



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

Transformação Genética de Fumo visando controle de *Fusarium oxysporum* via Oxalato Descarboxilase e resistência a *Xanthomonas fragariae* via peptídeo antimicrobiano PgAMP₁

Natália dos Anjos Pinto

JUIZ DE FORA
2012

Transformação Genética de Fumo visando controle de *Fusarium oxysporum* via Oxalato Descarboxilase e resistência a *Xanthomonas fragariae* via peptídeo antimicrobiano PgAMP₁

Natália dos Anjos Pinto

Dissertação de Mestrado do Curso
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas para obtenção do Título
de Mestre em Ciências Biológicas
na área de Genética e
Biotecnologia

Orientador: Professor Doutor Marcelo de Oliveira Santos

Juiz de Fora
2012

NATÁLIA DOS ANJOS PINTO

Transformação Genética de Fumo visando controle de *Fusarium oxysporum* via Oxalato Descarboxilase e resistência a *Xanthomonas fragariae* via peptídeo antimicrobiano PgAMP₁

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: P
rofessor Doutor Marcelo de Oliveira Santos

Juiz de Fora
2012

NATÁLIA DOS ANJOS PINTO

Transformação Genética de Fumo visando controle de *Fusarium oxysporum* via Oxalato Descarboxilase e resistência a *Xanthomonas fragariae* via peptídeo antimicrobiano PgAMP₁

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - área de Genética e Biotecnologia – da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Aprovado em

BANCA EXAMINADORA

Professor Doutor Marcelo de Oliveira Santos
Instituto de Ciências Biológicas da UFJF

Francisco José Lima Aragão
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Paulo Henrique Pereira Peixoto
Instituto de Ciências Biológicas da UFJF

Juiz de Fora
2012

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Cristina e Willians, pelo exemplo de luta e perseverança. A minha irmã Naiára, pela compreensão das noites mal dormidas. Ao meu noivo Vagner pelo apoio e carinho. A minha querida Fanny, companheira sempre fiel.

O conhecimento ilustra,
mas a experiência assimilada traz a sabedoria;
Quem estuda pensa que sabe;
Quem experimenta descobre quanto ainda precisa aprender...
Os problemas, os desafios em nossa vida aparecem pela
necessidade que temos de aprender e evoluir!

(Zibia Gasparetto – Quando é preciso voltar)

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me sustentado ao longo desta caminhada, por sua fidelidade, fortaleza, por ser o autor e consumidor da minha fé.

Aos meus pais por darem base à educação que tenho hoje, pelos conselhos, força, amor e carinho incondicionais durante toda minha vida.

À minha irmã pelo apoio e por torcer por mim em todos os momentos.

Ao meu noivo Vagner pelo apoio e amor a mim dedicados e por compreender os momentos de stresse e mal humor.

Ao Professor Dr. Marcelo pela orientação científica e profissional, pela confiança em mim depositada e pela incansável dedicação e paciência em todos os momentos.

Ao Dr. Lyderson pelo exemplo e disposição.

Ao Dr. José Marcello pela sempre boa vontade em ajudar.

Ao Dr. Saulo pelas imprescindíveis contribuições e auxílio.

Ao Dr. Carlos pelo incentivo e dúvidas esclarecidas.

À mestre Letícia pelo exemplo, ajuda e vastos ensinamentos transmitidos.

Ao Dr. Raul do Laboratório de Biologia Celular por estar sempre pronto a ajudar.

À Dra Priscilla pelas contribuições na condução do experimento.

Aos integrantes do laboratório de bióquima, em especial à Michelle por sempre estar pronta em ajudar.

Aos integrantes do laboratório de biologia celular pela contribuição e empréstimos de materiais.

Ao Vinícius e a Danielle sem os quais eu não teria conquistado tal vitória, pela companhia nas noites perdidas no laboratório e pelas discussões tão engrandecedoras.

As amigas Paula e Joyce pelo amor, carinho e compreensão tanto nos momentos difíceis quanto nos alegres.

Aos colegas do laboratório Shaiany, Camila, Aryane, Melvis, Renata, Francisco e Thalita pela paciência em dividir o espaço tão disputado, pela convivência e ajuda constante.

Aos meus colegas e amigos do curso, em especial a Sara pelos momentos de alegria e dificuldades compartilhados.

Aos meus avós por sempre me incentivarem a não desistir dos meus objetivos e lutar pelos meus ideais e sonhos.

Ao meu cunhado Carlos Eduardo na ajuda com a edição das fotos.

Ao meu primo Wallace e a minha amiga irmã Letícia pelo apoio emocional e trocas de experiências.

À minha família por torcem por mim e compreenderem minhas ausências.

À Fanny e ao Biriba pelos momentos de distração em meio ao cansaço e as ocupações.

A todos os amigos que de perto ou de longe torceram e acreditaram em minha vitória

Meu muito obrigada!!!

RESUMO

O morango é produzido e consumido nas mais variadas regiões do mundo, sendo a espécie do grupo de pequenos frutos de maior apreciação e grande retorno econômico. Um dos principais problemas na cultura do morangueiro é a incidência de doenças, que podem aparecer em várias fases do ciclo da cultura, atacando desde as mudas recém plantadas até os frutos na fase final de produção. Devido a susceptibilidade às doenças e pragas, o uso de pesticidas é usual no cultivo de morangos. Nesse sentido, o uso de variedades resistentes a fungos e bactérias pode ser uma importante alternativa visando a melhoria da qualidade dos frutos e um menor custo de produção dos mesmos, uma vez que os consumidores exigem cada vez mais, frutos com menor nível residual de agrotóxicos. No presente estudo, plantas de *Nicotiana tabacum* foram transformadas com os genes *OxDc* de *Flammulina velutipes* e *Pg-AMP₁* de *Psidium guajava* com o objetivo de avaliar os efeitos da enzima Oxalato Descarboxilase, produzida pelo gene *OxDc*, na resistência das plantas a fatores que induzem a morte celular de tecidos infectados pelo fungo *Fusarium oxysporum*, assim como os efeitos *in vitro* do extrato bruto contendo o peptídeo *Pg-AMP₁* extraído das folhas de tabaco contra a bactéria Gram-negativa *Xanthomonas fragariae*. Experimentos de transformação genética mediada por *Agrobacterium* permitiram a obtenção de 8 linhagens transgênicas de *N. tabacum* *OxDc* e 7 linhagens transgênicas de *N. tabacum* *Pg-AMP₁*, representando eventos de transformação distintos. As plantas foram caracterizadas molecular e bioquimicamente a fim de se confirmar a inserção, expressão e funcionalidade dos genes inseridos nas linhagens obtidas tanto para o gene *OxDc* quanto para o *Pg-AMP₁*. Os testes de resistência ao ácido oxálico mostraram danos menos severos nas linhagens transformadas de

tabaco *OxDc* do que nas plantas não transformadas. No que se refere à resistência das folhas ao ataque pelo fungo *Fusarium Oxysporum*, o gene *OxDc* também se mostrou capaz de conferir resistência às linhagens transgênicas. Através da técnica de Western blot, foi possível detectar a presença do peptídeo Pg-AMP₁ no extrato bruto extraído das folhas transformadas de tabaco Pg-AMP₁. O bioensaio realizado *in vitro* utilizando-se o extrato bruto contendo o peptídeo Pg-AMP₁ demonstrou a ação bactericida desse peptídeo contra a bactéria fitopatogênica *Xanthomonas Fragarie*. Em conjunto os resultados indicam a viabilidade da utilização dos genes *OxDc* e *Pg-AMP₁* transformação genética de morangueiro visando à redução nos danos causados por fitopatógenos que acometem suas lavouras, assim como a redução no uso de pesticidas.

Palavras chave: *OxDc*, Transformação genética, *Pg-AMP₁*, Peptídeo, Resistência

ABSTRACT

The strawberry is produced and consumed in a variety of regions in the world, being the group of small fruits' species of greater appreciation and high economic returns. A major problem in strawberry culture is the disease incidence that can appear in several stages of the cycle, attacking from the newly planted seeding to the fruit in the final stage of production. Due to this susceptibility to diseases and pests, the pesticide use is common in strawberries cultivation. Regarding this, the use of varieties resistant to fungi and bacteria may be a good alternative in order to improve fruit quality and to lower production cost, since consumers are increasingly demanding fruits with a lower level of pesticides. In the present study, *Nicotiana tabacum* plants were transformed with *Flammulina velutipes* *OxDc* gene and *Psidium guajava* *Pg-AMP₁* aiming to evaluate the effect of the enzyme Oxalate Decarboxylase produced by the gene *OxDc* in plant resistance to factors that induce cell death in tissues infected by the fungus *Fusarium oxysporum*, and the effect of raw extract containing the *Pg-AMP₁* peptide extracted from tobacco leaves against gram-negative bacterium *Xanthomonas fragariae* *in vitro*. Genetic transformation *Agrobacterium*-mediated experiments allowed the production of 8 transgenic lines *N. tabacum* *OxDc* and 7 transgenic lines of *N. tabacum* *Pg-AMP₁*, representing different transformation events. The plants were biochemically and molecular characterized to confirm the integration, expression and function of the genes inserted in the lines obtained both for the gene *OxDc* and *Pg-AMP₁*. Tests for resistance to 20 mM oxalic acid had less severe symptoms in *OxDc* transformed tobacco lines than the non-transformed plants. Concerning the strength of the leaves against *Fusarium oxysporum* attack, *OxDc* gene has also shown to confer resistance to the transgenic lines. It was possible to detect the presence of *Pg-AMP₁* peptide in the raw extract from *Pg-AMP₁* tobacco leaves through Western blot. Thus, the *in vitro* bioassay carried out using the raw extract containing the *Pg-AMP₁* peptide showed bactericidal activity against the phyto-pathogenic bacteria *Xanthomonas Fragariae*. Together these results

determine the viability of *OxDc* and *Pg-AMP₁* genes in the use of strawberry genetic transformation aiming the reduction in the damage caused by pathogens that attack the crop.

Key words: *OxDc*, Genetic transformation, *Pg-AMP₁*, Peptide, Resistance

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Mapa do vetor pCambOXDC utilizado em experimentos de transformação genética de *N. tabacum*. 18
- Figura 2-** Região do T-DNA de pCAMBIA OxDc contendo o agente de seleção e o gene da oxalato descarboxilase. 18
- Figura 3-** Processo de regeneração *in vitro* das linhagens transgênicas de tabaco OxDc com fenótipos normais. 26
- Figura 4-** Diagnóstico de integração do T-DNA em plantas de tabaco via PCR utilizando oligonucleotídeos para o gene *hptII*. 26
- Figura 5-** Efeito do ácido oxálico 20 mM em plantas controle (C- e C+) e transformadas (F1-F8) de *N. tabacum*. Foto capturada 48h após a inoculação. 28
- Figura 6-** Efeito do ácido oxálico 20 mM em plantas controle e transformadas de *N. tabacum*. Foto capturada 72h após a inoculação. 29
- Figura 7-** Resistência das plantas transgênicas a inoculação com *Fusarium oxysporum*. 31
- Figura 8-** Curva do progresso da doença das linhagens transgênicas de tabaco OxDc e do controle (planta não transformada) após a incubação com o patógeno *Fusarium oxysporum*. 32
- Figura 9-** A: RT-PCR para a detecção da expressão do gene exógeno *hptII* e do gene endógeno 18S rRNA nas linhagens transgênicas de tabaco; B: Quantificação da expressão relativa do gene *hptII* em relação à 18S rRNA. 34
- Figura 10-** Mapa do vetor pK7WG2D-Pg-AMP₁-GFP utilizado em experimentos de transformação genética de *N. tabacum*. 51
- Figura 11-** Processo de regeneração *in vitro* das linhagens transgênicas de tabaco PgAMP¹ com fenótipos normais. 59

- Figura 12-** Diagnóstico de integração do T-DNA em plantas de tabaco via PCR utilizando oligonucleotídeos para o gene *nptII*. 59
- Figura 13-** Bioensaio com extrato proteico bruto extraído das plantas de tabaco PgAMP₁. 61
- Figura 14-** Atividade bactericida do extrato proteico bruto, diluição 1:200 (20 µl do ensaio e 4 ml de LB). 62
- Figura 15-** Western blot realizado a partir do extrato proteico bruto das folhas de tabaco PgAMP₁. 63
- Figura 16-** Comprimento médio dos explantes foliares de morangueiro (em cm) após um período de 15 dias, em diferentes concentrações de NH₄NO₃. 80
- Figura 17-** Quantidade de brotos sob diferentes concentrações de NH₄NO₃ e sob diferentes intensidades luminosas 81
- Figura 18-** Espessura média total de todas as camadas da folha de morango (em µm) após um período de 15 dias, em diferentes concentrações de NH₄NO₃. 82
- Figura 19-** Secção transversal de lâmina foliar de morangueiro *cv* Dover, cultivada *in vitro*, em diferentes concentrações de NH₄NO₃ 82
- Figura 20-** Histogramas representativos das análises de citometria de fluxo. 84

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Diferentes concentrações de nitrato de amônio para 1 litro de meio. 77
- Tabela 2-** Parâmetros de ciclo celular, intensidade de fluorescência e FSC analisados por citometria de fluxo a partir de folhas de morango após 15 dias de exposição a diferentes concentrações de NH_4NO_3 . 83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIB	Ácido indol-3-butírico
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
AMV	<i>Alfafa mosaico vírus</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AO	Ácido oxálico
AUDPC	Área sob a curva de progresso da doença
BAP	6 - benzilaminopurina
BDA	Meio de cultivo batata, dextrose e agar
BSA	Soro de albumina bovina
cDNA	DNA codificador
CTAB	Brometo de Cetil Trimetil Amônio
CFU	Unidade formadora de colônia
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FvOxDc	Oxalato Descarboxilase de <i>Flammulina velutipes</i>
GRP	Proteínas Ricas em Glicina
GFP	Green Fluorescence Protein
Kb	Unidade de milhar(s) de par (s) de base (s)
kDa	Kilodaltons
LB	Meio de Cultura <i>Lysogny broth</i>
LEDs	Diodos emissores de luz
mg	Miligramas
µg	Microgramas
ml	Mililitros
µl	Microlitro
mM	Milimolar
µM	Micromolar
µm	Micrometro

MS	Meio de cultura Murashige e Skoog
OD	Densidade ótica
OxA	Ácido oxálico
OxDc	Oxalato Descarboxilase
PARA	Programa Nacional de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
Pg-AMP ₁	<i>Psidium guajava</i> peptídeo antimicrobiano ¹
pI	Ponto isoelétrico
PCR	Reação em cadeia da enzima DNA polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel
TDZ	Thiadizuron

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Origem	3
1.2 Evolução Tecnológica da Cultura	4
1.3 Fungos Fitopatogênicos que Danificam o Fruto do Morangueiro	6
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
Capítulo 1	13
Expressão do gene <i>OxDc</i> de <i>Flammulina velutipes</i> em plantas de tabaco visando à resistência ao fungo <i>Fusarium oxysporum</i>	13
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos Específicos	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
4 RESULTADOS	25
4.1 Obtenção de Plantas Transgênicas de <i>Nicotiana tabacum</i> com o Gene <i>OxDc</i>	25
4.2 Teste de resistência das plantas transgênicas ao ácido oxálico	27
4.3 Teste de resistência das plantas transgênicas ao <i>Fusarium oxysporum</i>	30
4.4 Análise da expressão do gene <i>OxDc</i> através de RT-PCR	33
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	39
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
Capítulo 2	45
PgAMP₁: Peptídeo rico em glicina confere resistência conta a bactéria fitopatogênica <i>Xanthomonas fragariae</i>	45

1 INTRODUÇÃO	45
2 OBJETIVOS	48
2.2 Objetivos Específicos	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4 RESULTADOS	58
4.1 Obtenção De Plantas Transgênicas De <i>Nicotiana Tabacum</i> Gene <i>Pgamp₁</i>	58
4.2 Atividade Antimicrobiana do Peptídeo Recombinante	60
4.3 Expressão do Peptídeo Recombinante Pg-AMP₁	62
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO	67
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
Capítulo 3	72
Efeito do Nitrato de Amônio Sobre a Brotação e Desenvolvimento do Morango <i>Fragaria x Ananassa</i>	72
1 INTRODUÇÃO	72
2 OBJETIVOS	75
2.2 Objetivos Específicos	75
3 MATERIAIS E MÉTODOS	76
4 RESULTADOS	79
4.1 Expansão foliar	79
4.2 Efeito do NH₄NO₃ e da luz na brotação	80
4.3 Avaliação dos cortes foliares	81
4.4 Citometria de fluxo	83
5 DISCUSSÃO	84
6 CONCLUSÃO	92
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cadeia produtiva de pequenos frutos tem no morango a espécie de maior expressão em área cultivada e em valor econômico, envolvendo vários municípios das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Fruto muito apreciado pelo consumidor, apresenta em seu sistema de produção, uma série de gargalos, que dificultam a obtenção de frutos de qualidade, sem contaminantes químicos ou microbiológicos (CASTRO, 2004; OLIVEIRA e SCIVITTARO, 2006).

