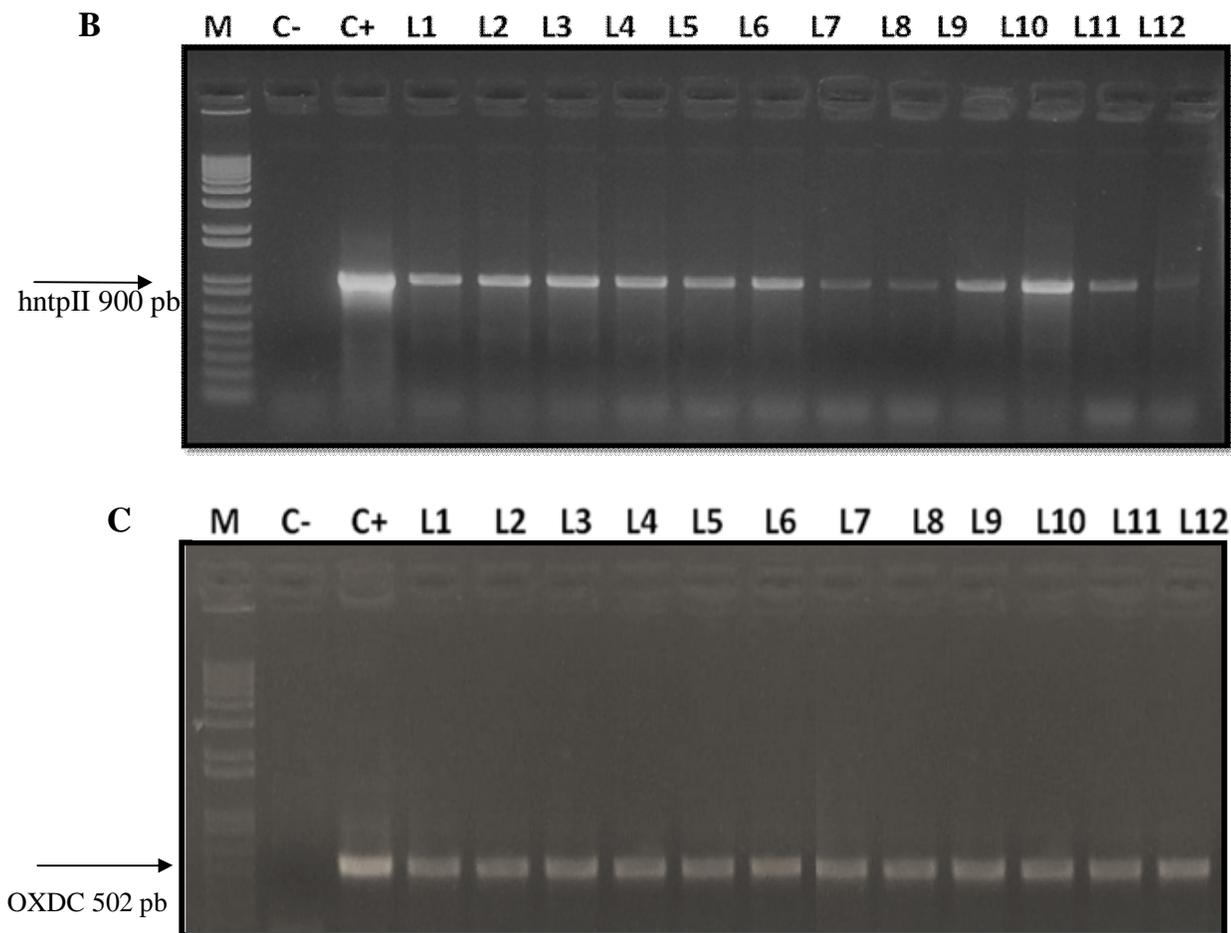


Figura 8- Obtenção de linhagens transgênicas de *N. tabacum*. **A)** Processo de regeneração *in vitro* das linhagens transgênicas com ênfase nas etapas de regeneração de brotos e enraizamento. **B)** Diagnóstico de integração do T-DNA em plantas de tabaco via PCR utilizando oligonucleotídeos para o gene *hntpII*. M: marcador de peso molecular, C-: controle negativo (planta não transformada), C+: Controle positivo (plasmídeo pCambOXDC), L1-L12: plantas transformadas. **C)** Diagnóstico de integração do T-DNA em plantas de tabaco via PCR utilizando oligonucleotídeos para o gene OXDC M: marcador de peso molecular, C-: controle negativo (planta não transformada), C+: Controle positivo (plasmídeo pCambOXDC), L1-L12: plantas transformadas.

5.2. Análise da expressão do gene OXDC em plantas transgênicas

A expressão do gene OXDC foi confirmada em todas as plantas transgênicas analisadas por meio da sua amplificação com oligonucleotídeos específicos (Figura 9A). A intensidade do sinal de amplificação de OXDC foi normalizada em relação ao controle endógeno 18S rRNA, o que permitiu quantificar a expressão relativa do transgene nas diferentes linhagens analisadas (Figura 9B). As linhagens L4, L5, L6 e L11 apresentaram os maiores níveis de expressão de OXDC, enquanto L3 e L10 apresentaram os menores níveis de expressão.

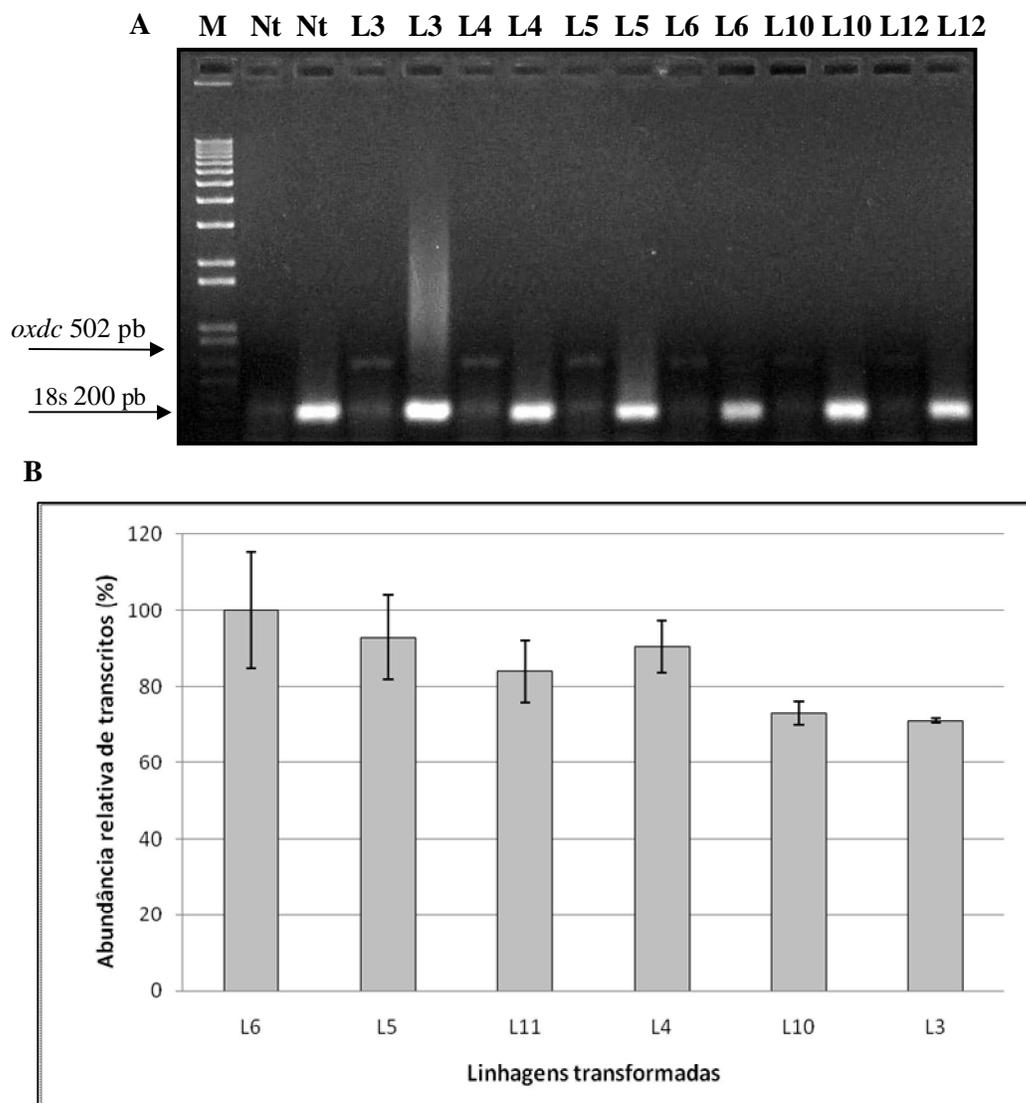


Figura 9- Expressão do gene *oxdc* em plantas transgênicas de *N. tabacum*. Amplificação dos fragmentos dos genes *oxdc* e 18S rRNA em plantas

transgênicas via RT-PCR. M: marcador de 1 Kb ladder, L3 a L12 (esquerda): produto da amplificação com oligonucleotídeos específicos para o gene OXDC. L3 a L12 (direita) Nt - Planta não transformada: produto da amplificação com oligonucleotídeos específicos para o gene 18S rRNA. **B)** Abundância relativa da expressão de OXDC nas diferentes linhagens transgênicas avaliadas.