Pelo sistema de classificação vegetal de Cronquist (1988), o morangueiro pertence à Divisão Magnoliophyta (Angiospermae), Classe Magnoliopsida (Dicotyledoneae), subclasse Rosidae, Ordem Rosales, Família Rosaceae, Gênero *Fragaria*.

Apesar de o morango cultivado *Fragaria x ananassa* Duch ser uma das culturas comerciais mais valiosas do mundo, ele é octaplóide, o que dificulta sua utilização em estudos moleculares, genéticos e funcionais. A planta é originária do cruzamento entre as espécies silvestres *F. chiloensis* e *F. virginiana*, ocorrido, casualmente, nas proximidades de Brest, na França, possivelmente por volta de 1750 (CASTRO, 2004; SILVA, DIAS e MARO, 2007). Embora o morango *Fragaria vesca* não seja uma cultura comercial, ele é diplóide tornando-se uma ferramenta útil para estudos genéticos e moleculares (SLOVIN, SCHMITT e FOLTA 2009; SLOVIN E MICHAEL, 2011). *F. vesca*, assim como sua parente octaplóide, é uma planta perene. Além disso, possui tamanho pequeno e um genoma de tamanho reduzido (~240 MB; x=7). Um projeto com a sequência do genoma de *F. vesca* foi recentemente publicado (SHULAEV et al. 2011). *F. vesca* tem um ciclo de reprodução curto (~3,5 meses), alta produção de sementes (~160 por pseudofruto), linhagens capazes de propagação vegetativa clonal, via estolões, e várias linhagens que são passíveis de transformação mediada por *Agrobacterium* (QIN et al., 2008; SLOVIN, SCHMITT e FOLTA 2009; SLOVIN E MICHAEL, 2011).

A produção de morango (*Fragaria spp*) no Brasil tem aumentado significativamente nos últimos anos, sendo estimada em 100 mil toneladas em área aproximada de 3.500 hectares, com destaque para as regiões Sul e Sudeste, sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor, seguido de São Paulo e Rio Grande do Sul. Esta produção coloca o Brasil em destaque, embora os Estados Unidos ainda lidere com uma produção anual de 900 mil toneladas por ano (CAMARGO et al., 2009).

O grande interesse pela cultura do morangueiro é devido a sua alta rentabilidade e grande demanda de mão-de-obra, gerando um incremento significativo para a economia e contribuindo no processo de desenvolvimento social, além da ampla aceitação da fruta pelo consumidor e pela diversidade de opções de comercialização e processamento do morango (SANHUEZA et al., 2005; DIAS e SIMÕES, 2009). Para o país, a receita da cultura gira em torno de 135 milhões de reais. A receita líquida gira em torno de R\$ 41.500,00 por hectare, sendo 39,3%, 43,9% e 16,8% respectivamente para o produtor, parceiros e trabalhadores (MADAIL, 2008). No entanto, um dos fatores limitantes da cultura é a alta susceptibilidade a doenças. Atualmente, se conhecem 51 espécies de fungos, três de bactérias, oito de nematóides e 24 de vírus que acometem a cultura. Devido a essa grande quantidade de doenças, os agrotóxicos são utilizados de maneira exagerada na cultura do morangueiro afetando a saúde humana (MASS, 1998).

Segundo Madail et al. (2007), o sistema convencional de cultivo dos frutos, em geral, se caracteriza pela utilização de insumos químicos na lavoura de uma forma descontrolada, sendo que as plantas acabam recebendo grande carga de agrotóxicos durante seu ciclo de produção. Essa utilização demasiada de agrotóxicos, no sistema convencional de cultivo, faz com que os frutos de morango estejam entre os que apresentam maiores níveis de resíduos de agrotóxicos, muitas vezes acima do tolerado pela legislação, como mostra o relatório do Programa Nacional de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), publicado em 2011 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Segundo esse relatório, 51,5 % dos morangos avaliados apresentaram resíduos de agrotóxicos acima do permitido para a cultura, ou

níveis de resíduos acima do Limite Máximo de Resíduo (LMR). Em consequência disso, produtores, consumidores e meio ambiente correm riscos de contaminação, com reflexos negativos em toda a cadeia produtiva do morangueiro.

1.1 Origem

O morango é uma hortaliça bastante antiga. Espécies selvagens existem há 50 milhões de anos (VIEIRA, 2001), mas os morangueiros só foram domesticados por volta do século XIV D.C. Naquela época, as espécies foram tiradas do estado selvagem com finalidade medicinal e de ornamentação de jardins (PASSOS, 1999). Seu centro de diversidade é localizado nos Estados Unidos, mais precisamente na costa da Califórnia, Oregon e Washington (CONTI et al., 2002).

O melhoramento do morangueiro provavelmente foi iniciado quando índios desconhecidos que habitavam o Chile, ainda na América pré-Colombiana, selecionaram plantas silvestres com frutos de maior tamanho. Os primeiros cruzamentos foram realizados por Duchesne em 1970, quando estudava e caracterizava as espécies existentes de morangueiro (CASTRO, 2004).

1.2 Evolução Tecnológica da Cultura

No Brasil, novos patamares de produtividade do morangueiro foram atingidos graças às técnicas de cultura de tecidos empregadas na limpeza viral. Plantas matrizes livres de vírus, utilizadas na produção comercial de mudas, são obtidas através do isolamento e cultivo de meristemas e da micropropagação (CALVETE et al., 2000). A cultura de tecidos também representa uma fonte adicional de variabilidade genética para o morangueiro. Variantes somaclonais podem ser úteis para aumentar o rendimento e melhorar a resistência, especialmente às doenças fúngicas. O avanço das técnicas de variação somaclonal, seleção *in vitro* e transformação genética promoveu o

interesse nos trabalhos de morfogênese *in vitro* e o desenvolvimento de métodos de regeneração (CASTRO, 1998; FLORES et al., 1999; DEBNATH e SILVA, 2007). Variantes somaclonais de morangueiro tem sido produzidas através de cultura *in vitro* e de seleção. Embora variantes fenotípicas possam ocorrer mesmo entre plantas regeneradas a partir do meristema (SANSVINI et al., 1989), é geralmente enfatizado que a variação genética está mais associada à regeneração à partir da cultura de calos. Popescu et al. (1997), observaram variação útil nas características das plantas e dos frutos em culturas derivadas de calo de morangueiro regeneradas a partir de folhas e do pecíolo. Tanto o genótipo quanto o tipo de explante influenciam fortemente na ocorrência de variação somaclonal. Um exemplo de variação somaclonal foi a modificação (branco) na cor da polpa dos frutos, induzida a partir de pecíolo derivado de calo na cv. 'Gorella'. Alguns regenerantes mostraram susceptibilidade reduzida a fungos de solo que causam murchamento das plantas (BATTISTINI e ROSATI, 1991; TOYODA et al., 1991). Variantes para precocidade, separação do cálice, susceptibilidade ao mofo e no nível de ploidia também foram encontrados (SIMON et al., 1987). Além de plantas de morangueiro com variação somaclonal que promoveu resistência ao clima semiárido (BISWAS et al., 2009).

Observa-se que o cruzamento natural entre as plantas e seleção ao longo dos anos melhorou a produtividade, o tamanho dos frutos e outras características de qualidade. No entanto, a falta de resistência aos vírus, fungos, bactérias, insetos, estresse ambiental e a produção de herbicidas eficientes para as cultivares comerciais continuam a ser grandes desafios. Avanços na tecnologia de engenharia genética prometem amenizar esses problemas por meio da incorporação de genes exógenos para as características agronômicas desejadas, preservando as características existentes nos genótipos melhorados (FRALEY, ROGERS e HORSCH, 1986; QIN et al., 2008).

A transformação de morangueiros mediada por *Agrobacterium* é geralmente realizada utilizando-se discos foliares ou calos e tem sido obtida há bastante tempo por diferentes grupos (JAMES, PASSEY e BARBARA, 1990;

NEHRA et al., 1990; EL MANSOURI et al., 1996; BARC'ELO et al., 1998; QIN et al., 2008; HUSAINI, 2010). Entretanto, a produção de novas plantas de morangueiros transformadas é grandemente influenciada pela virulência da linhagem de *Agrobacterium*, bem como pelo estabelecimento de um protocolo de regeneração eficiente (JAMES, PASSEY e BARBARA, 1990; URATSU et al., 1991; CITOVSKY, 2007). Apesar dos níveis satisfatórios de regeneração alcançados à partir de explantes foliares para alguns genótipos de morangos comerciais, a regeneração de plantas transformadas continua difícil e parece ser fortemente dependente do genótipo. (ZHAO, LIU e DAVIS, 2004; LANDI e MEZZETI, 2006; QUESADA et al., 2007; QIN et al., 2008). A regeneração de brotos advindos de tecidos de folhas deve-se principalmente ao genótipo e à composição do meio de cultura, especialmente dos reguladores de crescimento da planta e dos nutrientes do meio (LIU e SANFORD 1988; NEHRA et al. 1989). O meio de regeneração que geralmente tem produzido maiores quantidades de brotos regenerados é o Murashige e Skoog (1962) (MS) suplementado com 6 - benzilaminopurina (BAP) e ácido indol-3-butírico (AIB). O thiadizuron (TDZ) tem se mostrado um bom indutor na cultura *in vitro* com taxas elevadas de regeneração de brotos em tecidos de plantas lenhosas (HUETTEMAN e PREECE, 1993; BHAGWAT E LANE, 2004; MENG et al., 2004; HUSAINI e ABDIN, 2007). O TDZ é um regulador de crescimento sintético que possui a propriedade de “mimetizar” tanto os efeitos das auxinas quanto das citocininas no crescimento e diferenciação das plantas (MURTHY, MURCH e SAXENA, 1998). No morango, os efeitos do TDZ têm sido explorados recentemente em um número restrito de cultivares de *Fragaria x ananassa* Duch. O TDZ como regulador de crescimento induziu respostas específicas que são dependentes do genótipo e do tipo de tecido (PASSEY et al., 2003). Para alguns cultivares, a combinação do TDZ com outros reguladores aumentou a eficiência na regeneração de brotos. Landi e Mezzetti (2006) testaram a combinação entre o TDZ (4,54 µM) e o AIB (0,98 µM) em diferentes genótipos de *Fragaria x ananassa* e *Fragaria vesca* e obtiveram um maior índice de regeneração do que quando utilizaram o TDZ isoladamente.

1.3 Cultura de Tecidos

A cultura de tecidos se baseia na teoria da totipotência onde os seres vivos tem a capacidade de regenerar organismos inteiros, idênticos à matriz doadora, a partir de células únicas. Nessa técnica, pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados explantes, são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado. O objetivo é obter uma nova planta idêntica a original, ou seja, realizar uma clonagem vegetal que é definida como uma propagação assexuada de células ou organismos de modo a obter novo indivíduo, mantendo-se o genótipo idêntico àquele do ancestral comum (TORRES et al., 2000).

A cultura de tecidos pode ser empregada para a multiplicação de espécies de difícil propagação. Outro exemplo de grande importância é a limpeza clonal por meio da qual é possível a produção de mudas livres de vírus, como já é possível em abacaxi, citrus, morango e batata (FERREIRA et al., 1998). A cultura de tecidos também pode ser empregada de diferentes maneiras dentro de um programa de melhoramento vegetal. Embora não estejam diretamente envolvidas no desenvolvimento de cultivares, muitas vezes, essas técnicas oferecem soluções nas diferentes fases desse processo. Além disso, pode aumentar variabilidade genética pela variação somaclonal ou dando suporte para outras técnicas como a introgressão genética e a transformação genética.

Portanto, a cultura de tecidos é uma excelente ferramenta para clonar plantas em escala comercial, além de colaborar na realização de estudos de transformação genética e conservação de espécies vegetais. Permitindo ainda o aperfeiçoamento da interação entre fatores abióticos (nutricionais, luminosos e temperatura) e bióticos (hormonais e genéticos), resultando em plantas saudáveis e vigorosas que podem ser multiplicadas massivamente.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS. G.N.; 1997. **Plant pathology**. 4th Ed. New York, Academic Press, 635p.

BARC'ELO, M.; EL MANSOURI, I.; MERCADO, J.A.; QUESADA, M.A.; ALFARO, F.P. 1998. Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, **54**:29–36.

BATTISTINI, C.; ROSATI, P. 1991. *In vitro* evaluation of somaclonal strawberry (*Fragaria x ananassa* 'Brighton') variants for susceptibility to *Phytophthora cactorum*. In: **Dale A, Luby JJ (Eds) Strawberry into the 21st Century**, Timber Press, Portland, Oregon, USA, pp 121-123.

BHAGWAT, B.; LANE, W.D. 2004. In vitro shoot regenerations from leaves of sweet cherry (*Prunus avium*) 'Lapins' and 'Sweetheart'. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, **78**:173–181.

BISWAS, M.K.; DUTT, M.; ROY, U.K.; ISLAM, R.; HOSSAIN, M. 2009. Development and evaluation of *in vitro* somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. **Scientia Horticulturae**, **122**: 409–416.

CALVETE, E.O.; KÄMPF, A.N.; BERGAMASCHI, H.; DAUDT, R.H.S. 2000. Avaliação do crescimento de plantas de morangueiro, durante a aclimatização *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, **18**: 188-192.

CAMARGO, L.K.P.; RESENDE, J.T.V.; GALVÃO, A.G.; BAIER, J.E.; FARIA, M.V.; CAMARGO, C.K. 2009. Caracterização química de frutos de morangueiro cultivados em vasos sob sistemas de manejo orgânico e convencional. **Seminário: Ciências Agrárias**, **30**: 993-998.

CASTRO, R.L. 1998. Calogênese e organogênese de tecido foliar de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch). **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 117p.

CASTRO, R.L. 2004. Melhoramento Genético do Morangueiro: Avanços no Brasil. In: **2º Simpósio Nacional do Morango 1º Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas**. Embrapa CT. Pelotas. Documentos 126, p. 22-37.

CITOVSKY, V.; KOZLOVSKY, S.V.; LACROIX, B.; ZALTSMAN, A.; DAFNY-YELIN, M.; VYAS, S.; TOVKACH, A.; TZFIRA, T. 2007. Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. **Cellular Microbiology**, **9**: 9–20.

CRONQUIST, A. 1988. **The evolution and classification of flowering plants**. 2^a ed. The New York Botanical Garden. New York.

CONTI, J.H.; MINAMI, K.; GOMES, L.H.; TAVARES, C.Q. 2002. Estimativa da similaridade genética e identificação de cultivares do morangueiro por análise. **Horticultura Brasileira**, **20**: 145-152.

DEBNATH, S.C.; SILVA, J.A.C. 2007. Strawberry Culture *In Vitro*: Applications in Genetic Transformation and Biotechnology. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, **1**: 1-12.

DIAS, M.S.C.; SIMÕES, J.C. 2009. Pesquisa leva morango ao Semiárido. **Informe Agropecuário**, **30**: 97-107.

EL MANSOURI, L.; MERCADI, J.A.; VALPUESTA, V.; LOPEZ-ARANDA, J.M.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M.A. 1996. Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fragaria vesca* L. **Plant Cell Report** **15**:642–646.

FERREIRA, M.A.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. 1998. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, **1**: 21- 43.

FLORES, R.; PETERS, J.A.; FORTES, G.R.L.; CAMARGO, J.T. 1999. Potencial morfogênico de clones de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Vila Nova, em diferentes meios de regeneração. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **21**:274-278.

FRALEY, R.T.; ROGERS, S.G.; HORSCH, R.B. 1986. Genetic transformation in higher plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, **4**:1-46.

GELVIN, S.B.; KIM, S. 2007. Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration and transgene expression. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1769**: 410 – 421.

HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, **33**:105–119.

HUSAINI, A. M.; 2010. Pre- and post-agroinfection strategies for efficient leaf disk transformation and regeneration of transgenic strawberry plants. **Plant Cell Report**, **29**:97–110.

HUSAINI, A. M.; ABDIN, M. Z. 2007. Interactive effect of light, temperature and TDZ on the regeneration potential of leaf discs of *Fragaria x ananassa* Duch. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, **43**:576-584.

JAMES, D.J.; PASSEY, A.J.; BARBARA, D.J. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation of the cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) using disarmed binary vectors. **Plant Science**, **69**:79–94.

KONEZ, C.; MARTINI, N.; MAYERHOFER, R.; KONEZ, K.Z.; KORBER, H.; REDEI, G.P. 1989. High frequency T-DNA mediated gene tagging in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **86**: 8467–8471.

LANDI, L.; MEZZETTI, B. 2006. TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. **Plant Cell Report**, **25**:281–288.

LIU, Z.R.; SANFORD, J.C. 1988. Plant regeneration by organogenesis from strawberry leaf and runner tissue. **Horticulture Science**, **23**:1057–1059.

MADAIL, J.C.M. 2008. IV Simpósio Nacional do Morango, III Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul. Disponível em: http://www.cpact.embrapa.br/eventos/2008/simposio_morango_frutas/apresentacoes_pdf/Madail.pdf

MENG, R.G.; CHEN, T.H.N.; FINN, C.E.; LI, Y.H. 2004. Improving *in vitro* plant regeneration from leaf and petiole explants of 'Marion' blackberry. **Horticulture Science**, **39**:316–320.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiology Plant**. **15**:473–497.

MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.; SAXENA, P.K. 1998. Thidiazuron: a potent regulator of plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology** **34**:267–275.

NEHRA, N.S.; CHIBBER, R.N.; KARTHA, K.K.; DATLA, R.S.S.; CROSBY, W.L.; STUSHNOFF, C. (1990) Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system. **Plant Cell Report**, **9**:293–298.

NOTA TÉCNICA PARA DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS DO PARA DE 2010 – PARA- Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos. Brasília, 2011. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>

OLIVEIRA, R.P.; SCIVITTARO, W.B. 2006. Desempenho produtivo de mudas nacionais e importadas de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **28**: 520-522.

PASSEY, A.J.; BARRETT, K.J.; JAMES, D.J. 2003. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) using a range of explant types. **Plant Cell Report**, **21**:397–401.

PASSOS, F.A. 1999. Melhoramento do Morangueiro no Instituto Agronômico de Campinas. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MORANGO,1., Pouso alegre. Anais. **Morango: tecnologia de produção e processamento. Caldas Epamig - FECD**,p. 259 – 264.

PELEGRINI, P.B.; MURAD, A.M.; SILVA, L.P.; SANTOS, R.C.P.; COSTA, F.T.; TAGLIARI, P.D.; BLOCH, C.J.; NORONHA, E.L.; MILLER, R.N.G.; FRANCO, O.L. 2008. Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against gram-negative bacteria. **Peptides**, **29**: 1271-1279.

PELEGRINI, P.B.; SARTO, R.P.; SILVA, O.N.; FRANCO, O.L.; DROSSI-DE-SA, M.F. 2011. Antibacterial Peptides from Plants: What They Are and How They Probably Work. **Biochemistry Research International**, 2011: 1-9.

POPESCU, A.N.; ISAC, V.S.; COMAN, M.S.; RADULESCU, M.S. 1997. Somaclonal variation in plants regenerated by organogenesis from callus culture of strawberry (*Fragaria x ananassa*). **Acta Horticulturae**, **439**: 89-96.

QUESADA, M.A.; MARTÍN-PIZARRO, C.; GARCÍA-GAGO, J.A.; POSE, S.; SANTIAGO, N.; SESMERO, R.; PLIEGO-ALFARO, F.; MERCADO, J.A. 2007. Transgenic strawberry: current status and future perspectives. **Transgenic Plant Journal**, **1**: 280–288.

QIN, Y.; SILVA, J.A.; ZHANG, L.X.; ZHANG, L.; ZHANG, S. 2008. Transgenic strawberry: state of the art for improved traits. **Biotechnology Advances**, **26**:219–232.

REMY, S.; THIRY, E.; COEMANS, B.; WINDELINCKX, S.; SWENNEN, R.; SÁGI, L. 2005. Improved T-DNA vector for tagging plant promoters via high-throughput luciferase screening. **Biotechniques**, **38**:763-770.

SANHUEZA, R.M.V.; HOFFMAN, A.; ANTUNES, L.E.C.; FREIRE, J.M. 2005. Sistema de Produção de Morango para Mesa na Região da Serra Gaúcha e Encosta Superior do Nordeste. Embrapa Uva e Vinho, Sistema de Produção – Versão eletrônica, Dez./2005.

Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/MesaSerraGaucha/>

SANSAVINI, S.; ROSATI, P.; GAGGIOLI, D.; TOSCHI, M.F. 1989. Inheritance and stability of somaclonal variations in micropropagated strawberry. **Horticulturae**, **280**: 375-384.

SILVA, A.F.; DIAS, M.S.C.; MARO, L.A.C. 2007. Botânica e fisiologia do morangueiro. **Informe Agropecuário**, **28**: 7-13.

SHULAEV, V.; SARGENT, D.J.; CROWHURST, R.N.; MOCKLER, T.C.; FOLKERTS, O.; DELCHER, A.L.; JAISWAL, P.; MOCKAITIS, K.; LISTON, A.; MANE, S.P.; BURNS, P.; DAVIS, T.M.; SLOVIN, J.P.; BASSIL, N.; HELLENS, R.P.; EVANS, C.; HARKINS, T.; KODIRA, C.; DESANY, B.; CRASTA, O.R.; JENSEN, R.V.; ALLAN, A.C.; MICHAEL, T.P.; SETUBAL, J.C.; CELTON, J.M.; REES, D.J.; WILLIAMS, K.P.; HOLT, S.H.; RUIZ, R.J.J.; CHATTERJEE, M.; LIU, B.; SILVA, H.; MEISEL, L.; ADATO, A.; FILICHKIN, S.A.; TROGGIO, M.; VIOLA, R.; ASHMAN, T.L.; WANG, H.; DHARMAWARDHANA, P.; ELSER, J.; RAJA, R.; PRIEST, H.D.; BRYANT, D.W.; FOX, S.E.; GIVAN, S.A.; WILHELM, L.J.; NAITHANI, S.; CHRISTOVELS, A.; SALAMA, D.Y.; CARTER, J.; LOPEZ, GIRONA, E.; ZDEPSKI, A.; WANG, W.; KERSTETTER, R.A.; SCHWAB, W.; KORBAN, S.S.; DAVIK, J.; MONFORT, A.; DENOYES-ROTHAN, B.; ARUS, P.; MITTLER, R.; FLINN, B.; AHARONI, A.; BENNETZEN, J.L.; SALZBERG, S.L.; DICKERMAN, A.W.; VELASCO, R.; BORODOVSKY, M.; VEILLEUX, R.E.; FOLTA, K.M. 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). **Nature Genetics**, **43**:109–116.

SLOVIN, J.P.; SCHMITT, K.; FOLTA, K.M. 2009 An inbred line of the diploid strawberry *Fragaria vesca* f. *semperflorens* for genomic and molecular genetic studies in the Rosaceae. **Plant Methods**, **5**: 1-15.

SLOVIN, J. ; MICHAEL, T. 2011. Strawberry. Part 3 structural and functional genomics. In: **Folta K, Kole C (eds) Genetics, genomics and breeding of berries**. Science Publishers, EnWeld, pp 162–193.

TAVARES, L.S. 2009. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO Pg-AMP1 RECOMBINANTE, UM PEPTÍDEO RICO EM GLICINA, ISOLADO DE GOIABA (*Psidium guajava* L.) **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Juiz de fora, Minas Gerais, Brasil, 82p.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. Glossário de biotecnologia vegetal. Brasília: Embrapa hortaliças, 2000. 128p.

TOYODA, H.; HORIKOSHI, K.; YAMANO, Y.; OUCHI, S. 1991. Selection of *Fusarium* wilt disease resistance from regenerants derived from callus of strawberry. **Plant Cell Reports**, **10**: 167-170.

URATSU, S.L.; AHMADU, H.; BRINGUST, R.S.; DANDEKAR, A.M. 1991. Relative virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strains on strawberry. **Horticulture Science**, **26**:196–199.

VIEIRA, F.C. 2001. A Cultura Do Morangueiro. Fruticultura. Disponível em: <http://www.pa.esalq.usp.br/~pa1200/frut1200.htm>

ZHAO, Y.; LIU, Q.; DAVIS, R.E. 2004. Transgene expression in strawberries driven by a heterologous phloem-specific promoter. **Plant Cell Report**, **23**:224–230.

Capítulo 1

Expressão do gene *OxDc* de *Flammulina velutipes* em plantas de tabaco visando à resistência ao fungo *Fusarium oxysporum*

1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios enfrentados para a produção agrícola é o desenvolvimento de novas cultivares de plantas através do melhoramento genético que apresentem maior resistência ou tolerância às doenças. Desde a domesticação das plantas para a utilização humana, as doenças vêm causando grandes perdas na produção, afetando o bem estar dos seres humanos por todo mundo (AGRIOS 1997).

Fungos fitopatogênicos tais como *Sclerotium rolfsii*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia Sclerotium* são capazes de infectar diferentes espécies de plantas. A infecção causada por esses fungos leva a perdas consideráveis na colheita. A fase inicial da infecção envolve a produção e o acúmulo de uma grande quantidade de ácido oxálico (AO), que parece ser um dos maiores determinantes da patogenicidade (DUTTON e EVANS, 1996, LEHNER et al., 2008).

O gênero *Fusarium* compreende um número de espécies caracterizadas pela produção de macroconídios de forma fusóide, que são amplamente distribuídos no solo e em substratos orgânicos. As espécies de *Fusarium* são reconhecidas há muito tempo como importantes patógenos que acometem

plantas ou como produtoras de micotoxinas que contaminam alimentos dos seres humanos e dos animais (MOSS e SMITH, 1984).

Fusarium oxysporum é a espécie mais comum do gênero e causa murcha vascular em diferentes espécies de plantas. Esse fungo causa perdas severas na maioria das lavouras, de algodão, tabaco, banana, café, morango, cana de açúcar, entre outras. Os sintomas iniciais são a murcha vascular, incluindo o clareamento das nervuras e epinastia da folha, a redução no crescimento, amarelamento das folhas menores, murcha progressiva das folhas e pecíolos, desfoliação e, finalmente, morte da planta (DI PIETRO et al., 2003).

Genes de importância agrônômica tais como aqueles que conferem resistências a insetos, agentes patogênicos ou melhoram a qualidade nutricional têm sido isolados a partir de plantas e de outros organismos (KESARWANI et al., 2000). Dos genes descritos na literatura e disponíveis para pesquisa, vários são conhecidos por conferir resistência a fitopatógenos, com destaque para o gene da enzima oxalato descarboxilase (*OxDc*), primeiramente isolado do basidiomiceto *Flammulina velutipes* (MEHTA e DATTA, 1991). A *OxDc* pertence à superfamília funcionalmente diversificada de proteínas cupin que estão encontradas em todos os três domínios de vida (Eukarya, Bacteria, Archaea) (MÄKELÄ et al., 2010). Ela é dependente de manganês e possui a capacidade de catalizar a degradação do ácido oxálico em ácido fórmico e dióxido de carbono. Sua estrutura revela um hexâmero simétrico onde cada monômero pertence à família de proteínas cupin (ANAND et al., 2002). Proteínas cupin compartilham estrutura primária e terciária semelhantes com dois sítios conservados de histidina e motivos de ligação ao Mn^{2+} separados por uma região intermotivo que varia em comprimento (DUNWELL, KHURI e GANE, 2000; KHURI, BAKKER e DUNWELL, 2001; DUNWELL, PURVIS e KHURI, 2004). As enzimas *OxDc* têm uma duplicação do domínio cupin e são adicionalmente classificadas como membros da subclasse bicupin possuindo dois sítios distintos de ligação a Mn^{2+} . A enzima *OxDc* funcional é aparentemente um hexâmero, constituída por dois trímeros das subunidades bicupin (ANAND et al. 2002). As enzimas do tipo oxalato

descarboxilases, produzidas por fungos, são induzidas pela presença do ácido oxálico, um componente chave, no processo de patogenicidade e/ou colonização do hospedeiro. Assim, acredita-se que as oxalato descarboxilases degradam o oxalato, estando provavelmente envolvidas na regulação do pH, reduzindo a toxidez causada pelo acúmulo de ácido oxálico nos tecidos (DUTTON et al., 1994; SHEN, LIU e WANG, 2008).

Estudos recentes demonstraram a capacidade do gene *OxDc* em conferir resistência às plantas de alface, soja e tabaco ao fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (DIAS et al., 2006; CUNHA et al., 2010, SILVA et al., 2011) e, em função disso, no presente trabalho, foi avaliado a capacidade desse gene também promover resistência ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum* em plantas de tabaco.

2 OBJETIVOS

Produzir plantas de *Nicotiana tabacum* geneticamente transformadas com o gene *OxDc* que resistentes ao fungo *Fusarium oxysporum*.

2.1 Objetivos Específicos

1- Produzir linhagens geneticamente modificadas de *Nicotiana tabacum* contendo o gene *OxDc* isolado de *F. velutipes* e caracterizá-las em nível molecular;

2- Analisar a resistência *in vitro* das plantas transgênicas contra os efeitos do ácido oxálico;

3 - Analisar a resistência *in vitro* das plantas transgênicas contra o fungo necrotrófico *Fusarium oxysporum*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) da variedade Xanthi cultivadas *in vitro* foram usadas como fonte de explantes para transformação genética laboratório de Genética e Biotecnologia – Biologia - UFJF. As plantas foram mantidas *in vitro* em tubo de ensaio em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescido de glicose 20mg/L e agar 7g/L, pH 5,8. As plantas foram mantidas em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16:8 h (luz:escuro) e $30 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Folhas com 4 semanas após a repicagem foram obtidas do material cultivado em sala de crescimento, e utilizadas como fonte de explantes para os experimentos de transformação genética.

3.2 Descrição do vetor de expressão

O vetor binário pCAMBIAOxDc (Figura 1) foi gentilmente cedido pelo Dr. Francisco José Lima Aragão (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília). Esse vetor contém os genes *hptII* (resistência ao antibiótico higromicina) como gene de seleção, o gene *FvOxDc* (oxalato descarboxilase de *Flammulina velutipes*) sob controle do promotor CaMV35S duplicado e o *enhancer* do *alfafa mosaic virus* AMV (DIAS et al., 2006) (Figura 2).

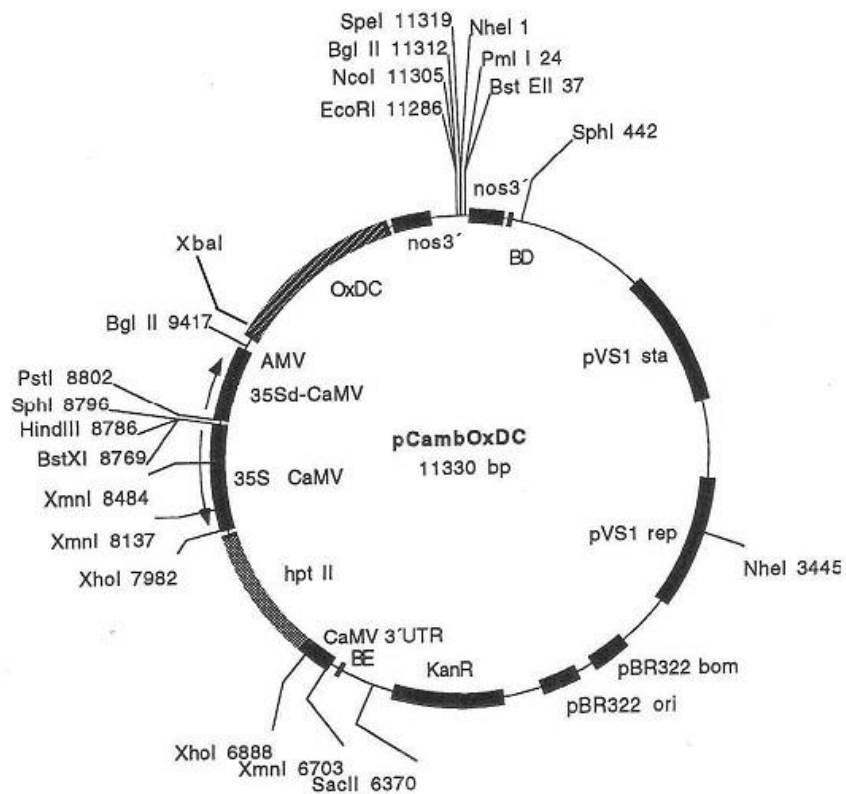


Fig 1: Mapa do vetor pCambOxDC utilizado em experimentos de transformação genética de *N. tabacum* (Dias et al.,2006)

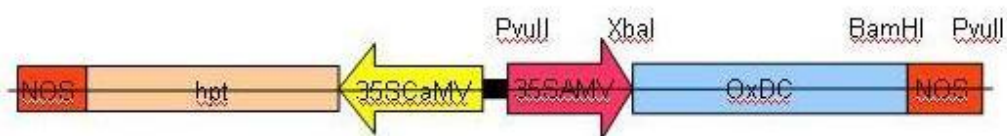


Fig 2: Região do T-DNA de pCAMBIA OxDC contendo o agente de seleção e o gene da oxalato descarboxilase (Dias et al.,2006)

3.3 Cultivo da *Agrobacterium*

O plasmídeo recombinante denominado pCambiaOxDc foi inserido por eletroporação na linhagem de *Agrobacterium* GV3101. A linhagem de *Agrobacterium* foi cultivada em meio Lysogny broth (LB) sólido, contendo triptona 10g/l, extrato de levedura 5g/l, cloreto de sódio 10g/L, ágar 7g/L e os antibióticos rifampicina 100mg/L, gentamicina 50mg/L e canamicina 100mg/L onde foram crescidas por 3 dias a 27°C. Para o experimento de transformação, uma única colônia foi incubada em quatro mililitros de LB líquido contendo os mesmos antibióticos citados anteriormente por 16h a 27°C em agitador orbital (Thermo electron corporation®) a 150 rpm.