5.3. Análise da funcionalidade do gene OXDC nas plantas transgênicas

Com o objetivo de avaliar a funcionalidade do gene *oxdc* nas plantas transgênicas de *N. tabacum*, testou-se a capacidade das linhagens em degradar ácido oxálico foliar. Os resultados demonstraram que, com exceção de L12, todas as linhagens transgênicas reduziram significativamente o teor de ácido oxálico nas foliar das plantas transgênicas, pelo teste t a 1% de probabilidade ($P < 0,01$). Os valores de redução variaram entre 18,1 a 75,2%, para as linhagens L12 e L6, respectivamente, em comparação a planta não transformada (Figura 10). Apesar de não apresentar diferenças significativas, pôde-se observar uma tendência de redução do ácido oxálico foliar na linhagem L 12 em relação a planta controle.

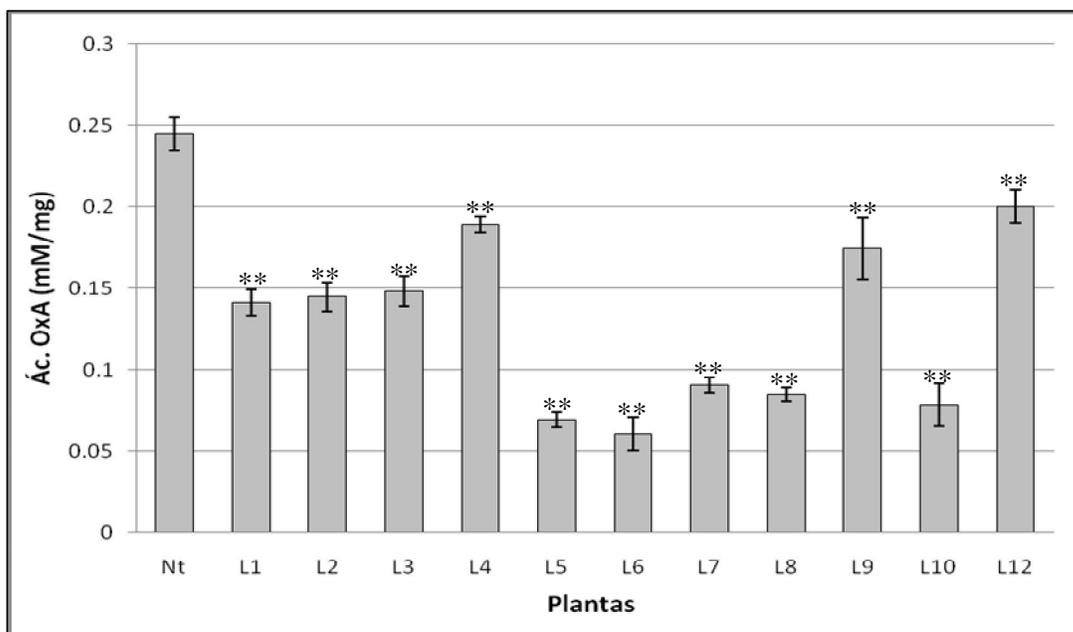


Figura 10– Quantificação do ácido oxálico em folhas de plantas transgênicas e controle (não-transformada) de *N. tabacum*, 24 h após a inoculação de 20 mM

de ácido oxálico. Nt - Não transformada e linhagens L1 a L12. ** Diferenças significativas para o teste t a 1% de probabilidade.

O conteúdo de ácido fórmico foliar, produto da ação da enzima OXDC, também foi quantificado nas diferentes linhagens transgênicas e na planta não transformada, correspondente ao tratamento controle. Os resultados demonstraram que todas as linhagens transgênicas produziram quantidades significativamente maiores de ácido fórmico em comparação a planta controle pelo teste t a 1% de probabilidade ($P < 0,01$). O incremento na produção de ácido fórmico entre as plantas transgênicas após a inoculação com ácido oxálico variou substancialmente, apresentando valores entre 0,009 e 0,27 mM mg^{-1} para as linhagens L4 e L10, respectivamente (Figura 11).

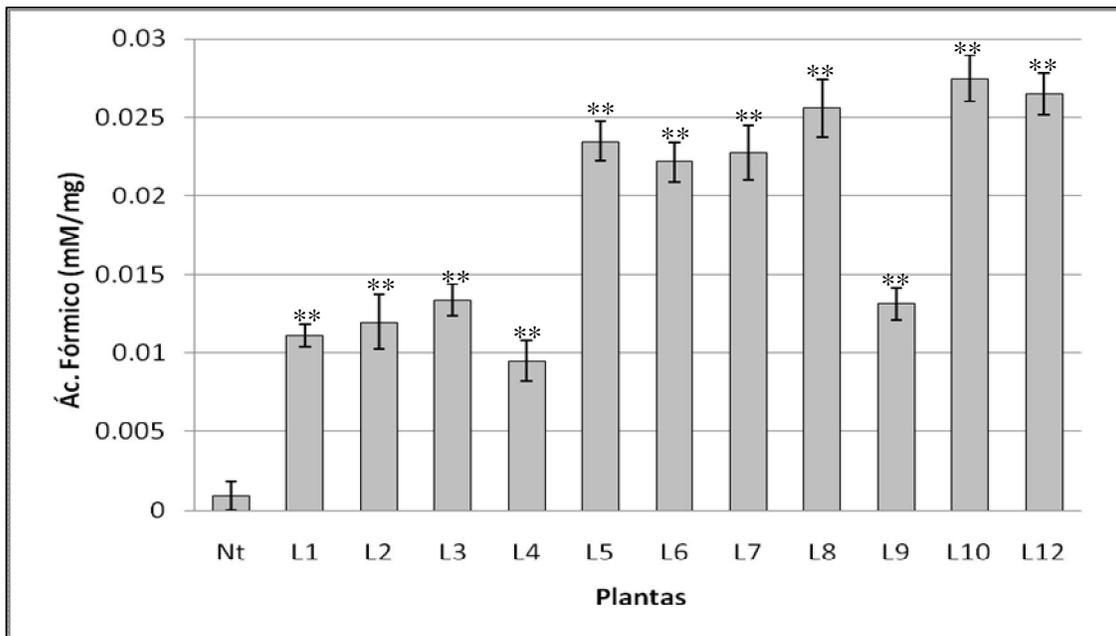


Figura 11– Detecção de ácido fórmico em folhas de *N. tabacum* após inoculação com ácido oxálico a 20 mM durante 24h. (ác. OxA + tampão fosfato, pH 4). Nt: planta não-transformada. L1-L12: plantas transformadas. ** Diferenças significativas para o teste t a 1% de probabilidade

5.4. Teste de resistência das plantas transgênicas ao ácido oxálico

A análise dos efeitos do ácido oxálico sobre as plantas não-transformadas de *N. tabacum* permitiu observar que a concentração de 20 mM é capaz de provocar danos no tecido celular foliar a partir de 24 h após a sua inoculação, caracterizado pelo murchamento das folhas (Figura 12). Portanto, essa concentração foi utilizada como referência para os testes posteriores de caracterização da plantas transgênicas contendo o gene *oxdc*.

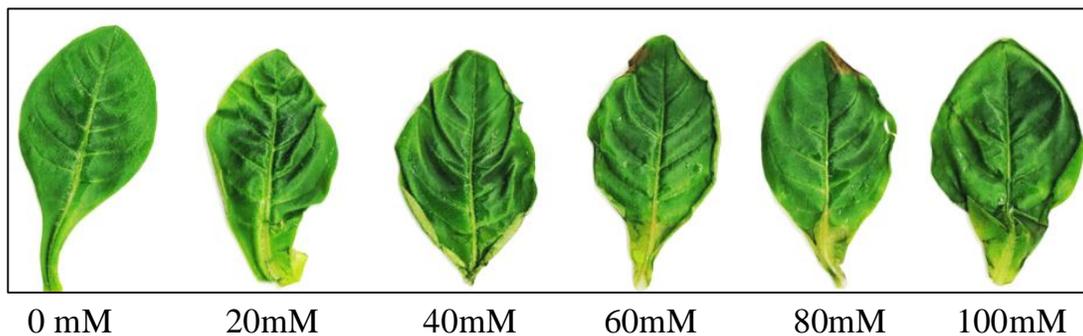


Figura 12– Efeito de diferentes concentrações de ácido oxálico em folhas de plantas não-transformadas de *N. tabacum*. Foto capturada 24 h após a inoculação.