3.4 Transformação de *Nicotiana tabacum* com o gene *OxDc*

Após 16h de crescimento, a cultura de *Agrobacterium* possuindo o plasmídeo vetor pCAMBIAOxDc, teve a densidade óptica determinada até obtenção de fase exponencial de crescimento, com valores entre 0,5 e 1 OD. A cultura foi transferida para um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml estéril, sendo centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos. O pellet formado foi suspenso em NaCl 0,85% e acetoceringona (200 µM). As folhas de fumo foram, então, cortadas ao meio e mergulhadas na suspensão, permanecendo no escuro por um período de 48 horas, a temperatura de 25 °C.

3.5 Seleção das plantas transformadas de tabaco com o gene *OxDc*

Após as 48 horas, as folhas foram lavadas em água destilada autoclavada por três vezes, secas em papel filtro estéril e colocadas em meio de seleção, contendo MS, acrescido de glicose 20mg/L e agar 7g/L, BAP 1mg/L, para indução de brotos, timentin 200mg/L, para evitar o crescimento das bactérias remanescentes e higromicina 10mg/L, para seleção das células transformadas, pH 5.8. As placas foram incubadas em sala de cultura a 25° C, com um fotoperíodo de 16:8h (luz/escuro) e 30 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os explantes foram sub-cultivados a cada duas semanas até o surgimento de brotos que foram então transferidos para tubos de ensaio contendo meio de enraizamento, contendo meio de cultura MS, acrescido de glicose 20mg/L e agar 7g/L, pH 5,8.

3.6 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico das plantas de fumo foi realizada utilizando-se o método mini-extração para PCR, conforme descrito por Brasileiro e Carneiro (1998). Cerca de 300 a 500 mg de tecido vegetal fresco advindos de cultura *in vitro* de cada planta, foram macerados em 1 ml de tampão de extração para PCR (0,8% (p/v) de CTAB, 800 mM de NaCl, 22 mM de EDTA, 200 mM de tris-HCl pH 8, 0,2% (v/v) de β -mercaptoetanol e 140 mM de sorbitol) e 400 μl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v). As amostras foram incubadas a 55 °C, por 10 minutos sob agitação, e depois centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos, recuperando-se o sobrenadante. Posteriormente, adicionou-se 1,2x de isopropanol gelado do volume recuperado do sobrenadante e as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 rpm,

porém por 10 minutos. Os precipitados recuperados foram lavados com 1ml de etanol 70% (v/v) e novamente centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. O DNA precipitado foi seco em câmara de fluxo laminar e ressuspendido em 50 µl de água destilada. As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 min antes do seu armazenamento a -20 °C.

3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os brotos induzidos na presença de higromicina foram transferidos para meio de enraizamento por 30 dias. Após este período, as plantas que se mantiveram vivas *in vitro* foram avaliadas quanto a presença do fragmento de T-DNA inseridos no genoma pela reação da polimerase em cadeia (PCR). A PCR foi realizada em termociclador Eppendorf modelo Mastercycler ® utilizando-se os primers hyg 268 (5'-TCCGGAAGTGCTTGACATTGG-3') e hyg 672 (5'-ATGTTGGCGACCTCGGTATTGG-3') que anelam-se dentro da região do gene *hptII* (higromicina fosfotransferase) que confere resistência à higromicina. Para a reação de PCR das plantas transformadas com *OxDc* foi usado um ciclo de 95° C por 5 minutos; 34 ciclos (1min a 95° C; 1 min a 58° C; 1 min 72° C) e um ciclo de extensão final de 5 minutos a 72° C para o gene *hptII*. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% (v/v) e corados com *syber green* a fim de se obter um fragmento de 404 bp. O gel do material analisado foi capturado e armazenado em sistema de fotodocumentação digital.

3.8 Teste de resistência das plantas transgênicas de tabaco ao ácido oxálico

Folhas fotossinteticamente ativas advindas de material *in vitro* de plantas transgênicas e do controle (não-transformadas) de *N. tabacum* foram testadas quanto à resistência à concentração de 20 mM de ácido oxálico (OxA), concentração considerada ótima para o teste com OxA em plantas de *N. tabacum* conforme estabelecido por Silva (2011). A metodologia utilizada foi a descrita por Kesarwani et al. (2000) e consistiu na excisão das folhas, seguida por sua incubação imediata em placas de Petri com papel filtro 100% umedecidos com solução tampão fosfato e OxA 20 mM, com pH ajustado para 4. O tratamento controle foi constituído da incubação das folhas de plantas não transformadas (controles) em placas de Petri com papel filtro 100% umedecidos apenas em solução de tampão fosfato, pH 4. Foram utilizadas 3 repetições para cada planta por tratamento e cada unidade experimental foi constituída por uma folha. As amostras foram mantidas em sala de crescimento por 72h a 25 °C e 16:8 h (luz:escuro).

3.9 Bioensaio antifúngico *in vitro*

O fungo utilizado, *Fusarium oxysporum* foi mantido em meio batata dextrose agar (BDA; batata 200g/L, dextrose 20g/L e ágar 15g/L) à temperatura ambiente para produção de micélio. A inoculação foi realizada de acordo com Dickson e Hunter (1983). Para produzir o inóculo para os ensaios, um disco de micélio de 5 mm de diâmetro foi colocado no centro de uma nova placa de BDA. A cultura foi incubada a 20° C durante 2 dias no escuro. Discos de micélios com 3 mm de diâmetro foram cortados a partir das margens de crescimento e aplicados à superfície adaxial de folhas jovens de material *in vitro* totalmente expandidas (9 folhas de cada linha transgênica e não transgênica). Cada folha foi colocada sobre uma placa de Petri contendo duas folhas de papel de filtro umedecidas e incubadas a 20 °C no escuro. As folhas foram fotografadas após 42, 66 e 90 horas e as imagens foram processadas no software Image Pro Plus® para a obtenção da área circular referente ao halo de infecção do fungo, sendo usada uma calibração para medida espacial com auxílio de régua graduada. A área sob a curva de progresso da doença (AUDPC) foi utilizada para resumir o progresso da severidade da doença de acordo com Shaner e Finney (1977).

3.10 Análise de expressão do gene *OxDc* em plantas de tabaco pela técnica de RT-PCR

O RNA total das folhas de tabaco *in vitro* foi extraído utilizando o kit SV total RNA isolation system da Promega®. A amplificação do cDNA foi realizada em tubos de microcentrifuga estéreis. Em cada microtubo foi adicionado: 10µL do RNA, 2µL do primer de ancoramento oligo (dT) (10mM) e 4µL de dNTP mix (10mM). Em seguida, a enzima foi inativada a 65-80°C por 10 minutos. Logo em seguida, o material foi colocado em gelo. Foi então adicionado aos microtubos 2µL do RT Buffer (10X), 1µL do Inibidor de RNase e 1µL do M-MuLVR reverse transcriptase. Em seguida, o material foi colocado em termociclador e a reação decorreu da seguinte maneira: Lid: 105°C, Nowait: auto, T= 70°C por 5mim, T= 42°C por 1hora, T= 95°C por 5 min, Hold 4°C. O cDNA obtido foi utilizado para detecção da expressão do gene *OxDc*, através da amplificação utilizando os mesmos oligonucleotídeos descritos no item 3.7 Como controle endógeno, foram utilizados oligonucleotídeos referentes à sequência interna do 18SF (5'-AACGGCTACCACATCCAAGG-3') 18SR (5'-TCATTACTCCGATCCCGAAG-3'). Os níveis de expressão do gene *OxDc* foram inferidos com base na intensidade das bandas do controle interno (18S rRNA).

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção de plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* com o gene *OxDc*

A transformação dos explantes de *Nicotiana tabacum* com o vetor pCambiaOxDc permitiu a obtenção de 14 plantas das quais 11 apresentaram-se PCR positivo para o gene *OxDc*, representando eventos de transformação distintos. Apesar disso, 3 das 11 plantas não foram utilizadas nos testes de resistência ao ácido oxálico devido ao número insuficiente de folhas no período de realização dos mesmos. O início da brotação dos explantes cultivados em meio de indução de brotos se deu a partir de quatro semanas após a realização da cocultura. Todas as plantas regeneradas em meio seletivo apresentaram fenótipo normal (Figura 3). A natureza transgênica das plantas foi inicialmente determinada por meio de reações de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para amplificação do gene *hptII*. Uma banda de aproximadamente 404 bp, correspondente ao tamanho esperado dos fragmentos amplificados, foi obtida em todas as 8 linhagens transgênicas de *Nicotiana tabacum* utilizadas (Figura 4).

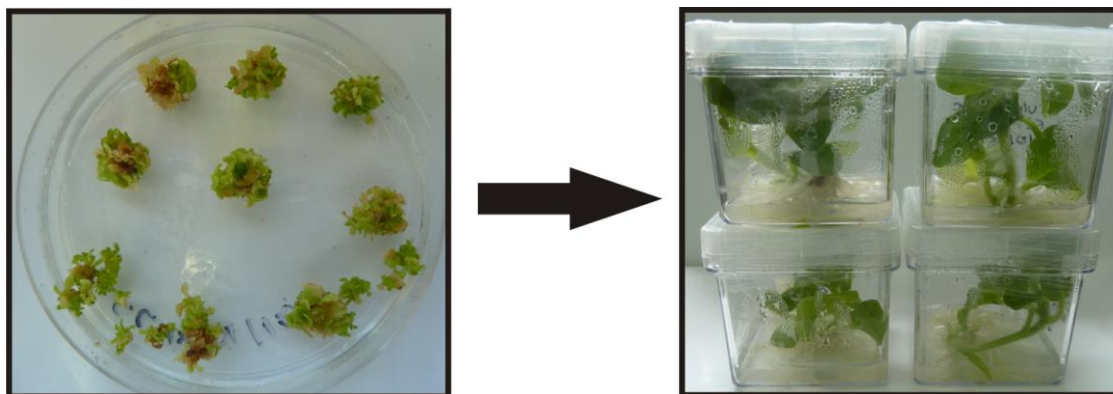


Fig 3: Processo de regeneração *in vitro* das linhagens transgênicas de tabaco *OxDc* com fenótipos normais. A: Brotos emergindo quatro semanas após o cultivo *in vitro*. B: Plantas com quatro meses após de regeneração.

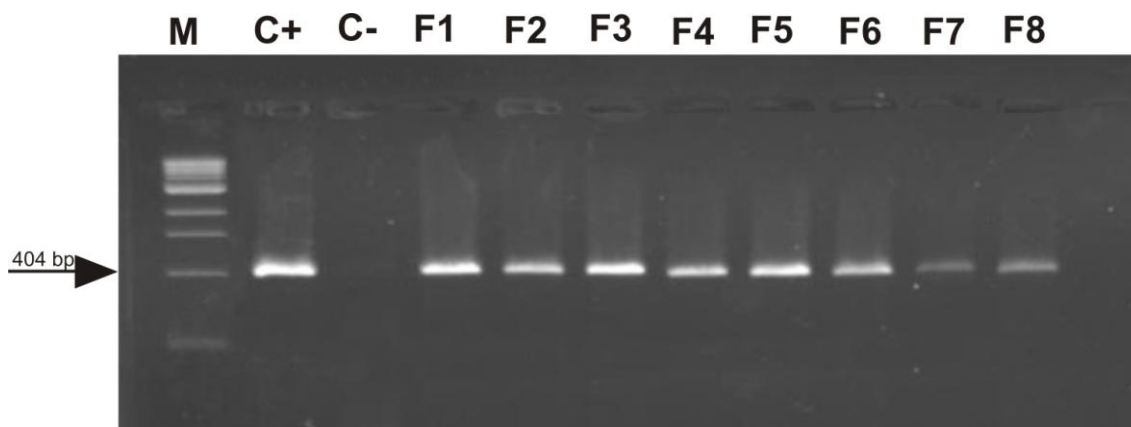


Fig 4: Diagnóstico de integração do T-DNA em plantas de tabaco via PCR utilizando oligonucleotídeos para o gene *hptII*. M: marcador de peso molecular 1Kb ladder (Promega®); C+: controle positivo (plasmídeo pCAMBIAOxDc); C-: controle negativo (planta não transformada); F1-F8: plantas transformadas.

4.2 Teste de resistência das plantas transgênicas ao ácido oxálico

A análise da resistência das plantas transgênicas de tabaco ao ácido oxálico demonstrou que a resistência varia de acordo com a linhagem transgênica analisada e com o tempo de exposição ao estresse. A progressão dos sintomas provocados pelo ácido oxálico nas 8 linhagens transgênicas e no tratamento correspondente ao controle positivo, 48 horas após a inoculação, está ilustrado na Figura 5. Pode-se observar, após esse período, o início da formação de lesões necróticas na folha da planta de controle positivo e também em algumas linhagens transgênicas, com exceção de F1, F2, F4 e F6. Após 72h de inoculação, foram intensificadas as diferenças nas respostas de resistência entre as linhagens transgênicas, com o aumento dos sintomas de necrose na região dos vasos condutores e murchamento das folhas, conforme evidenciado no controle positivo e nas linhagens F3, F5, F7 e F8. No entanto, as linhagens F1, F2, F4 e F6 apresentaram sintomas menos severos de estresse provocado pelo ácido oxálico (Figura 6). Esses resultados podem estar correlacionados com os níveis de expressão do gene *OxDc* nas diferentes linhagens transgênicas.

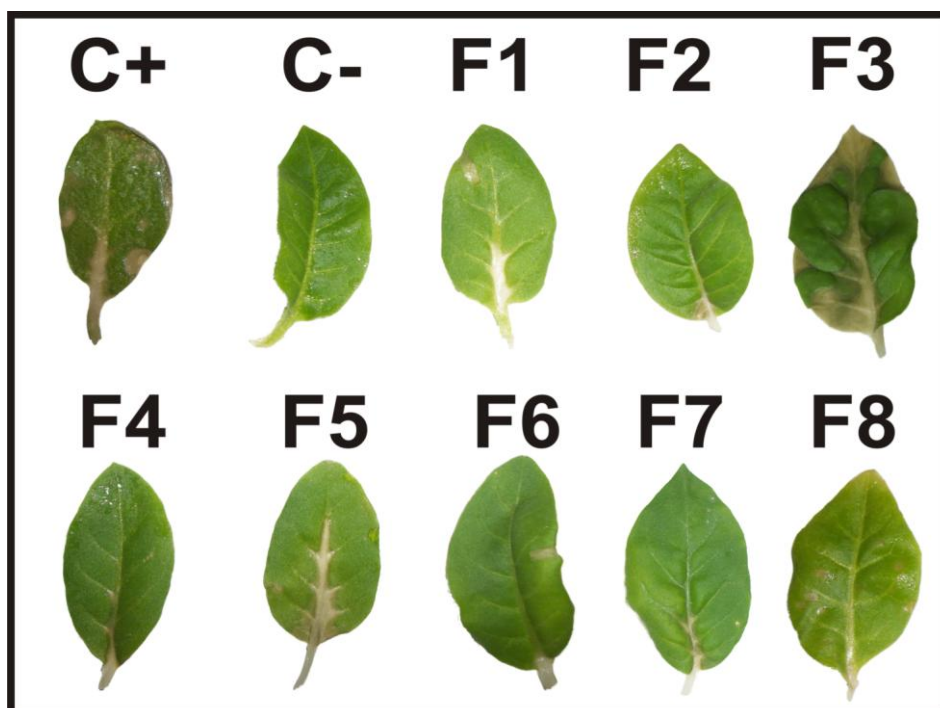


Fig 5: Efeito do ácido oxálico 20 mM em plantas controle (C- e C+) e transformadas (F1-F8) de *N. tabacum*. Foto capturada 48h após a inoculação. Pode-se observar o início de lesões necróticas na região do pecíolo no controle positivo em relação ao tratamento inoculado com tampão fosfato a pH 4. (C+: Planta não transgênica inoculada com tampão fosfato pH4 + 20mM de ácido oxálico; C- Planta não transgênica inoculada com tampão fosfato pH 4).