Analisando a resistência das plantas transgênicas ao ácido oxálico, verificou-se que essa resistência variou de acordo com a linhagem transgênica analisada e o tempo de exposição ao estresse. A progressão dos sintomas provocados pelo ácido oxálico nas 12 linhagens transgênicas e no tratamento correspondente ao controle positivo, 24 horas após a inoculação, está ilustrado na Figura 13. Pode-se observar, após esse período, o início de lesões necróticas na região do pecíolo das plantas controle e também em algumas linhagens transgênicas, com exceção de L5 e L7. A morte do tecido foliar de plantas controle foi observada 48 h após a inoculação (Figura 14). Nesse período também foram ressaltadas as diferenças nas respostas de resistência entre as diferentes linhagens transgênicas, com o aumento dos sintomas de necrose na região dos vasos condutores e murchamento das folhas, como evidenciado no controle positivo e na linhagem L8. No entanto, as linhagens L2, L5, L6 e L7 apresentaram sintomas de estresse provocado pelo ácido

oxálico menos severos. Esses resultados podem ser correlacionados com os níveis de expressão do gene *oxdc* nas diferentes linhagens transgênicas (Figura 9).

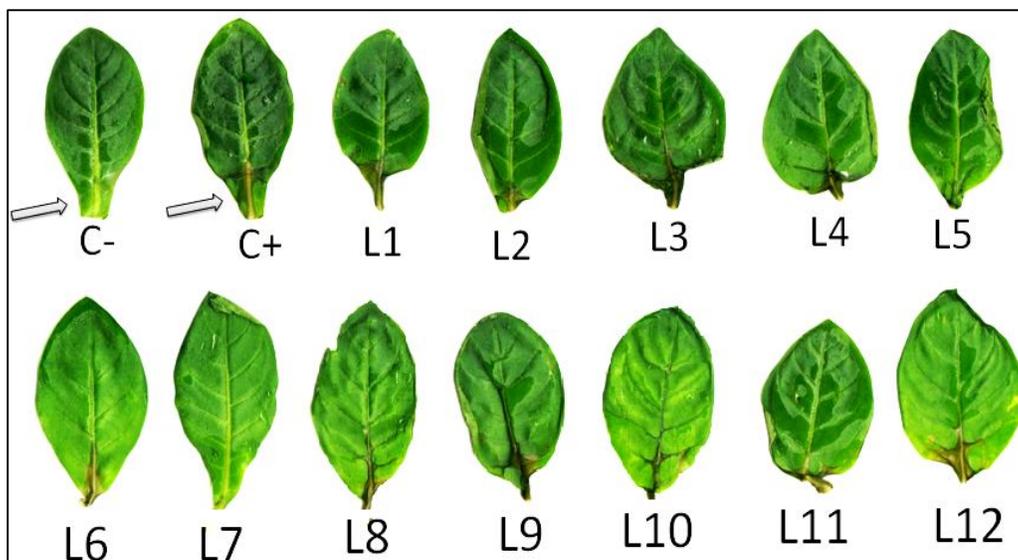


Figura 13– Efeito de ácido oxálico 20 mM em plantas controle (C- e C+) e transformadas (L1-L12) de *N. tabacum*. Foto capturada 24 h após a inoculação. As setas indicam o início de lesões necróticas na região do pecíolo no controle positivo em relação ao tratamento inoculado com tampão fosfato a pH 4. (C- Planta não transgênica inoculada com tampão fosfato pH 4; C+: Planta não transgênica inoculada com tampão fosfato pH4 + 20mM de ácido oxálico).

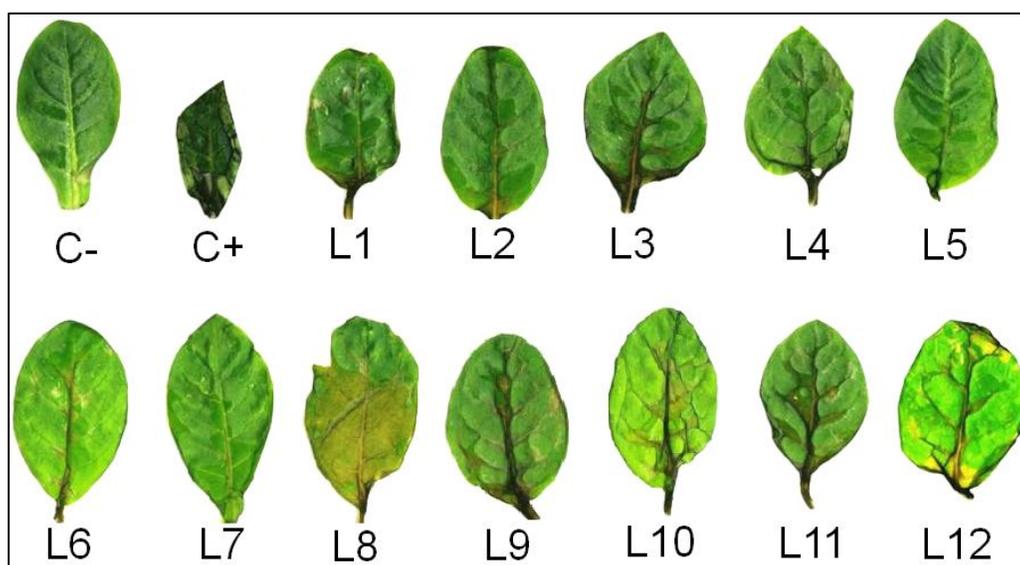


Figura 14– Efeito de ácido oxálico 20 mM em plantas controle e transformadas

de *N. tabacum*. Foto capturada 48 h após a inoculação. O murchamento e lesões necróticas na região do pecíolo correspondem ao efeito do ácido oxálico sobre o tecido vegetal. (C- Planta não transgênica inoculada com tampão fosfato pH 4; C+: Planta não transgênica inoculada com tampão fosfato pH4 + 20mM de ácido oxálico)

5.5. Teste de resistência das plantas transgênicas a NEPII de *M. pernicioso*

As linhagens L3, L5 e L7 foram selecionadas para esses experimentos, baseado nos resultados de redução do ácido oxálico e produção de ácido fórmico. A resistência a MpNEPII variou de acordo com a linhagem transgênica analisada e o tempo de exposição ao estresse. A concentração de 1,4 μ M da proteína purificada, associada às condições de inoculação descritas na metodologia, provocaram o início do aparecimento dos sintomas no tratamento controle positivo a partir de 48 h após a inoculação, sendo caracterizados por clorose, seguida de necrose do tecido foliar no sentido da borda para o centro (Figura 15) Esse resultado confirmou a forte capacidade de MpNEPII induzir necrose em tecidos vegetais. Os primeiros sintomas de clorose nas plantas transgênicas L5 e L7 começaram a surgir 96 h após inoculação, coincidindo com a morte do tratamento controle positivo, que apresentou uma coloração marrom no tecido vegetal. A linhagem L3, entretanto, apresentou murchamento translucidez no tecido 48 h após inoculação, características até então não descritas para essa condição de estresse. Durante todo período de avaliação, nenhum sintoma foi observado nas plantas correspondentes ao controle negativo, inoculadas somente com tampão fosfato pH 6, conduzido sob as mesmas condições experimentais.

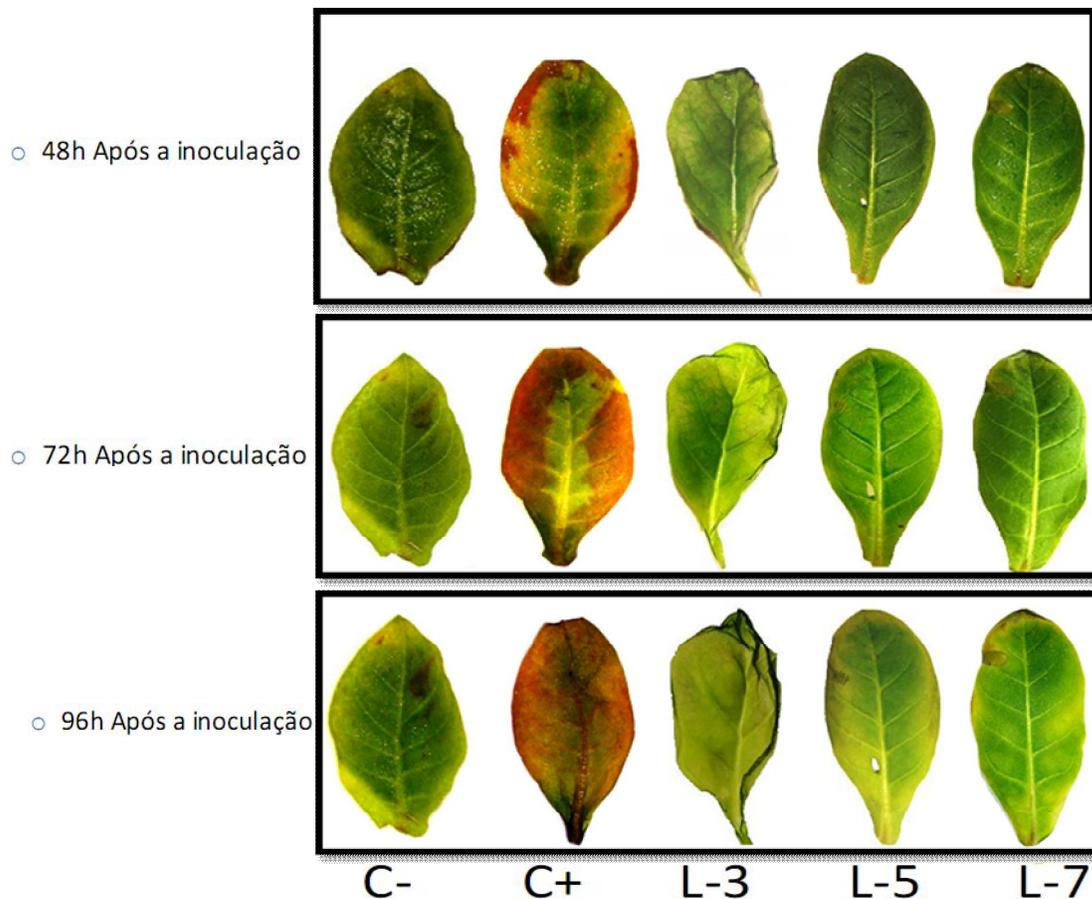


Figura 15– Folhas de plantas de *N. tabacum* 24 h após a inoculação de MpNEPII. C -: planta não transformada inoculada com tampão fosfato pH6,0. C+: planta não-transformada inoculada com 1,4 μ M de MpNEPII. L3, L5 e L7: linhagens transgênicas.

A morte celular das plantas de *N. tabacum* inoculadas com também foi avaliada com base na determinação de perda do conteúdo de água. Com exceção de L8, L9 e L10, todas as linhagens transgênicas avaliadas perderam significativamente menos água em comparação a planta controle pelo teste t a 1 ($P < 0,01$) (Figura 16). A redução na perda do conteúdo de água nas plantas transgênicas atingiu valores de até 90% em comparação a planta controle, como observada para a linhagem L5.

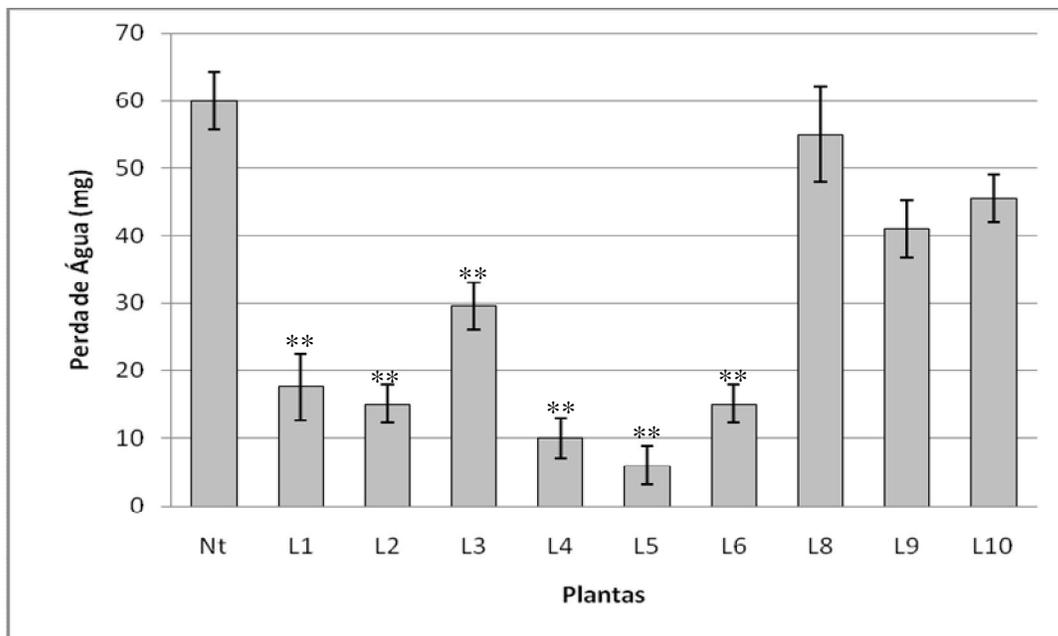


Figura 16– Avaliação da perda do conteúdo de água em folhas de plantas de *N. tabacum*, 96 h após a inoculação com 1,4 μ M de MpNEPII. Nt: planta não-transformada. L1-L10: linhagens transgênicas. ** Diferenças significativas para o teste t a 1% de probabilidade. Coletivamente, esses resultados também podem estar relacionados com os diferentes níveis de expressão de *oxdc* nas diferentes linhagens analisadas.

5.6. Detecção in situ de H₂O₂

A produção de H₂O₂ foi analisada em plantas de *N. tabacum* submetidas a condições de estresse por MpNEPII, ácido oxálico e a combinação de ambos os tratamentos. A linhagem L6 foi escolhida para esse conjunto de experimentos. Considerando os efeitos dos tratamentos sobre a planta não-transformada, pode-se observar um incremento da produção de H₂O₂ no tratamento correspondente a aplicação de MpNEPII em comparação ao tratamento controle positivo (DAB) e ao tratamento correspondente a aplicação de ácido oxálico (Figura 17). A aplicação simultânea de MpNEPII + Ác. OxA em plantas controle induziu a um maior acúmulo de H₂O₂ em relação aos tratamentos isolados. Esse resultado sugere um possível efeito sinérgico desses componentes em plantas sofrendo processo de morte celular. Considerando a linhagem transgênica L6, nenhum dos tratamentos induziu a

produção de H_2O_2 , confirmando a capacidade do gene *oxdc* detoxificar eficientemente o peróxido de hidrogênio em plantas submetidas a fatores que induzem a explosão oxidativa.

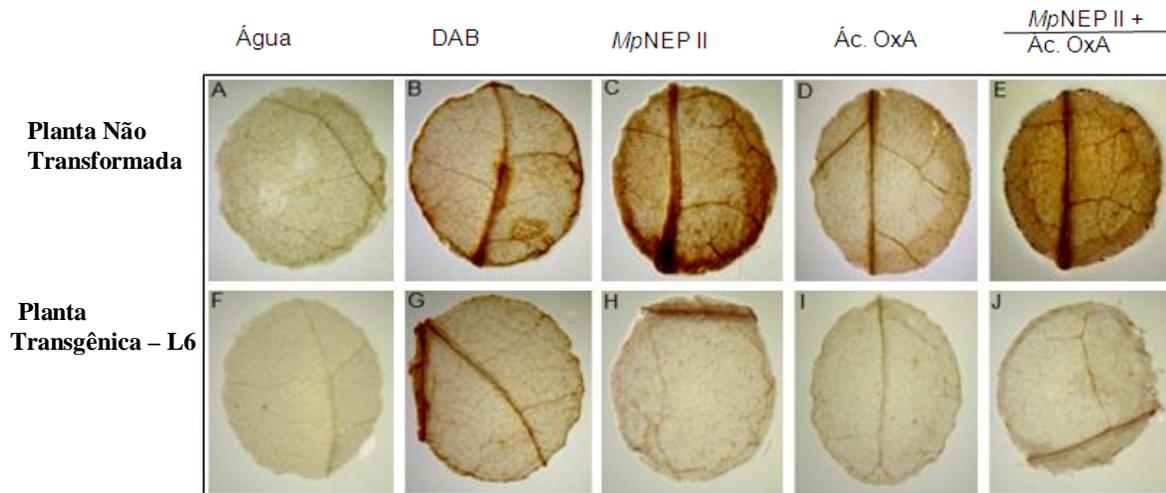


Figura 17– Produção de peróxido de hidrogênio em tecido foliar de *N. tabacum* inoculado com 20 mM de ácido oxálico, 0,5 μ M de *MpNEP II* e a combinação dos fatores nas mesmas concentrações. Discos foliares foram submetidos ao estresse por 24h e a produção de H_2O_2 foi visualizada através da coloração com DAB. A–E: planta não-transformada. F–J: linhagem transgênica L6.

6. DISCUSSÃO

6.1. Obtenção e caracterização molecular e bioquímica das plantas transgênicas de *N. tabacum*

A utilização da metodologia de transformação genética mediada por *A. tumefaciens* permitiu um rendimento de 100% na relação brotos regenerados/plantas transformadas, demonstrando ser um excelente método de transformação neste estudo. Esta metodologia de obtenção das plantas transgênicas tem sido uma das mais baratas e eficientes, sendo utilizada atualmente para obtenção de plantas transgênicas de diversas espécies que apresentam compatibilidade com *Agrobacterium* (JO et al., 2004; MAXIMOVA et al., 2006). *N. tabacum* possui um extenso histórico estabelecido como planta-modelo para trabalhos de transformação genética, constituindo a espécie mais utilizada para a produção de proteínas recombinantes de interesse agronômico e farmacêutico.