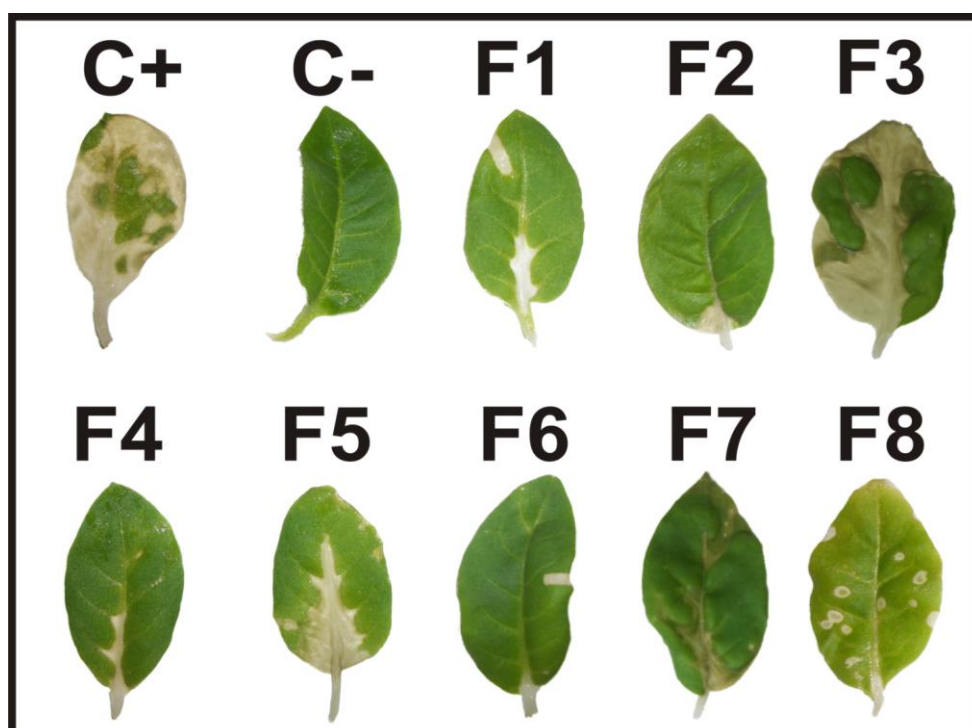


Fig 6: Efeito do ácido oxálico 20 mM em plantas controle e transformadas de *N. tabacum*. Foto capturada 72h após a inoculação. O murchamento e as lesões necróticas na região do pecíolo e nervuras centrais correspondem ao efeito do ácido oxálico sobre o tecido vegetal. (C+ Planta não transgênica inoculada com tampão fosfato pH 4 + 20mM de ácido oxálico; C- Planta não transgênica inoculada com tampão fosfato pH4).

4.3 Teste de resistência das plantas transgênicas à *Fusarium oxysporum*

Discos de micélios com 3 mm de diâmetro foram cortados a partir das margens de crescimento e aplicados à superfície adaxial de folhas jovens adivindas de material *in vitro* totalmente expandidas, sendo a expansão da lesão fotodocumentada. As linhagens F1, F2, F4 e F6 mostraram sintomas menos severos do que o restante das linhagens (Figura 7). Apesar de o micélio de *Fusarium oxysporum* ser capaz de iniciar seu crescimento e se ligar à superfície das folhas, aquelas provenientes de plantas transgênicas se mostraram resistentes à colonização da área foliar (Figura 7C). Em contrapartida, a colonização dos tecidos foi vasta nas folhas das plantas não transgênicas (Figura 7D). O desenvolvimento da progressão da doença nas 8 linhagens transgênicas após 90 horas é ilustrado (Figura 8). A curva de progresso da doença exibiu um atraso nas linhagens transgênicas F1, F2, F4 e F6 em comparação com o genótipo não transgênico (Figura 8A). Já as linhagens F3, F5, F7 e F8 não apresentaram diferenças significativas comparadas com o controle (plantas não transgênicas) e os sintomas foram mais severos para a linhagem F3 após decorridas as 90 horas do que para as outras linhagens (Figura 8B).

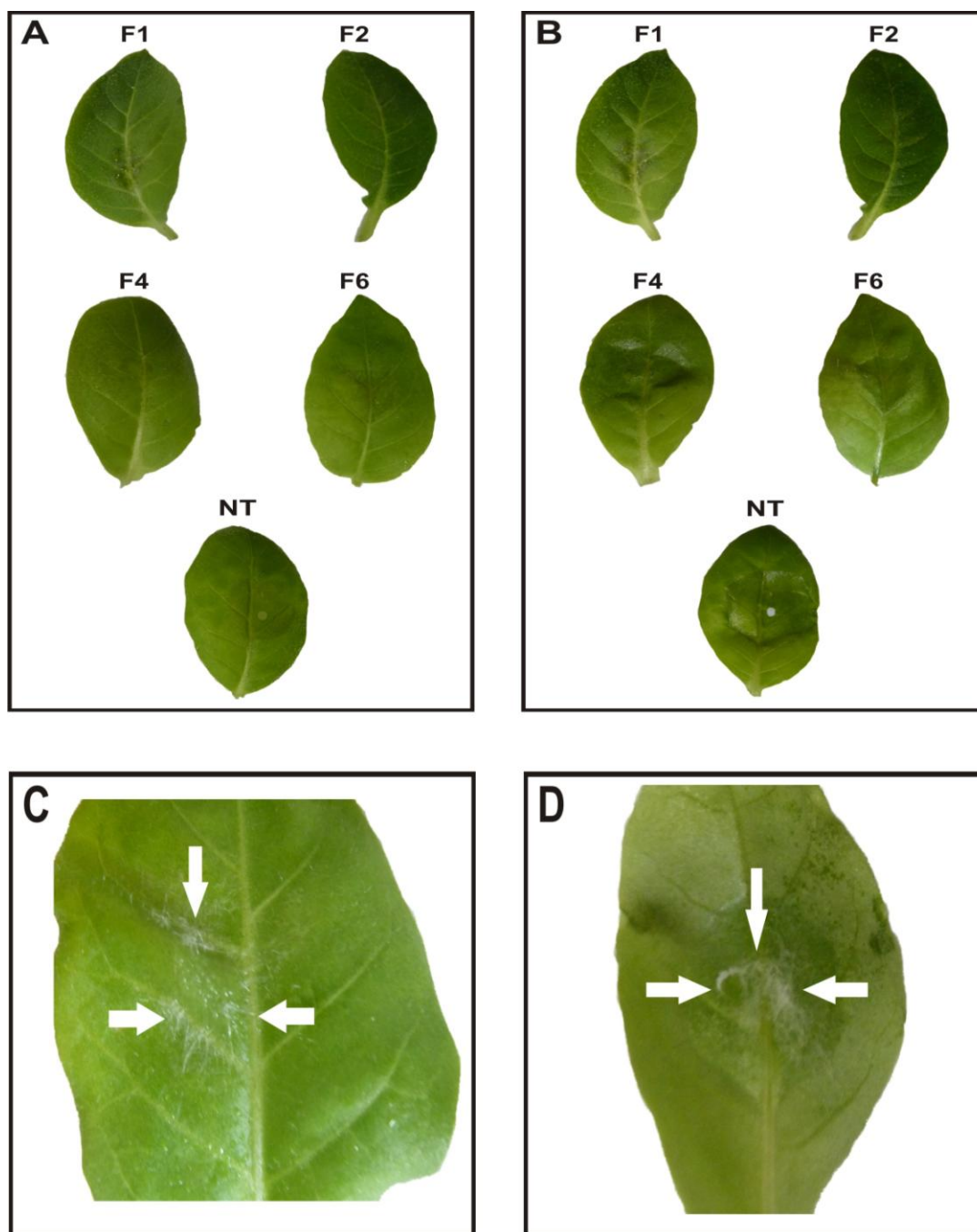


Fig.7: Resistência das plantas transgênicas a inoculação com *Fusarium oxysporum*. A: Folhas 1, 2, 4, 6 e NT (não transformada), após 42 horas de inoculo; B: Folhas 1, 2, 4, 6 e NT (não transformada), após 66 horas de inoculo; C: Detalhe do crescimento do micélio de *Fusarium oxysporum* sobre a superfície de uma folha transgênica sem ser capaz de iniciar a doença (setas); D: Detalhe da instalação da doença sobre a superfície foliar de uma planta não transformada.

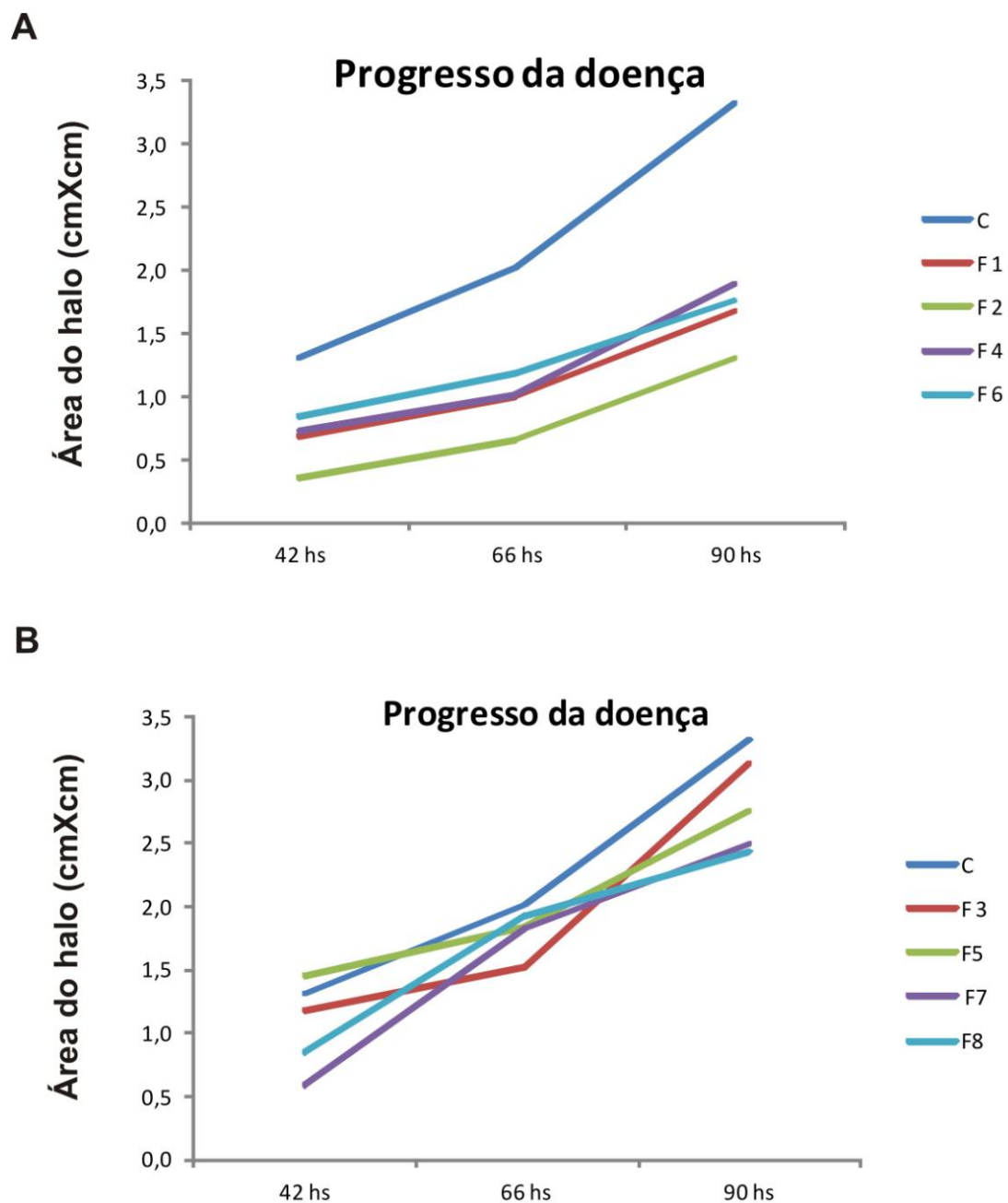
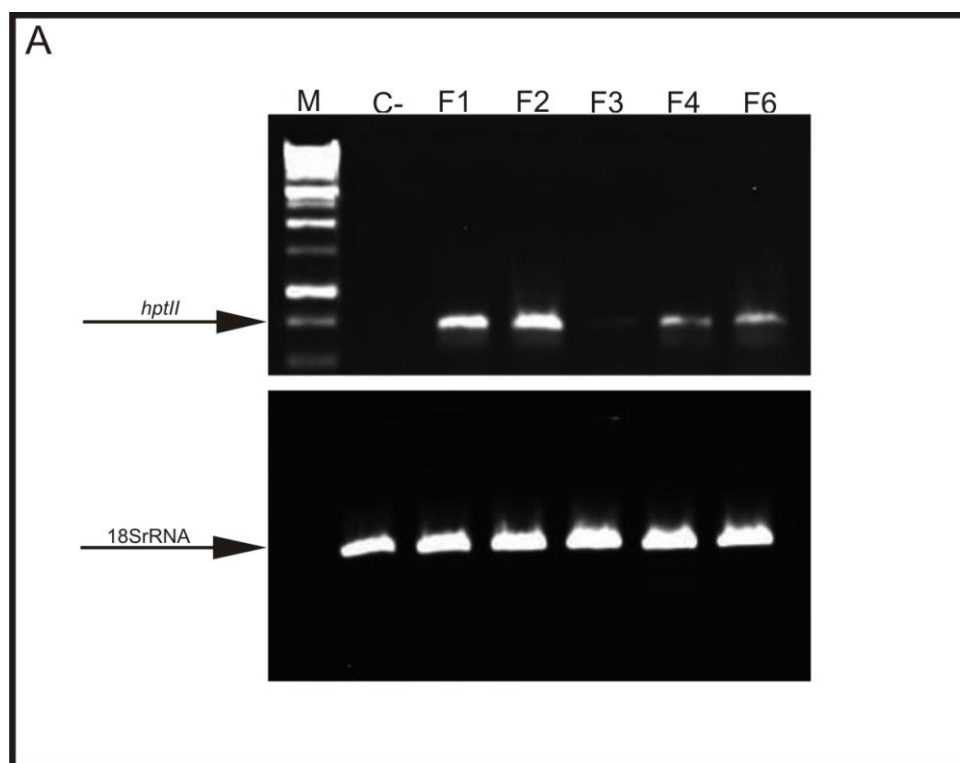


Fig.8: Curva do progresso da doença das linhagens transgênicas de tabaco OxDc e do controle (planta não transformada) após a incubação com o patógeno *Fusarium oxysporum*. A medida da área infectada em cada tempo, foi a média de 9 repetições. A: C (controle), F1, F2, F4 e F6; B: C (controle), F3, F5, F7 e F8.

4.4 Análise da expressão do gene *OxDc* através de RT-PCR

Com a finalidade de se confirmar a expressão do gene *OxDc*, as plantas F1, F2, F4 e F6, que apresentaram maior resistência, e a planta F3 que apresentou menor resistência contra o fungo *Fusarium oxysporum*, foram analisadas por meio de amplificação com oligonucleotídeos específicos. As plantas transgênicas mostraram amplificação do gene *OxDc*, enquanto que, na planta não transgênica, a amplificação do gene *OxDc* não foi observada. A intensidade da banda amplificada foi comparada com o controle endógeno 18S rRNA, o que permitiu quantificar a expressão relativa do transgene nas diferentes linhagens analisadas (Figura 9).