A expressão do gene *oxdc* foi confirmada nas plantas transgênicas pela técnica de RT-PCR. Diferenças nos níveis de expressão de OXDC foram observadas entre as diferentes linhagens avaliadas. Isso se deve aos efeitos de posição ou integração de diferentes números de cópias do T-DNA nas linhagens transgênicas. Resultados semelhantes foram observados por KESARWANI et al. (2000), os quais transformaram plantas de tabaco com o gene *oxdc* usando a metodologia de transformação genética mediada por *A. tumefaciens*. A obtenção das plantas transformadas sem alterações fenotípicas, bem como o comportamento das linhagens sob situação de estresse confirma a eficiência da metodologia utilizada em inserir o fragmento de interesse no genoma das plantas sem afetar outras regiões funcionais.

6.2. Plantas transgênicas de *N. tabacum* para o gene *oxdc* apresentam resistência ao Ácido Oxálico

Vários trabalhos descritos na literatura demonstraram o envolvimento do ácido oxálico na evolução de doenças provocadas por fitopatógenos, com mecanismos de ação que visam desde o acesso do fungo ao apoplasto, a partir

da degradação de células da parede celular, até a indução do processo de explosão oxidativa, resultando em morte celular como estratégia de sobrevivência, causada por fungos necrotróficos (KIM et al., 2008; CESSNA et al., 2000; LIANG et al., 2001). Esses trabalhos suportam as evidências de que fungos em sua fase necrotrófica interagem com seu hospedeiro, controlando a morte celular programada.

No presente estudo foi demonstrada a capacidade do gene *oxdc* em degradar o ácido oxálico em plantas transgênicas, com reduções do seu conteúdo em até 75% em comparação a planta controle. Resultados semelhantes foram descritos por KESARWANI et al. (2000), que observaram reduções de até 62% no conteúdo de ácido oxálico em plantas transgênicas de *N. tabacum* para o gene *oxdc* infectadas por *S. sclerotium* em comparação a plantas não transformadas. Os efeitos necróticos do ácido oxálico sobre as plantas não transformadas, pode estar associado ao comprometimento da função estrutural do Ca da parede celular provocado pela quelatação do elemento pelo ácido oxálico corroborando com dados obtidos por KESARWANI et al. (2000).

O incremento de ácido fórmico nas linhagens transgênicas submetidas a inoculação com ácido oxálico a 20mM se deve a degradação do oxalato a partir da expressão da enzima OXDC, uma vez que o mesmo constitui um produto direto da degradação do ácido oxálico pela enzima, que também gera CO₂. A partir da observação dos dados pode-se sugerir uma provável correlação inversamente proporcional existente entre os teores foliares de ácido oxálico e ácido fórmico nas linhagens transgênicas de *N. tabacum* expressando o gene *oxdc*.

Ceita et al. (2007) avaliando o envolvimento do oxalato de Ca durante a morte celular programada em plantas de *Theobroma cacao* infectados por *M. pernicioso*, confirmaram uma forte associação entre o aumento de cristais de oxalato de Ca e a progressão dos sintomas da vassoura-de-bruxa em variedade suscetível, 33 dias após a inoculação (DAI) do patógeno. No entanto a partir de 50 (DAI) houve um rápido decréscimo dos cristais de oxalato de Ca, coincidindo com o estágio final da doença. VILLELA-DIAS et al. (2007), avaliando a relação do ácido oxálico na interação cacau- *M. pernicioso*,

observaram por cromatografia um aumento significativo do ácido orgânico em tecidos de meristema de plantas infectadas pelo fungo.

A degradação dos cristais de oxalato em plantas se dá, dentre várias rotas, pela ação da enzima oxalato oxidase, que produz CO_2 e H_2O_2 como produtos de degradação (LANE et al., 1993). Um gene responsável pela produção dessa enzima (OXO; EC 1.2.3.4) em cacau foi identificado na biblioteca de ESTs da interação cacau- *M. pernicioso*, sugerindo que essa seja a principal rota de degradação do oxalato em plantas de *T. cacao* infectadas por *M. pernicioso*. Trabalhos na literatura associam a atividade da OXO a mecanismos de defesa da planta a fungos biotróficos, a partir do processo de morte celular programada (LIANG et al., 2000). No entanto o processo de co-evolução entre o patógeno e o hospedeiro, o aumento do número de células sofrendo processo de morte celular programada pode promover aumento da disponibilidade de nutrientes para as células do fungo, induzindo a conversão da fase biotrófica para necrotrófica, completando o ciclo de colonização e culminando na morte completa do tecido.

Uma grande vantagem do gene *oxdc* em relação a OXO se deve a sua capacidade de não produzir H_2O_2 durante a degradação do ácido oxálico, gerando apenas CO_2 e ácido fórmico, compostos não tóxicos para plantas. Pode-se sugerir, portanto, que o processo de morte celular induzida pelo patógeno seja retardado pelo efeito da oxalato descarboxilase, minimizando os seus efeitos sobre o hospedeiro.

6.3. Plantas transgênicas de *N.tabacum* para o gene *oxdc* apresentam resistência a NEP II de *M. pernicioso*.

Os resultados da inoculação de MpNEP II em plantas transgênicas de *N. tabacum* foram surpreendentes. Todas as linhagens transgênicas analisadas, L3, L5 e L7, apresentaram resistência evidente aos efeitos da proteína sobre o metabolismo celular em função da expressão da oxalato descarboxilase. Efeitos deletérios das NEP's em plantas já foram descritos por outros autores. BALEY et al. (2005) caracterizaram morfológicamente a evolução dos sintomas de necrose em folhas de *T. cacao* inoculadas com MpNEPI. Foi relatado sintomas de clorose, seguida de lesão de coloração marrom no sentido da

borda para o centro em folhas inoculadas com 0,5 μM da proteína. GARCIA et al. (2007), avaliando os efeitos de MpNEP I, MpNEP II e NPP I, a 1 μM , em plantas de tabaco, observaram efeitos necróticos das três proteínas a partir de 48 h após a inoculação, com MpNEP II apresentando elevada resistência a desnaturação quando submetida a temperaturas elevadas. Efeitos semelhantes foram observados quando as três proteínas foram inoculadas em folhas de *T. cacao*. Os mesmos autores observaram que durante o processo de morte celular em tecidos infectados por *M. perniciosa*, NEP II é a primeira das MpNEP's a ser expressa, nos micélios do patógeno, ainda na fase biotrófica (LOW; MERIDA, 1996; McDOWELL; DANGL, 2000). Assim como no presente estudo, MACEDO (2004) observou a indução de necrose em plantas tabaco não transgênicas 48 horas após a inoculação com 1,4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ de MpNEPII, com progressão dos sintomas até 96h. Esses resultados demonstram que a indução de necrose pela proteína produzida por *M. perniciosa* em plantas diferentes do seu hospedeiro natural, permite inferir que existe um mecanismo conservado de reconhecimento e desencadeamento dos mesmos efeitos deletérios em outras espécies.

O(s) mecanismo(s) exato(s) pelo qual NEP's provocam necrose no tecido vegetal não é totalmente conhecido. Entretanto, JENNINGS et al. (2001) observaram que a inoculação com NEPI em culturas de células de *N. tabacum* induziram imediatamente o processo de explosão oxidativa a partir da concentração de 5 ng ml^{-1} . Os mesmos autores observaram que a produção de ROS, absorção do O_2 e a alteração na dinâmica do K^+/H^+ , constituem as mais rápidas respostas da célula aos efeitos da proteína. Resultados semelhantes foram encontrados por FELLBRICH et al. (2002), após a inoculação de NPP I em plantas de *Arabidopsis*, sendo a produção de ROS produzida a partir de três horas após a inoculação. Portanto, sugere-se que a morte celular provocada por NLP's pode ser um efeito indireto da explosão oxidativa. Correlacionando com o presente estudo, alguns autores mostraram que, assim como o ácido oxálico, NEP's também se acumulam na parede e no apoplasto celular, podendo ser uma explicação para um efeito sinérgico das duas substâncias na produção de ROS.

Alguns trabalhos presentes na literatura já demonstraram a funcionalidade do gene *oxdc* sobre danos celulares provocados pela infecção

por fitopatógenos. DIAS et al. (2006) obtiveram linhagens transgênicas de alface (*Lactuca sativa*) com o gene *oxdc* resistentes ao *S. sclerotium*. Resultados semelhantes foram observados por KESARWANI et al. (2000), que produziram plantas transgênicas de *N. tabacum* e *Solanum lycopersicum* resistentes ao mesmo patógeno. Este é o primeiro registro de resistência conferida pelo gene *oxdc* a NEP II de *M. perniciosa*.

No presente estudo, também foram observadas reduções significativas na perda de água pelas linhagens transgênicas de tabaco submetidas a MpNEP II, em relação ao tratamento controle. Plantas sofrendo processo de morte celular a partir da inoculação da proteína, apresentam um aumento do pH extracelular e influxo de íons K⁺, sendo associado a resposta de hipersensibilidade (HR) induzida pela interação incompatível planta-patógeno (ATKINSON et al., 1985). Esse processo pode causar alterações na permeabilidade e despolarização da membrana plasmática, provocando o extravasamento de conteúdo celular e conseqüentemente redução do peso da matéria fresca (ROTEM et al., 1998). Lee et al. (2007) afirmaram que a perda de água caracteriza um dos primeiros sintomas de tecidos sofrendo processo de morte celular, e esse processo também pode ser explicado pela degradação da parede celular a partir da ação das ROS. Portanto, a redução da presença de peróxido observado nas plantas transgênicas pela ação do gene da oxalato descarboxilase pode ter uma forte relação com a menor perda de água nessas linhagens.

BAE et al. (2006) avaliando os efeitos de NEP I de *Fusarium oxysporum* em plantas de *Arabidopsis thaliana* observaram que em 30 minutos após a inoculação, NEP I foi suficiente para induzir a expressão de múltiplas classes de genes envolvidos em produção de espécies reativas a oxigênio (ROS), transdução de sinal, biossíntese de etileno, modificação de membrana e apoptose. A concentração da maioria dos metabólitos solúveis em água analisados pelos autores reduziram drasticamente após seis horas de inoculação, fato associado ao comprometimento da integridade de membrana celular pela ação de NEP I. Os autores concluíram que a maioria dos genes expressos em resposta a inoculação com a proteína estão associados a respostas de defesa, porém, não diretamente relacionados a indução de resistência a doenças. Esses resultados sustentam a hipótese de que a morte

celular provocada por NEP I consiste em uma das fases do desenvolvimento de doenças causadas por fitopatógenos necrotróficos.

Apesar da existência de vários trabalhos presentes na literatura caracterizando os efeitos das NEP's de fitopatógenos sobre plantas hospedeiras, estudos que visam a avaliação da resistência de plantas transgênicas a esses peptídeos são escassos. O presente estudo demonstrou efeitos positivos do gene *oxdc* na resistência aos principais fatores que induzem morte celular em tecidos infectados por *M. pernicioso*, resultado que fornece subsídios para estudos posteriores, no sentido de produção de plantas transgênicas de cacau resistentes a este fungo.

6.4. Plantas transgênicas de *N. tabacum* apresentam resistência a fatores que induzem explosão oxidativa

A produção de peróxido e superóxido de hidrogênio é documentada como a primeira e mais conhecida resposta de plantas a estresses bióticos. Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), tais como O_2 , O_2^- e H_2O_2 , são induzidas durante a progressão de injúrias ambientais, gerando a explosão oxidativa e provocando danos muitas vezes irreversíveis nas células vegetais. Entretanto, algumas plantas possuem mecanismos bioquímicos para escapar de ROS e proteger as células do estresse oxidativo. Geralmente, o sistema antioxidante de defesa consiste na atuação de vários processos enzimáticos, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutatona redutase (GR).

No presente estudo, plantas de *N. tabacum* transformadas com o gene *oxdc* inibiram a produção de H_2O_2 quando submetidas tanto a infiltração com MpNEP II, quanto ao ácido OxA *in vitro*. No mesmo estudo, plantas não transformadas submetidas as mesmas condições experimentais, apresentaram forte sintomas de estresse oxidativo, situação esta intimamente relacionada a morte celular por plantas infectadas por fitopatógenos. Corroborando com os dados apresentados no presente estudo, KIM et al. (2008) observaram um expressivo incremento de ROS a partir da coloração com DAB e morte celular em folhas de plantas de tabaco não-transformadas 24 horas após a inoculação com 10 e 20 mM de oxalato de potássio. Nesse estudo, os sintomas do

estresse oxidativo foram diretamente relacionados ao pH do meio nas amostras inoculadas com 20 mM do composto. Os mesmos autores, analisando os mecanismos de detoxificação do H_2O_2 , observaram um efeito positivo quando se acrescentou 40 e 200 unidades de catalase nos tratamentos correspondentes a 10 e 20mM de K-OX a pH 5,5, respectivamente. Entretanto, os mesmos resultados não foram observados quando se adicionou as mesmas concentrações de superóxido desmutase (SOD) ao meio, de modo que no tratamento correspondente a 400 unidades de SOD a produção de ROS foi induzida.

Outros mecanismos bioquímicos de resistência a fitopatógenos que induzem a explosão oxidativa já foram utilizadas com sucesso no que se refere ao uso da transgenia em plantas. LIANG et al. (2000), que produziram plantas transgênicas de álamo expressando o gene da Oxalato Oxidase (OXO) isolado de trigo (*Triticum* sp), observaram a aquisição de tolerância tanto ao ácido oxálico a 200 mM pH 1,15, quanto ao fungo fitopatogênico *Septoria musiva*, quando comparado a plantas não transgênicas. Resultados semelhantes foram observados por LIVINGSTONE et al. (2005), que obtiveram plantas transgênicas de amendoim para o mesmo gene da OXO, resistentes tanto ao ácido oxálico aplicado *in vitro*, quanto ao fungo *Sclerotinia minor*. Esses resultados demonstram que em algumas interações planta-patógeno, a degradação do oxalato em H_2O_2 a baixas concentrações pode trazer efeitos benéficos ao hospedeiro, considerando a indução do processo de morte celular programada (PCD) como sistema de defesa.

6.5. A explosão oxidativa pode ser a causa de efeito maior no processo de morte celular em tecidos infectados por *M. perniciosa*.

CEITA et al. (2007), avaliando os mecanismos envolvidos com a morte celular em plantas de *T. cacao* infectadas por *M. perniciosa*, observaram um crescente acúmulo de cristais de oxalato de Ca em genótipos susceptíveis após a inoculação com esporos do patógeno, seguido de um rápido decréscimo no estágio final da doença. Os resultados encontrados nesse estudo sugerem que este composto está intimamente relacionado a progressão da doença. Os mesmos autores observaram que o maior acúmulo do H_2O_2

encontrado em tecidos s sofrendo morte celular coincidiu com pontos de maior concentração de cristais de oxalato de Ca, evidenciando a forte relação entre os dois eventos. Em cacau, a degradação do oxalato de Ca se dá pela ação da enzima G-OXO, gerando CO₂ e H₂O₂, conforme expressão identificada em biblioteca da interação cacau- *M. perniciosa*.

Com base nos presentes resultados, a hipótese de que a explosão oxidativa em tecidos susceptíveis infectados por *M. perniciosa* é oriunda tanto da degradação do oxalato interno pela G-OXO, quanto da atuação das NEP's ganha reforço. Sugere-se ainda, que nessa interação específica, este processo pode estar diretamente relacionado a causa de efeito maior da morte da celular. Assim como no presente estudo, plantas de tabaco quando inoculadas tanto com MpNEP I, quanto com MpNEP II e NPP, apresentaram fortes sintomas de estresse oxidativo, culminando na morte completa do tecido 36 h após a inoculação (GARCIA et al., 2007), Sintomas semelhantes foram observados quando os mesmos autores realizaram a inoculação em plantas de *T. cacao*, confirmando envolvimento da proteína na morte celular em tecidos infectados por fungos que utilizam esse peptídeos durante o processo de patogenicidade. Alguns autores afirmam que *M. perniciosa* provoca alterações significativas no sistema antioxidante em plantas de *T. cacao*, levando a um colapso dos mecanismos de defesa durante a infecção de genótipos susceptíveis. Portanto, o estudo de sistemas que visam interagir na rota da interação *T. cacao* - *M. perniciosa*, no sentido de inibir a formação de ROS durante o estágio inicial do processo de colonização e, por consequência, retardar os efeitos do patógeno e sua conversão da fase biotrófica para necrotrófica, são de extrema importância para o desenvolvimento de variedades de cacau resistentes ao fungo.

Com base nos resultados apresentados nesse estudo, trabalhos posteriores com o objetivo de produzir plantas transgênicas de *T. cacao* para o gene *oxdc* são sugeridos como uma fonte potencial de aquisição de resistência ao *M. perniciosa*.

7. CONCLUSÕES

- A superexpressão do gene *oxdc* do fungo *Flammulina velutipes* nas plantas transgênicas de tabaco reduziu significativamente o conteúdo de ácido oxálico foliar;
- A superexpressão do gene *oxdc* induz resistência em plantas de tabaco ao ácido oxálico e a proteína MpNEPII, ambos envolvidos no processo de interação cacau-*M. perniciosa*;
- O ácido oxálico e a proteína MpNEPII atuam sinergicamente na produção do peróxido de hidrogênio em tecidos foliares de tabaco, de modo que a explosão oxidativa pode ser a causa de efeito maior da morte celular em plantas infectadas pelo patógeno;
- O gene *oxdc* mostra-se como potencial para estudos do patossistema cacau-*M. perniciosa*, podendo ser empregado em trabalhos posteriores de transformação genética de cacaueiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS. G. N. **Plant pathology**. San Diego. Academic Press, 1997.

AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**.; 97:1012-22. 2005.

ALGER, K.; CALDAS, M. . Cacau na Bahia - decadência e ameaça à Mata Atlântica. **Ciência Hoje** v. 117, p.28-35, 1996.

ANAND, R.; DORRESTEIN, P. C.; KINSLAND, C.; BEGLEY, T. P.; EALICK, S. E. Structure of Oxalate Decarboxylase from *Bacillus subtilis* at 1.75 Å Resolution. **Biochemistry** v. 41, pg.7659-7669, 2002.

ANDEBRHAN, T. Rain-water as a factor in the dissemination of basidiospores of *Crinipellis pernicioso* on cocoa seedlings. In: Disease Management in Cocoa. **Comparative epidemiology of witches' broom**. Eds. S. A. Rudgard, A. C. Maddison and T. Anderbrhan, Chapman & Hall, London.: .1988 157-164.

ATKINSON, J.; HUANG, J. A.; KNOPP. Hypersensitivity of suspension-cultured tobacco cells to pathogenic bacteria, **Phytopathology**. v.75, pg. 1270–1274, 1985.

BAE, M. S.; KIM, R., C.; SICHER, H.-JONG BAE.; BRYAN, A. Necrosis and Ethylene-Inducing Peptide from *Fusarium oxysporum* Induces a Complex Cascade of Transcripts Associated with Signal Transduction and Cell Death in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 141, pg. 1056–1067, 2006.

BAILEY, B. A. Purification of a Protein from Culture Filtrates of *Fusarium oxysporum* That Induces Ethylene and Necrosis in Leaves of *Erythroxylum-Coca*. **Phytopathology** v. 85, pg. 1250-1255, 1995.

BAILEY, B. A.; APEL-BIRKHOFF, P. C.; AKINGBE, O. O.; RYAN, J. L.; O'NEILL, N. R. & ANDERSON, J. D. Nep1 protein from *Fusarium oxysporum*

enhances biological control of opium poppy by *Pleospora papaveracea*. **Phytopathology**. 2000. v. 90. pg. 812-818.

BAILEY, B. A., HANHONG, B.; STREM, M. D.; MAYOLO, G. A. de.; GUILTINAN, M.; VERICA, J. A.; MAXIMOVA, S. N.; BOWERS, J. H. Developmental expression of stress response genes in *Theobroma cacao* leaves and their response to Nep1 treatment and a compatible infection by *Phytophthora megakarya*. **Plant Physiology Biochemical**. v. 43 pg. 611-22, 2005.

BARI, R; JONES. J D. G. Role of plant hormones in plant defense responses. **Plant Molecular Biology**. v.69, p. 473-488, 2009.

BATEMAN, D. F., BEER, S. V. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, v. 55:204-211. 1965.

BLUMWALD, E., AHARON, G. S., LAM, B. C. H. Early signal transduction pathways in plant–pathogen interactions. **Trends Plant**, v. 3, 342–346, 1998.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa.1998. 309 p.

BRODERSEN, P.; PETERSEN, M.; BJORN NIELSEN, H.; ZHU, S.; NEWMAN, M.A.; SHOKAT, K. M.; RIETZ, S.; PARKER, J.; MUNDY, J. Arabdopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid-and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. **Plant Journal**, Oxford, v. 47 p. 532-546, 2006.

CABRERA O. G. Caracterização funcional e estrutural de proteínas indutoras de necrose e etileno (NEPs) do fungo *Monoliophthora pernicioso*, caudados da vassoura-de-bruxa do cacauero. 2007 **Tese**. 91 p (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP. 2007.

ÇALISKAN, M.; CUMING, A. C. Special specificity of H₂O₂ generating oxalate oxidase gene expression during wheat embryo germination. **The Plant Journal** v.15, pag. 165-171, 1998.

ÇALIŞKAN. M. The Metabolism of Oxalic Acid. **Turk Journal of Zoology** v.24, pg.103–106, 2000.

CEITA, G.O.; MACÊDO, J. M. A.; SANTOS, B. T.; ALEMANNI. L.; GESTEIRA, A. S.; MICHELI. F.; MARIANO, A. C.; GRAMACHO, A. P.; SILVA, D. C Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Science**, v. 173, n. 2, p. 106-117, 2007.

CESSNA, S. G., SEARS, V. E., DICKMAN, M. B., AND LOW, P. S. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. **Plant Cell**. v.12. pg: 2191-2200, 2000.

CHRISPEELS, M. J.; HOLUIGUE, LATORRE, R Signal transduction networks and the biology of plant cells. **Biology Res**. v. 32., p. 35-60, 1999.

COE S. D.; COE, M. D. **The true history of chocolate**. Thames and Hudson, New York, 1996.

DANGL, J. L., JONES, J. D.. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. **Nature**. v.411, pg, 826-833, 2000.

DIAS, B. B. A.; CUNHA, W. G.; MORAIS, L. S., VIANNA, G. R.; RECH, E. L., de CAPDEVILLE, G., ARAGÃO, F. J. L. Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*, **Plant Pathology**. v. 55, pg. 187–193, 2006.

DIAS, L. A. S. (org). **Melhoramento genético do cacauero**. Viçosa: FUNAPE/UFG, 2001, 578p.

EMCH, M. The human ecology of Mayan cacao farming in Belize. **Hum Ecol** v.31, pg.111–132, 2003.

EVANS, H. C. B., C. Uma reavaliação do ciclo de vida da vassoura de bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacau. **Fitopatologia Brasileira**. v.4, pg.104-109, 1979.

FELLBRICH. G.; ROMANSKI. A.; VARET, A.; BLUME, B.; BRUNNER, F.; ENGELHARDT. S.; FELIX, G.; KEMMERLING, B.; KRZYMOWSKA, M.; NURNBERGER, T. NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and arabidopsis. **The Plant Journal**. v.32, pg. 375–390, 2002.

FERNANDEZ, D.; SANTOS, P.; AGOSTINO, C.; BOM, M. C.; PETITOT, A. S.; SILVA, M. C.; GUERRA-GUIMARÃES, L; RIBEIRO;. A; ARGOUT, X.; NICOLE, M. Coffe (*Coffea arábica* L.) genes early expressed during inection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology**, London, v. 5, n. 6, p. 527-536, Nov, 2004.

FRANCESCHI, V. R.; HORNER, H. T. A Microscopic Comparison of Calcium-Oxalate Crystal Idioblasts in Plant-Parts and Callus-Cultures of *Psychotria-Punctata* (Rubiaceae). **Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie**, v. 97, n. 5, p. 449-455. 1980

FRANCO, S. F. Caracterização de um gene similar a taumatina expreso pelo fungo causador da Vassoura de bruxa, *Moniliophthora pernicioso* 2008 **Dissertação**. 100p (Mestrado Biologia Funcional e Molecular) Universidade Estadual Campinas 2008. Campinas-SP – 2008.

GARCIA, O.; MACEDO. J. A. N.; TIBÚRCIO, R.; ZAPAROLI, G.; RICONES, J.; BITTENCOURT, L. M. C.; CEITA, G. O.; MICHELI, F.; GESTEIRA, A.; MARIANO, A. C.; SCHIAVINATO. M. A.; MEDRANO, F, J., MEINHARDT. L.

W.; PEREIRA, G. A. A.; CASCARDO, J. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, v.111. Pg. 443 – 455, 2007.

GESTEIRA, A. S.; MICHELI, F.; CARELS, N.; SILVA, A. C.; GRAMACHO, K. P.; SCHUSTER, I.; MACÊDO, J. N.; G.A.G. PEREIRA, G. A. G.; J.C.M. CASCARDO, J. C. M Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora perniciosa*, **Annual Botanic**. v.100, pg. 129–140, 2007.

GLAZEBROOK, J. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. **The Plant Journal**, v. 34, p. 217- 228, 2005.

GREENBERG, J. T.; YAO. N The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Cell Microbiology**. v. 6, pg. 201-11, 2004.

GUERREIRO, A.; PARAÍSO, M. A. **Caminhos ao encontro do mundo: a capitania, os frutos de ouro e a princesa do sul** - Ilhéus 1534 a 1940. Editus, 182 p. 2001.

HAHN, M. G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology**. Vol. 34: 387-412, 1996.

HAMMOND-KOSACK, K. E. J. Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. **The Plant Cell**. . v. 8, pg. 1773-1791, 1996.

HOLLOWAY, W. D., ARGALL, M. E., JEALOUS, W. T., LEE, J. A., BRADBURY, H. J Host recognition by toxigenic plant pathogens. **Journal of Agricultural Food Chemical**. v 37, pg. 337–341, 1989.

HUITEMA, E., BOS, J. I. B., TIAN, M. Y., WIN, J., WAUGH, M. E. S. Linking sequence to phenotype in *Phytophthora*-plant interactions. **Trends in Microbiology**. v.12. pg.196 – 213, 2004.