B

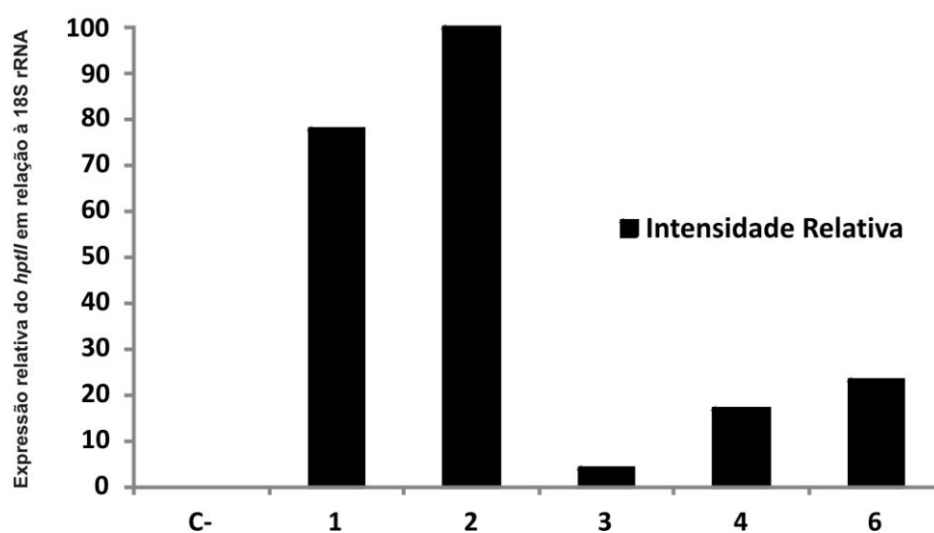


Fig. 9: A: RT-PCR para a detecção da expressão do gene exógeno *hptII* e do gene endógeno 18S rRNA nas linhagens transgênicas de tabaco; B: Quantificação da expressão relativa do gene *hptII* em relação à 18S rRNA. M: marcador de peso molecular 1Kb leader (Promega®), C-: controle negativo (planta não transformada), F1-F6: plantas transformadas.

5 DISCUSSÃO

A transformação genética das plantas de tabaco via *Agrobacterium* apresentou um rendimento elevado de brotos regenerados transformados, sendo um método eficiente de transformação. A transformação genética de plantas de diferentes espécies utilizando *Agrobacterium* é uma técnica muito difundida por possuir protocolos de simples execução, com satisfatória eficiência de transformação e por apresentar baixo custo quando comparada com outras técnicas, como a biobalística, por exemplo (RIBEIRO et al., 2010). O tabaco (*Nicotiana tabacum*), espécie vegetal pertencente à família Solanaceae, possui um histórico estabelecido como planta-modelo para a transformação genética vegetal. As maiores vantagens do tabaco incluem sua alta taxa de regeneração *in vitro*, seu genoma relativamente pequeno, facilitando as manipulações moleculares, a tecnologia madura de transferência e expressão gênica, o alto rendimento de biomassa (mais de 100.000 kg por hectare), o potencial de produção rápida em larga-escala devido ao ciclo curto, grande produção de sementes, e a disponibilidade de infra-estrutura para o processamento em larga-escala (MA, DRAKE e CHRISTOU, 2003; DUNG et al., 2006; ROMMENS, 2006).

O gene *OxDc* teve expressão confirmada através da técnica de RT-PCR. Ao se comparar entre as bandas amplificadas para *hptII* com as bandas 18S observa-se que os níveis de expressão do gene variaram entre as diferentes linhagens avaliadas. Muitos fatores podem ser responsáveis pela expressão variável do transgene, incluindo os efeitos relacionados com o número de cópias e com a integração aleatória do transgene em sítios não direcionados no genoma da planta, a tendência do DNA exógeno sofrer rearranjo antes da integração e efeitos de metilação do DNA (KONEZ et al., 1989; REMY et al., 2005; GELVIN e KIM, 2007). Resultados semelhantes foram observados por Cunha et al. (2010) e Silva et al. (2011), os quais transformaram plantas de

soja e de tabaco com o gene *OxDc* usando a metodologia mediada por *Agrobacterium*.

Muitos são os relatos na literatura quanto à ação do ácido oxálico na evolução de doenças causadas por fitopatógenos. O ácido oxálico é uma fitotoxina que pode ser produzida por patógenos necrotróficos que acometem as plantas. Uma das primeiras respostas de defesa das plantas a patógenos invasores é a indução da resposta hipersensitiva seguida pela morte celular local. Esse sistema é determinante no impedimento à instalação e ao crescimento de patógenos biotróficos. Entretanto, a resposta hipersensitiva não protege a planta contra o ataque de patógenos necrotróficos, já que estes utilizam as células mortas como fonte de energia. Neste caso, a morte celular facilita a colonização do tecido vegetal hospedeiro (VAN KAN, 2006).

No presente trabalho, foi demonstrada a capacidade do gene *OxDc* em proteger as plantas transgênicas da ação degenerativa do ácido oxálico em comparação à planta controle (não transformada). O teste com folhas excisadas mostrou que as plantas transgênicas foram capazes de tolerar a concentração de 20 mM de ácido oxálico *in vitro*. Resultados similares também foram relatados por Kesarwani et al. (2000) e por Silva et al. (2011) que observaram que plantas transgênicas tratadas com ácido oxálico são mais resistentes à murcha e à necrose foliar do que plantas não transformadas com o gene *OxDc*.

Os mecanismos de ação do ácido oxálico durante o processo de infecção ainda não são totalmente esclarecidos. Entretanto, algumas propostas têm sido apontadas para explicar como o ácido oxálico atua durante o processo de infecção. Utilizando plantas de soja Favaron, Sella e D'ovidio (2004) mostraram que o ácido oxálico produzido pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* se acumula nos tecidos das plantas e reduz o pH para que enzimas de degradação da parede celular possam funcionar. O pH baixo também está envolvido na regulação de certos genes que promovem a patogenicidade em fungos (ROLLINS e DICKMAN, 2001; CHEN et al., 2004). O ácido oxálico é capaz de alterar a integridade da parede celular das plantas por quelar íons Ca^{2+} permitindo, assim, que enzimas, especificamente pectinases hidrolisem

componentes da parede celular (BATEMAN e BEER, 1965; MAXWELL e LUMSDEN, 1970). Cessna et al. (2000) também demonstraram que o ácido oxálico é capaz de inibir a explosão oxidativa, uma resposta de defesa antecipada. Guimaraes e Stotz (2004) mostraram que o ácido oxálico altera osmorregulação das células guarda e concomitantemente, inibe o fechamento estomático induzido pelo ácido abscísico, causando murcha e necrose foliar. Errakhi et al. (2008) e Kim, Min e Dickman (2008) sugeriram que o ácido oxálico atua como uma molécula de sinalização, iniciando a morte celular programada através dos sistemas endógenos da planta.

Dentre as enzimas existentes, a oxalato oxidase (OXO) e a oxalato descarboxilase (OXDC) são capazes de degradar o ácido oxálico. A primeira enzima converte o ácido oxálico em dióxido de carbono e peróxido de hidrogênio, enquanto a segunda, converte o ácido oxálico em dióxido de carbono e formato. Sabe-se que o papel do H_2O_2 na defesa das plantas depende da sua concentração no (MITTLER, 2002). Baixos níveis de H_2O_2 induzem proteção por enzimas antioxidantes e ativam a cascata de sinalização sistêmica (SOLOMON et al., 1999). Enquanto que níveis moderados a altos de H_2O_2 desencadeiam a morte celular programada (TENHAKEN et al., 1995; FLEURY, MIGNOTTE e VAYSSUERE, 2002). Assim, o gene *OxDc* exibe uma grande vantagem em relação ao OXO devido 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.

No presente trabalho a expressão do gene *OxDc* de *F. velutipes* em plantas de tabaco foi demonstrada. As análises moleculares mostraram o sucesso da integração do gene no genoma das plantas de tabaco, a expressão e a atividade da enzima oxalato descarboxilase. O experimento de inoculação das folhas de tabaco com o fungo *Fusarium oxysporum* mostrou uma redução na severidade da doença nas plantas transgênicas, comparadas com as controle (não transgênicas), sendo que o grau no avanço da lesão variou entre as linhagens. Resultados semelhantes foram obtidos por Kesarwani et al. (2000) e Cunha et al. (2010) ao expressarem o gene *OxDc* em plantas de tomate e soja. Sabe-se que a expressão de um transgene localizado na

cromatina ativa ou na heterocromatina é altamente variável, mesmo entre linhas independentes transformadas com o mesmo vetor (DIAS et al., 2006).

Outros trabalhos também demonstraram que a expressão constitutiva de Oxalato Oxidase em tabaco, girassol, amendoim, castanha, milho e tomate gerou uma maior resistência contra patógenos que produzem ácido oxálico (DONALDSON et al. 2001; HU et al., 2003; LIVINGSTONE et al., 2005; WELCH et al., 2006; MAO et al., 2007; WALZ et al., 2008). Similarmente, o gene de Oxalato Descarboxilase de *Collybia velutipes* (syn. *Flammulina velutipes*) foi incorporado no genoma de tabaco, tomate, alface e soja, aumentando a resistência contra fungos necrotróficos que utilizam o ácido oxálico no processo de infecção (KESARWANI et al., 2000; DIAS et al., 2006, CUNHA et al., 2010, SILVA et al., 2011).

Nossos resultados sugerem que plantas com a capacidade de degradar o ácido oxálico apresentam maior resistência à infecção causada por *Fusarium oxysporum* e que o ácido oxálico é determinante na patogênese. Esses resultados são corroborados pelo fato de que mutantes de *Sclerotinia sclerotiorum* que não têm a habilidade de produzir o ácido oxálico não causam patogênicidade às plantas após a inoculação (GODOY et al., 1990).

Como tem sido demonstrado na literatura, o transgene incorporado no genoma das plantas pode ser eliminado de uma geração para outra, o que ocorre devido à instabilidade genética como resultado da cultura de tecidos (JOERSBO et al., 1999), da recombinação intracromossômica (FLADUNG, 1999) ou como um processo de defesa genômica (ROMANO et al., 2005).

6 CONCLUSÃO

A enzima oxalato descarboxilase demonstrou ser eficiente no combate ao patógeno *Fusarium oxysporum* que tem sido pouco estudado apesar de causar grandes perdas econômicas nas plantações, dentre elas, tomate, abacaxi, algodão, amendoim e morango. A nosso conhecimento esse é o primeiro trabalho que demonstra a indução de resistência de plantas infectadas com esse patógeno como resultado da expressão do gene *OxDc*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. 1997. **Plant pathology**. 4th Ed. New York, Academic Press, 635p.
- ANAND, R.; DORRESTEIN, P.C.; KINSLAND, C.; BEGLEY, T.P.; EALICK, S.E. 2002. Structure of oxalate decarboxylase from *Bacillus subtilis* at 1.75 Å resolution. **Biochemistry**, **41**: 7659 –7669.
- BATEMAN, D.F.; BEER, S.V. 1965. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, **55**: 204–211.
- BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. 1998. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa. 309 p.
- CESSNA, S.G.; SEARS, V.E.; DICKMAN, M.B.; LOW, P.S. 2000. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. **The Plant Cell**, **12**: 2191-2199.
- CHEN, C.; HARELL, Z.; GOROVOITS, R.; YARDEN, O.; DICKMAN, M.B. 2004. MAPK regulation of sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum* is linked with pH and cAMP sensing. **Molecular Plant Microbe Interactions**, **17**: 404-413.
- CUNHA, W.G.; TINOCO, M.L.P.; PANCOTI, H.L.; RIBEIRO, R.E.; ARAGÃO F.J.L. 2010. High resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic soybean plants transformed to express an oxalate decarboxylase gene. **Plant Pathology**, **59**: 654–660.
- DIAS, B.B.A.; CUNHA, W.G.; MORAIS, L.S., VIANNA, G.R.; RECH, E.L.; CAPDEVILLE, G.; ARAGÃO, F.J.L. 2006. Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*, **Plant Pathology**, **55**: 187–193.
- DI PIETRO, A.; MADRID, M.P.; CARACUEL, Z.; JARANA, J.D.; RONCERO, M.I.G. 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. **Molecular Plant Pathology**, **5**: 315–325.

DICKSON, M.H.; HUNTER, J.E.; 1983. Modification of methods for screening for white mold resistance in greenhouse. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 26**: 85–86.

DONALDSON, P.A.; ANDERSON, T.; LANE, B.G.; DAVIDSON, A.L.; SIMMONDS, D.H. 2001. Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (*germin*) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology, 59**: 297–307.

DUNG, T.; DUC, L.; HO, N.; UYEN N. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of CRY1Ac gene to tobacco (*Nicotiana tabacum*) and evaluation of *Heliothis armigera* resistance. **Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture, 22**: 161-169.

DUTTON, M.V.; KATHIARA, M.; GALLAGHER, I.M.; EVANS, C.S. 1994. Purification and characterization of oxalate decarboxylase from *Corioliolus versicolor*. **FEMS Microbiology Letters, 116**: 321 – 326.

DUTTON, M.V.; EVANS, C.S. 1996. Oxalate production by fungi: Its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. **Canadian Journal of Microbiology, 42**: 881-895.

DUNWELL, J.M.; KHURI, S.; GANE, P.J. 2000. Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure, and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. **Microbiology and molecular biology reviews, 64**: 153–179.

DUNWELL, J.M.; PURVIS, A.; KHURI, S. 2004. Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? **Phytochemistry, 65**:7– 17.

ERRAKHI, R.; MEIMOUN, P.; LEHNER, A.; VIDAL, G.; BRIAND, J.; CORBINEAU, F.; RONA, J.P.; BOUTEAU, F. 2008. Anion channel activity is necessary to induce ethylene synthesis and programmed cell death in response to oxalic acid. **Journal of Experimental Botany, 11**: 3121–3129.

FLADUNG, M. 1999. Gene stability in transgenic aspen (*Populus*).I. Flanking DNA sequences and T-DNA structure. **Molecular and General Genetics, 260**: 574 –581.

FLEURY, C.; MIGNOTTE, B.; VAYSSUERE, J. L. 2002. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signalling. **Biochimie, 84**: 131–141.

FAVARON, F.; SELLA, L.; D'OVIDIO, R. 2004. Relationships among endopolygalacturonase, oxalate, pH, and plant polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in the interaction between *Sclerotinia sclerotiorum* and soybean. **Molecular Plant Microbe Interactions, 17**: 1402-1409.

GELVIN, S.B.; KIM, S. 2007. Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration and transgene expression. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1769**: 410 – 421.

GODOY, G.; STEADMAN, J.R.; DICKMAN, M.B.; DAM, R. 1990. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, **37**:179–91.

GUIMARAES, R.L.; STOTZ, H.U. 2004. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. **Plant Physiology**, **136**: 3703-3711.

HU, X.; BIDNEY, D.L.; YALPANI, N.; DUVICK, J.P.; CRASTA, O.; FOLKERTS, O.; LU, G. 2003. Overexpression of a gene encoding H₂O₂-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. **Plant Physiology**, **133**:170-181.

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

KHURI, S.; BAKKER, F.T.; DUNWELL, J.M. 2001. Phylogeny, function, and evolution of the cupins, a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins. **Molecular Biology and Evolution**, **18**: 593– 605.

KIM, K.S.; MIN, J.Y.; DICKMAN, M.B. 2008. Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. **Molecular Plant Microbe Interactions**, **21**: 605-612.

KONEZ, C.; MARTINI, N.; MAYERHOFER, R.; KONEZ, K.Z.; KORBER, H.; REDEI G.P. 1989. High frequency T-DNA mediated gene tagging in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **86**: 8467–8471.

LEHNER, A.; MEIMOUN, P.; ERRAKHI, R.; MADIONA, K.; BARAKATE, M.; BOUTEAU, F. 2008. Toxic and signalling effects of oxalic acid Oxalic acid— Natural born killer or natural born protector? **Plant Signaling & Behavior**, **9**: 746-748.

LIVINGSTONE, D.M.; HAMPTON, J.L.; PHIPPS, P.M.; GRABAU, E.A. 2005. Enhancing resistance to *Sclerotinia minor* in peanut by expressing a barley oxalate oxidase gene. **Plant Physiology**, **137**: 1354–1362.

MA, J.K.; DRAKE, P.M.W.; CHRISTOU, P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. **Nature**, **4**: 794 – 805.

MÄKELÄ, M.R.; HILDÉN, K.; LUNDELL, T.K. 2010. Oxalate decarboxylase: biotechnological update and prevalence of the enzyme in filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **87**: 801– 814.

MAO, J.; BURT, A.J.; RAMPUTH, A.; SIMMONDS, J.; CASS, L.; HUBBARD, K.; MILLER, S.; ALTOSAAR, I.; ARNASON, J.T. 2007. Diverted Secondary Metabolism and Improved Resistance to European Corn Borer (*Ostrinia nubilalis*) in Maize (*Zea mays* L.) Transformed with Wheat Oxalate Oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **55**: 2582–2589.

MAXWELL, D. P.; LUMSDEN, R. C. 1970. Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture. **Phytopathology**, **60**: 1395-1398.

MOSS, M.O.; SMITH, J.E. 1984. **The Applied Mycology of Fusarium**. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

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

MITTLER, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, **7**: 405– 410.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, **15**:473–497.

REMY, S.; THIRY, E.; COEMANS, B.; WINDELINCKX, S.; SWENNEN, R.; SÁGI, L. 2005. Improved T-DNA vector for tagging plant promoters via high-throughput luciferase screening. **Biotechniques**, **38**: 763-770.

RIBEIRO, J.M.; BASTOS, D.C.; OLIVEIRA, E.A.G.; SOUZA, J.A.M. PINTO, M.S.T.; HANSEN, E.E.T. 2010. Transformação de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) com os genes recombinantes 35SHBsAg e 35SHBsAgER do vírus da hepatite B. **Biotemas**, **23**: 1-11.

ROLLINS, J.A.; DICKMAN, M.B. 2001. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a pacC/RIM1 homolog **Applied and Environmental Microbiology**, **67**: 75-81.

ROMANO, E.; SOARES, A.; PROITE, K.; NEIVA, S.; GROSSI, M.; FARIA, J.C.; RECH, E.L.; ARAGÃO, F.J.L. 2005. Transgene elimination in genetically modified dry bean and soybean lines. **Genetics and Molecular Research**, **4**: 177–84.

ROMMENS, C. 2006. Kanamycin resistance in plants: an unexpected traits controlled by a potentially multifaceted gene. **Trends in Plant Science**, **11**: 317-319.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, **67**: 1051–6.

SHEN, Y.H.; LIU, R.J.; WANG, H.Q.; 2008. Oxalate decarboxylase from *Agrobacterium tumefaciens* C58 is translocated by a twin arginine translocation system. **Journal of Microbiology Biotechnology**, **18**:1245–1251.

SILVA, L.F.; DIAS, C.V.; CIDADE, L. C.; MENDES, J.S.; PIROVANI, C.P.; ALVIM, F.C.; PEREIRA, G.A.G.; ARAGÃO, F.J.L.; CASCARDO, J.C.M.; COSTA, M.G.M.C. 2011. Expression of an Oxalate Decarboxylase Impairs the Necrotic Effect Induced by Nep1-like Protein (NLP) of *Moniliophthora perniciosa* in Transgenic Tobacco. **The American Phytopathological Society**, **24**: 839–848.

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLE DONNE, M.; MENACHEM, E.; LEVINE, A. 1999. The involvement of cysteine protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **Plant Cell**, **11**: 431–443.

TENHAKEN, R.; LEVINE, A.; BRISSON, L.F.; DIXON, R. A.; LAMB, C. 1995. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **92**: 4158 – 4163.

VAN KAN, J.A.L. 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. **Trends in Plant Science**, **11**: 247– 253.

WALZ, A.; ZINGEN-SELL, I.; LOEFFLER, M.; SAUER, M. 2008. Expression of an oxalate oxidase gene in tomato and severity of disease caused by *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, **57**: 453–458.

WELCH, A.J.; STIPANOVIC, A.J.; MAYNARD, C.A.; POWELL, W.A. 2007. The effects of oxalic acid on transgenic *Castanea dentata* callus tissue expressing oxalate oxidase. **Plant Science**, **172**: 488–496.

Capítulo 2

PgAMP₁: Peptídeo rico em glicina confere resistência contra a bactéria fitopatogênica *Xanthomonas fragarie*

1 INTRODUÇÃO

Os fitopatógenos atacam uma ampla gama de lavouras agrícolas de extrema importância, causando perdas significativas na produção. No geral, o combate às infecções microbianas nas lavouras consiste na aplicação de produtos químicos e/ou no desenvolvimento de cultivares resistentes. Entretanto, patógenos de plantas possuem uma natureza biológica dinâmica, o que leva ao aparecimento constante de novas estirpes virulentas de microrganismos que são menos sensíveis aos antimicrobianos químicos ou que são capazes de superar as plantas existentes tidas como tolerantes ou resistentes. Ao longo dos anos, as plantas desenvolveram a habilidade de se proteger através da ativação uma série de respostas de defesa para conter a invasão pelos patógenos (KOVALSKAYA et al., 2011).

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas de defesa contra patógenos microbianos e recentemente tem ganhado destaque nas pesquisas por todo mundo. AMPs exibem um amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos, vírus e protozoários. Necessitam de baixas concentrações inibitórias mínimas e causam danos rápidos nas células microbianas (SARIKA, IQUEBAL e RAI, 2012).

Nas plantas, os peptídeos antimicrobianos denominados proteínas ricas em glicina (GRPs) tem despertado interesse. As proteínas GRPs foram primeiramente descritas como proteínas de armazenamento, devido ao fato delas serem utilizadas como fonte de resíduos de aminoácidos essenciais (MOUSAVI e HOTTA, 2005). Uma segunda função observada recentemente tem sido a de defesa. Elas são encontradas no tecido vascular, principalmente no xilema (KELLER, SAUER e LAMB, 1988; KELLER, TEMPLETON e LAMB, 1989), tendo sido também encontradas no hipocótilo, caule e pecíolo (YE e NG, 2000).

As GRPs podem ser caracterizadas pela presença de resíduos de glicina em sua sequência primária, sendo que a porcentagem desses resíduos varia de um organismo para outro (MOUSAVI e HOTTA, 2005). Essas proteínas são classificadas em três grupos diferenciados, de acordo com a quantidade de resíduos de glicina em sua estrutura. O primeiro grupo compreende aquelas proteínas que possuem mais de 70% de resíduos de glicina em sua estrutura primária e também podem possuir domínios conservados conhecidos como motivos de reconhecimento de RNA (RRMs). O segundo grupo engloba aquelas GRPs com uma quantidade menor de resíduos de glicina do que os do primeiro grupo. No terceiro grupo estão aquelas GRPs com uma grande quantidade de glicina, porém sem formar domínios (RINGLI et al., 2001). Em diversos gêneros de plantas a expressão dessas GRPs tem sido ativada por muitos fatores, bióticos e abióticos (MANGEON et al., 2010).

O Pg-AMP₁, um peptídeo identificado por Pelegrini et al. (2008) em sementes de goiaba (*Psidium guajava*), pertence ao terceiro grupo de GRPs, pois apresenta grandes quantidades do resíduo glicina, sem contudo formar domínios grandes. O PgAMP₁ foi o primeiro peptídeo rico em glicina isolado de plantas capaz de promover atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas patogênicas ao homem (PELEGRINI et al., 2008; TAVARES et al., 2012).

O gênero *Xanthomonas* inclui inúmeras espécies de bactérias fitopatogênicas, sendo cada uma delas caracterizada por uma série de hospedeiros restritos. No entanto, os membros desse gênero são capazes de

infectar uma grande variedade de plantas, distribuídas entre 124 espécies monocotiledoneas e 26 eudicotiledôneas (AUDY et al., 1994).

A mancha angular do morangueiro é uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas fragariae*, que é um fitopatógeno disseminado em todas as principais áreas de cultivo de morangueiro (STÖGER et al., 2008). O isolamento e o combate dessa doença não são realizados com facilidade, mesmo nas plantas que apresentam sintomas (STÖGER e RUPPITSCH, 2004).

Devido ao seu recente estudo, o peptídeo PgAMP₁ nunca havia sido testado contra bactérias fitopatogênicas e o foco do presente trabalho foi o de verificar se peptídeo Pg-AMP₁ também é capaz de inibir o crescimento da bactéria Gram-negativa *X. fragariae*.

2 OBJETIVOS

Obter plantas de tabaco geneticamente transformadas que expressem o peptídeo PgAMP₁

2.1 Objetivos específicos

1 - Obter linhagens geneticamente modificadas de *Nicotiana tabacum* contendo o gene Pg-AMP₁ de *Psidium guajava* e caracterizá-las em nível molecular;

2 - Analisar os efeitos *in vitro* do extrato bruto contendo o peptídeo Pg-AMP₁ extraído das folhas de tabaco contra a bactéria Gram-negativa *Xanthomonas fragariae*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para obtenção de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), sementes da variedade Xanthi passaram a ser utilizadas *in vitro* no laboratório de Genética e Biotecnologia - UFJF. Sob condições assépticas, as sementes foram esterilizadas utilizando-se solução de água e detergente tween 20 por 2 minutos, álcool etílico 70% (v/v) por 30 segundos e solução de hipoclorito de sódio 15% (v/v) por 10 minutos, seguido por cinco lavagens com água deionizada autoclavada. Posteriormente, as sementes foram germinadas em placas de Petri em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescido de glicose 20 mg/L e agar 7g/L, pH 5,8. As sementes foram germinadas em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16:8 h (luz:escuro) e $30 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As plantas obtidas foram mantidas *in vitro* em sala de crescimento, sendo utilizadas como fonte de explantes para os experimentos de transformação gen\u00e9tica.

3.2 Descrição do vetor de expressão

O gene que codifica o peptídeo Pg-AMP₁ foi sintetizado de acordo com a sequência de aminoácidos do peptídeo e utilizado como fonte de DNA para PCR nas subclonagens. A estratégia de subclonagem do vetor de expressão foi desenhada de maneira que o produto final da expressão tivesse uma cauda de histidina (His₆) na extremidade C-terminal, visando facilitar a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. A sequência codificadora do gene Pg-AMP₁ contém 165 pares de bases e foi sintetizada pela empresa Epotech Biolabs no vetor pBSSK (TAVARES, 2009). A sequência do Pg-AMP₁ his tag foi subclonada no vetor pK7WG2D (VIB ®) através do sistema gateway (Invitrogen ®). Primeiramente, utilizou-se a enzima BP clonase, que promove uma recombinação homóloga onde a sequência de interesse (Pg-AMP₁) foi inserida no vetor pDONOR221 (Invitrogen ®, Carlsbad). A partir dessa etapa, o vetor passou a ser denominado pENTRYPg-AMP₁. Sendo então, transferido para a linhagem bacteriana *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen®) por eletroporação, a fim de se recuperar uma maior quantidade de plasmídeos. Os plasmídeos recuperados foram então subclonados utilizando a enzima LR clonase (enzima que também promove recombinação homóloga). Porém, dessa vez, a troca foi feita entre os vetores pENTRYPg-AMP₁ e o vetor de expressão em plantas pK7WG2D, obtendo-se, assim, o vetor de expressão em plantas pK7WG2D-Pg-AMP₁-GFP (Figura 10). Este vetor carrega os genes de seleção *nptII* (resistência ao antibiótico canamicina), o gene repórter *GFP* (green fluorescence protein), que codifica uma proteína para visualização de fluorescência verde, além do gene codificador do peptídeo.

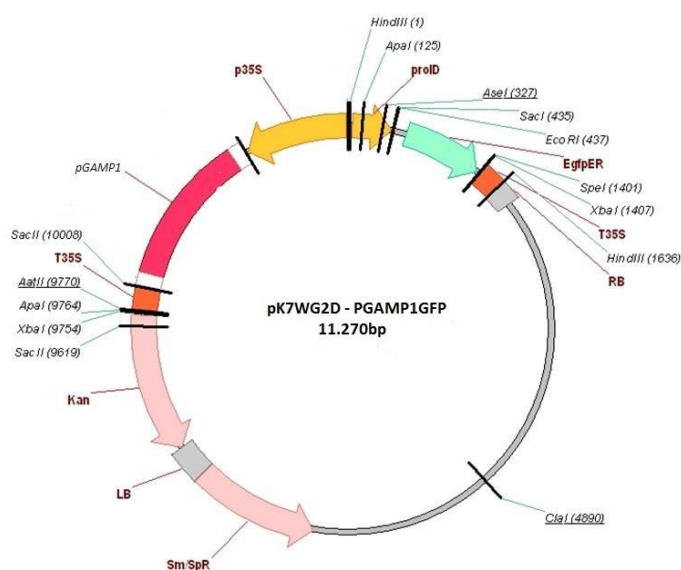


Fig.10: Mapa do vetor pK7WG2D-Pg-AMP₁-GFP utilizado em experimentos de transformação genética de *N. tabacum*.

3.3 Cultivo da *Agrobacterium*

O plasmídeo recombinante, pK7WG2D-Pg-AMP₁-GFP foi inserido por eletroporação na linhagem de *Agrobacterium* GV3101. A linhagem de *Agrobacterium* foi cultivada em meio Lysogny broth (LB) sólido, contendo triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, cloreto de sódio 10g/L, ágar 7g/L e os antibióticos rifampicina 100mg/L, gentamicina 50mg/L e espectinomicina 75mg/L, onde foram crescidas por 3 dias a 27°C. Para o experimento de transformação, uma única colônia foi incubada em quatro mililitros de LB líquido contendo os mesmos antibióticos citados anteriormente por 16h a 27°C em agitador orbital (Thermo Electron Corporation®) a 150 rpm.

3.4 Transformação de *Nicotiana tabacum* com o gene *Pg-Amp₁*

Após 16h de crescimento, a cultura de *Agrobacterium* possuindo o plasmídeo pK7WG2D-Pg-AMP₁-GFP teve a densidade óptica determinada até obtenção de fase exponencial de crescimento, com valores entre 0,5 e 1 OD. A cultura foi transferida para um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml estéril, sendo centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos. O pellet formado foi suspenso em NaCl 0,85% e acetoceringona (200 µM). As folhas de fumo provenientes do cultivo *in vitro* foram, então, cortadas ao meio e mergulhadas na suspensão, permanecendo na mesma no escuro, por um período de 48 horas, a temperatura de 25 °C.

3.5 Seleção das plantas transformadas com o gene *Pg-AMP₁*

Após as 48 horas, as folhas foram lavadas em água destilada autoclavada por três vezes, secas em papel filtro estéril e colocadas em meio de seleção MS, acrescido de glicose 20mg/L e agar 7g/L, BAP 1mg/L, para indução de brotos, timentin 200mg/L, para evitar o crescimento das bactérias remanescentes e canamicina 100mg/L, para seleção das células transformadas, pH5,8. As placas foram incubadas em sala de cultura a 25° C, com fotoperíodo de 16:8h (luz/escuro) e 30 µmol fótons m⁻² s⁻¹. Os explantes foram sub-cultivados a cada duas semanas até o surgimento de brotos que foram, então, transferidos para tubos de ensaio contendo meio de enraizamento MS, acrescido de glicose 20mg/L e agar 7g/L, pH 5,8.

3.6 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico das plantas de fumo foi realizada utilizando-se o método de mini-extração para PCR, conforme descrito por Brasileiro e Carneiro (1998). Cerca de 300 a 500 mg de tecido vegetal fresco de cada planta mantida *in vitro* foram macerados e imediatamente adicionados a 1 ml de tampão de extração para PCR (0,8% (p/v) de CTAB, 800 mM de NaCl, 22 mM de EDTA, 200 mM de tris-HCl pH 8, 0,2% (v/v) de β -mercaptoetanol, e 140 mM de sorbitol) e 400 μ l de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v). As amostras foram incubadas a 55 °C, por 10 minutos sob agitação, e depois centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos, recuperando-se o sobrenadante. Posteriormente, adicionou-se 1,2x de isopropanol gelado do volume recuperado do sobrenadante e as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 rpm, porém por 10 minutos. Os precipitados recuperados foram lavados com 1ml de etanol 70% (v/v) e novamente centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. O DNA precipitado foi seco em câmara de fluxo laminar e ressuspendido em 50 μ l de água destilada. As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 min antes do seu armazenamento a -20 °C.

3.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os brotos induzidos na presença de canamicina foram transferidos para meio de enraizamento por 30 dias. A avaliação da inserção do fragmento de interesse nas plantas que se mantiveram vivas após esse período foi feita pela reação da polimerase em cadeia (PCR). A PCR foi realizada em termociclador Eppendorf modelo Mastercycler® utilizando-se os primers KANR 489 (5'-TTGGCTACCCGTGATATTGC-3') e KANF 313 (5'-TGAACGATCTGCTTGACTC-3') que anelam-se dentro da região do gene *nptII* (neomicina fosfotransferase) que confere resistência a canamicina. Para a reação de PCR das plantas transformadas com o gene *Pg-AMP₁* foi usado um ciclo de 95 °C por 10 minutos; 34 ciclos (1min a 95 °C; 1 min a 58 °C; 1 min 72 °C) e um ciclo de extensão final de 10 minutos a 72 °C para o gene *nptII*. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e corados com *syber green* a fim de se obter um fragmento de 176 bp. O gel do material analisado foi capturado e armazenado em sistema de fotodocumentação digital.