JENNINGS J. C.; APEL-BIRKHOFF P. C.; BAILEY B. A, ANDERSON, J. D. Induction of ethylene biosynthesis and necrosis in weed leaves by a *Fusarium oxysporum* protein. **Weed Science**. 2000 48: 7–14.

JENNINGS, J. M.; APEL-BIRKHOFF, P. C.; MOCK, N. M. BAKER, C. J.; ANDERSON, J. D.; BAILEY, B. A. Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep 1 from *Fusarium oxysporum*, **Plant Science**. v 161 pg. 891–899, 2001.

JO, J.; WON, S.; SON, D.; LEE, B. Paraquat resistance of transgenic tobacco plants over-expressing the *Ochrobactrum anthropi* pqrA gene. **Biotechnology Letters**, v.26, p.1391-1396, 2004.

KAMOUN, S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. **Annual Review Phytopathology**. v. 44, pg. 41-60, 2006.

KESARWANI, M. AZAM, K. NATARAJAN, A. MEHTA, A. DATTA, Oxalate Decarboxylase from *Collybia velutipes*. Molecular cloning and its over-expression to confer resistance to fungal infection in transgenic tobacco and tomato, **Journal of Biological Chemistry**. v.275, pg. 7230–7238, 2000.

KIM, K. S.; MIN, J. Y.; D, M. B. Oxalic Acid Is an Elicitor of Plant Programmed Cell Death during *Sclerotinia sclerotiorum* Disease Development. **MPMI** Vol. 21, No. 5, 2008, pp. 605–612. doi:10.1094/MPMI -21-5-0605. © 2008 The American Phytopathological Society.

KOLATTUKUDY, P. E., ROGERS, L. M., LI, D., HWANG, C.; FLAISHMAN, M. A. Surface Signaling in Pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v.92. pg. 4080-4087. 1995.

LANE, B. G., DUNWELL, J. M., RAY, J. A., SCHMITT, M. R., CUMING, A.C. Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. **Journal of Biology. Chemichal.** v.268, pg. 12239–12242, 1993.

LANE, B.G. Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants. **Faseb j.** v 8, pg. 294-301, 1994.

LEAL JÚNIOR, G. A. Genes diferencialmente expressos em *theobroma cacao* e *Crinipellis pernicioso* associados a resistência e patogenicidade no período assintomático da Doença Vassoura-de-Bruxa. **Tese de Doutorado.** - - Piracicaba, 2006. 124p.: il.

LEE, Y.; KIM, S.; BANG, W.B.; LEE, H.; KWAK, S.; KWON, S. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. **Plant Cell Reports**, p.591-598, 2007.

LIANG, H.; MAYNARD, C. A.; ALLEN, R. D, POWELL, W. A Increased *Septoria musiva* resistance in transgenic hybrid poplar leaves expressing a wheat oxalate oxidase gene. **Plant Mol Biology** v.45. pg. 619–629, 2001.

LIVINGSTONE, J. L.; HAMPTON, P. M.; PHIPPS, E A. Enhancing Resistance to *Sclerotinia minor* in Peanut by Expressing a Barley Oxalate Oxidase Gene. **Plant Physiology**. v. 137, pg. 1354–1362, 2005.

LOW, P. S.; MERIDA, J. R. The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. **Physiologia Plantarum** v.96, pg.533–542, 1996.

MACÊDO, J. N. Caracterização funcional do indutor de necrose de crinipellis pernicioso em *Theobroma cacao*, 2004 **Dissertação.** 62p (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus-BA. 2004.

MACMILLAN, J. Occurrence of gibberelin in vascular plants, fungi, and bacteria. **Journal of Plant Growth Regulation.** v. 20, pg. 387-442, 2002.

MÄKELÄ, M. R.; HILDÉN, K.; HATAKKA, A.; LUNDELL, T, K. Oxalate decarboxylase of the white-rot fungus *Dichomitus squalens* demonstrates a novel enzyme primary structure and non-induced expression on wood and in liquid cultures. **Microbiology**. v.155, pg. 2726–2738, 2009.

MATTINEN, L., TSHUIKINA, M., MAE, A., AND PIRHONEN, M.. Identification and characterization of Nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Molecular Plant Microbe Interact.** v17, pg 1366–1375, 2004.

MAXIMOVA, S. N.; MARELLI, J, F.; PISHAK, A. Y. S.; VERICA, J. A.; GUILTINAN, M. J. Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Coletotrichum gloeosporioides*. **Planta**, v. 224, p. 740-749, 2006.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C.; GIL-AD, N. L.;. Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. **Phytochemistry** v.58 pg. 33–41, 2001.

MCDOWELL J. M, DANGL J. L, 2000. Signal transduction in the plant immune response. **Trends in Biochemical Sciences** v25, pg.79–82, 2000.

MEHTA, A.; DATTA, A. Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*: Purification, characterization and cDNA cloning. **Journal of Biological Chemistry**. v 266, pg. 23548–23553, 1991.

MONDEGO, J. M. C.; CARAZZOLLE, M. F. COSTA, G. G L, FORMIGHIERI, E.F, PARIZZI LP, RINCONES J, COTOMACCI C, CARRARO DM, CUNHA AF, CARRER H, VIDAL RO, ESTRELA RC, GARCÍA O, THOMAZELLA DPT, OLIVEIRA BV, PIRES ABL, RIO MCS, ARAÚJO MRR, MORAES MH, CASTRO LAB, GRAMACHO K. P , GONÇALVES M. S, MOURA NETO JP, NETO AG, BARBOSA LV, GUILTINAN MJ , BAILEY BA, MEINHARDT LW, CASCARDO

JCM , PEREIRA GAG . A genome survey of *Moniliophthora Perrniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. **BMC Genomics** 2008.

MONTESANO, M.; BRADER, G. & PALVA.; T. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. **Molecular Plant Pathology**. v 1, p 73-79, 2003.

MOTAMAYOR J. C.; RISTERUCCI, A. M.;; LOPEZ, P. A.; ORTIZ, C.F.; MORENO, A.; LANAUD, C. Cacao domestication I: **The origin of the cacao cultivated by the Mayas**. *Heredity*. 89:380-6, 2002.

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

NAKATA, P. A. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. **Plant Science**, v. 164, p. 901-909. 2003.

NELSON, A. J., APEL-BIRKHOOD, P.C.; BAILEY, B.A. Sequence announcements. **Plant Molecular Biology**. v. 38. Pg. 911-912, 1998.

NIMCHUK, Z., T. EULGEM, Recognition and response in the plant immune system. **Annual Review of Genetic**. . v.37, pg. 579-609, 2003.

PANSTRUGA, R. Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Curr. Opin. Plant Biology*. v6, pg. 320-326, 2003.

PEREIRA, J. L.; DE ALMEIDA, L. C. C, SANTOS, S. M. Witches' broom disease of cocoa in Bahia: attempts at eradication and containment. **Crop Protection** v.15. pg. 743–752, 1990.

PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. **Annual Review of Phytopathology** v.34. pg. 573–594, 1996.

ROTEM, The biotic and physiological components of pathogenesis, in: J. Rotem (Ed.), *The Genus Alternaria; Biology, Epidemiology, and Pathogenicity*, **The American Phytopathological Society**, St. Paul, MN, pg. 95–118. 1998.

SAWADA, K.; HASEGAWA, M.; TOKUDA, L.; KAMEYAMA, J.; KODAMA, O.; KOHCHI, T.; YOSHIDA, K.; SHINMYO, A. Enhanced resistance to blast fungus and bacterial blight in transgenic rice constitutively expressing OsSBP, a rice homologue of mammalian selenium-binding proteins. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 68, p. 873-880, 2004.

SILVA, S. D.V.M. & MATSUOKA, K. Histologia da interação *Crinipellis pernicioso* em cacauzeiros suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 54-59. 1999.

STASKAWICZ, B. J., ASUBEL, F. M., BAKER, B. J., ELLIS, J. E. & JONES, J. D. G. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science** v.268, pg. 661-667, 1999.

SUMÁRIO, E. (2003). **Potencialidades regionais. estudo da viabilidade econômica do cacau**. www.suframa.gov.br.

TEIXEIRA, J. B, MARBACH, P. A. S, SANTOS, M. O. Otimização da metodologia da embriogênese somática visando a propagação clonal de genótipos elite de cacau (*Theobroma cacao* L.). **Série Doc. Embrapa**, v. 79, pg, 33-39, 2002.

VAN LOON, R. E.; PIETERSE, C. M. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annu Rev Phytopathol.** v.44. pg.135-162, 2006.

VERICA, J. A.; MAXIMOVA, S. N.; STREM, M. D.; CARLSON, J. E.; BAILEY, B. A.; GUILTINAN, M. J. Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. **Plant Cell Reports** v.23. pg.404–413, 2004.

VILELA DIAS, C. Quantificação de ácidos orgânicos e análise de expressão de genes relacionados com o estresse oxidativo durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa em cacauero 2007 **Dissertação**. 89p (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus-BA. 2004.

WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. Cocoa. 4th ed. Longman Group Limited, New York (1985).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)