3.8 Bioensaio bacteriano

A atividade antimicrobiana do Pg-AMP₁ recombinante foi testada contra a bactéria Gram-negativa *Xanthomonas fragariae*. O ensaio antibacteriano foi realizado em microplacas de 96 poços de polipropileno usando 100µL de meio LB inoculado com o microorganismo e 100µL do extrato bruto, em diferentes concentrações, diluído em MgCl₂ (10mM), segundo padrão do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003). O extrato bruto extraído de sete linhagens transgênicas diferentes de fumo foi diluído em cloreto de magnésio até as concentrações de 200, 100 e 50 µg/mL. Foram usados dois controles negativos, um contendo apenas o inóculo em meio LB e outro controle negativo contendo o inóculo e solução de MgCl₂ (10mM), a mesma usada na diluição do extrato. Já o controle positivo testado foi uma solução de cloranfenicol nas concentrações finais de 1.250; 125 e 12,5 µg/mL, diluídas com MgCl₂ (10mM). Todos os testes foram realizados em triplicata. A cultura de *Xanthomonas fragariae* foi crescida em meio líquido LB durante 72h a 27 °C e a OD final do inóculo foi de 1x10⁸ unidades formadoras de colônia (CFU ml⁻¹), equivalente ao padrão de 0,5 de McFarland. O efeito antibacteriano foi avaliado em Varioskan® Flash através da turbidez (OD 625 nm), 96h após o crescimento estático satisfatório da cultura a 27°C. Para verificar se o agente antimicrobiano apresentava ação bacteriostática ou bactericida, após a determinação do crescimento, uma alíquota de 20µL (de cada um dos tratamentos que apresentou efeito inibitório no crescimento) foi inoculada em 4 mL de meio LB líquido e incubada por 96h a 27°C em crescimento estático.

3.9 Extração da proteína recombinante

O extrato protéico bruto foi obtido de folhas jovens aclimatadas de tabaco recombinante maceradas em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido. O macerado foi recuperado, transferido para tubos de centrífuga de 50 ml onde foi adicionado tampão de extração (HCl 0,1%, NaCl 0,9 M, PMSF 2 mM e ácido ascórbico 0,1%) na proporção de 3:1. Os fragmentos de células foram removidos por três centrifugações a 5000 rpm de 20 min cada, sendo o sobrenadante, utilizado como fonte de proteína. Todas as etapas necessárias ao processo foram executadas a 4°C.

3.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS -PAGE)

O SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel) foi feito seguindo os procedimentos descritos por Sambrook e Russel (2001) de acordo com Laemmli (1970). O extrato bruto da proteína foi quantificado segundo o método de Bradford (1976), usando soro de albumina bovina (BSA) como padrão. Após a quantificação, a proteína foi precipitada com TCA 75% (Ácido Tricloro Acético). Cinco µL de tampão de amostra 4x (Tris-HCl 1,0M pH 6,8, SDS 20%, Betamercaptoetanol, Glicerol 250mM, Azul de Bromofenol) foram adicionados a 50µg de cada amostra de proteínas totais, sendo estas fervidas por 10 minutos antes de serem aplicadas no gel. O gel concentrador utilizado foi a 4% (1,1mL água deionizada, 1mL de tampão Tris-HCL 0,5M pH 6,8, 330µL de Bis-acrilamida 30%, 20µL de SDS 10%, 20µL Persulfato de amônio 10%, 2µL de TEMED). O gel separador foi a 18% (2mL água deionizada, 1,3mL de tampão Tris-HCL 1,5M pH 6,8, 1,6mL de Bis-acrilamida 30%, 20µL de SDS

10%, 20 μ L Persulfato de amônio 10%, 4 μ L de TEMED). As proteínas foram separadas por eletroforese vertical no Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System® (Bio-Rad) a uma corrente de 30 mA. O marcador utilizado foi PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-170-Fermentas®.

3.11 Western Blot

Após a corrida, o gel foi eletrotransferido para a membrana Hybond ECL 0,2 μ m de porosidade-GE Healthcare® a 100mA por 45 minutos. Após a eletrotransferência a membrana ficou 1:30h bloqueando em solução tampão de PBS (1x) (NaCl 137mM, Na₂HPO₄ 10mM, KCl 2,7mM, KH₂PO₄ 2mM), contendo caseína 3% e 0,1% de tween 20. A membrana foi incubada com anticorpo primário monoclonal IgG de camundongo Anti-His Antibody (GE) Healthcare® em uma diluição de 1:1000 em solução de bloqueio sem tween 20 por 3h, no escuro e no gelo. O anticorpo secundário foi incubado por 1h a 25°C com antimouse IgG em uma diluição de 1:1000 em solução de bloqueio sem tween 20. Os blots foram revelados com substrato quimioluminescente ECL Prime Western Blotting Detection Reagent-GE Healthcare® de acordo com instruções do fabricante e expostos ao filme da GE Healthcare.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção de plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* com o gene *PgAMP₁*

A transformação dos explantes de *Nicotiana tabacum* com o vetor pK7WG2D-Pg-AMP₁-GFP permitiu a obtenção de 19 linhagens transgênicas, representando eventos de transformação distintos. Para os ensaios foram utilizadas 7 plantas transformadas pois as demais não possuíam número suficiente de folhas no período de realização dos experimentos. O início da brotação *in vitro* dos explantes submetidos ao meio de indução de multiplicação se deu a partir de quatro semanas após a realização da cocultura. Todas as plantas regeneradas em meio seletivo apresentavam fenótipo normal (Figura 11). A natureza transgênica das plantas foi inicialmente determinada por meio de reações de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para amplificação do gene *nptII*. Para cada gel, uma banda de aproximadamente 176 bp correspondente ao tamanho esperado dos fragmentos amplificados foram obtidas em todas as linhagens transgênicas de *Nicotiana tabacum* utilizadas (Figura 12).

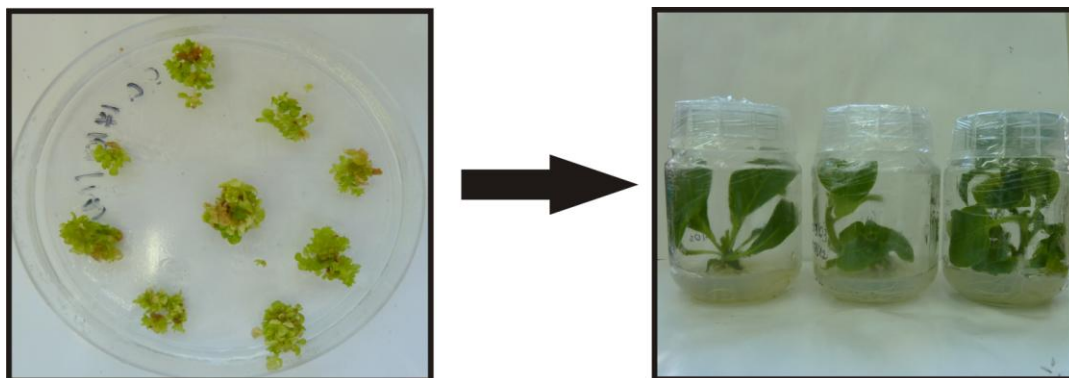


Fig.11: Processo de regeneração *in vitro* das linhagens transgênicas de tabaco PgAMP₁ com fenótipos normais.

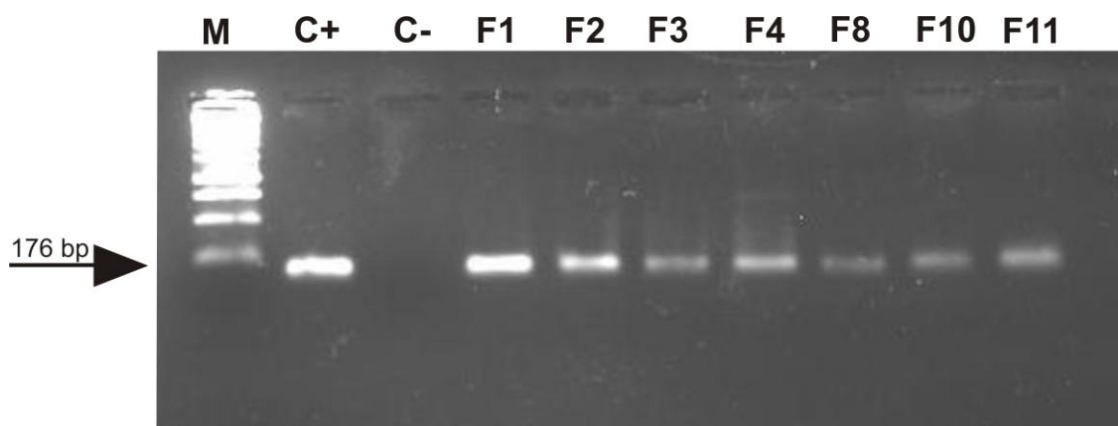


Fig.12: Diagnóstico de integração do T-DNA em plantas de tabaco via PCR utilizando oligonucleotídeos para o gene *nptII*. M: marcador de peso molecular 1Kb ladder (Promega®); C+: controle positivo (plasmídeo PK7WG2D-Pg-AMP₁-GFP); C-: controle negativo (planta não transformada); F1-F11: plantas transformadas.

4.2 Atividade antimicrobiana do peptídeo recombinante

O extrato bruto obtido de folhas de plantas aclimatadas contendo o peptídeo recombinante Pg-AMP¹ foi testado em bioensaios *in vitro* contra a bactéria Gram-negativa *Xanthomonas fragariae*. Três dos sete extratos testados mostraram atividade bactericida. O extrato bruto das plantas 1, 8 e 11 apresentaram atividade na concentração de 200µg/mL, sendo que as plantas 1 e 11 também apresentaram atividade na concentração de 100µg/mL. Nas demais linhagens testadas não foi observada atividade inibitória. O extrato bruto da planta controle (não transformada) mostrou-se incapaz de interferir no crescimento da bactéria, sendo que esta teve seu desenvolvimento equivalente ao dos controles negativos (Figura 13). Nenhum crescimento foi observado nos tratamentos de controle positivo com cloranfenicol. Todas as linhagens inibidas pelo Pg-AMP₁ recombinante apresentaram atividade bactericida, uma vez que após livres do agente antimicrobiano inibiram o crescimento do microorganismo, quando foram inoculadas em um novo meio de cultura (diluição 1:200) (Figura 14).

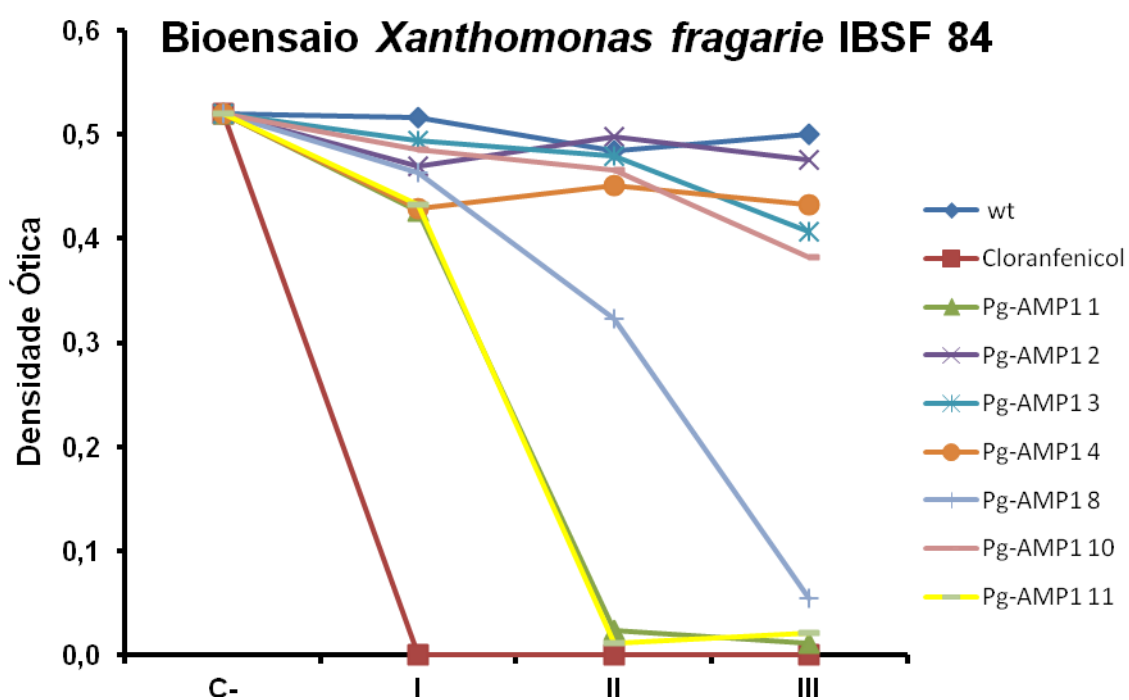


Fig.13: Bioensaio com extratos protéicos brutos extraído das plantas de tabaco PgAMP₁. C-: bactéria *X. fragariae* crescida em LB; I,II,III: Concentrações de cloranfenicol e extrato protéico bruto. Cloranfenicol: I: 12,5µg/mL; II: 125µg/mL; III: 1250µg/mL. Extrato proteico bruto: I: 50µg/mL; II: 100 µg/mL; III: 200 µg /mL.

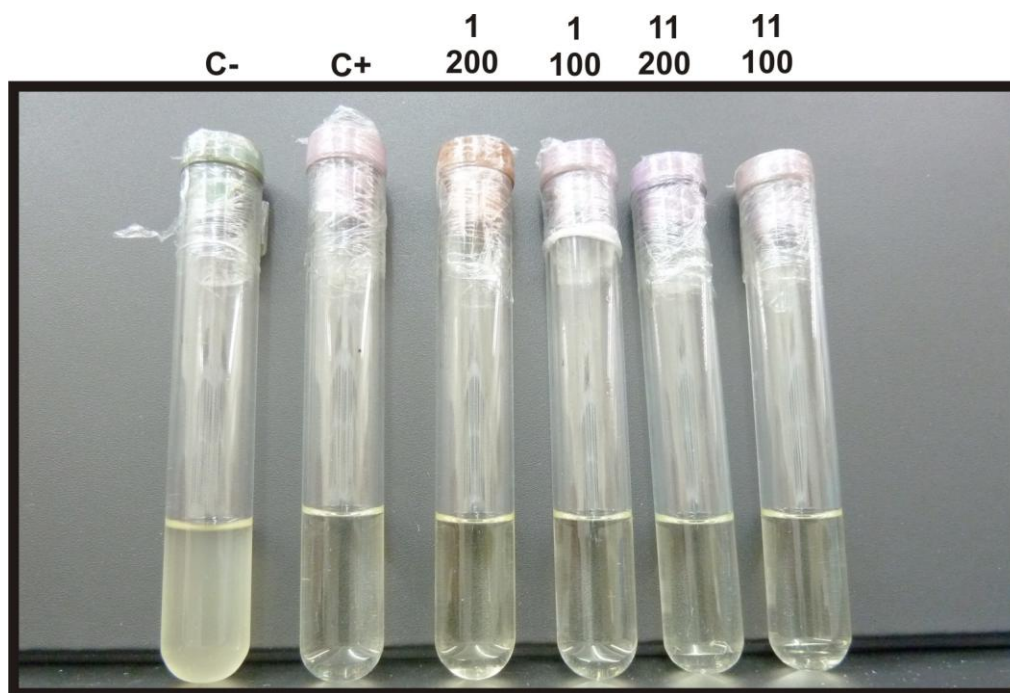


Fig.14: Atividade bactericida do extrato protéico bruto, diluição 1:200 (20µL do ensaio e 4mL de LB). C-: Controle negativo (*X.fragariae*); C+: Cloranfenicol 12,5 µg/ml; 1/200: Extrato bruto da planta 1 na concentração de 200 µg/ml; 1/100: Extrato bruto da planta 1 na concentração de 100 µg/ml; 11/200: Extrato bruto da planta 11 na concentração de 200 µg/ml; 1/100: Extrato bruto da planta 11 na concentração de 100 µg/ml

4.3 Expressão do peptídeo recombinante Pg-AMP₁

A fim de se confirmar a presença do peptídeo recombinante Pg-AMP₁ nos extratos brutos testados, realizou-se um teste de western blot (Figura 15). A planta um que apresentou maior resistência à bactéria foi usada na análise de western blot do peptídeo através da ligação do anticorpo à cauda de histidina. Conforme esperado nenhum blot foi visualizado no extrato da planta controle (não transformada).

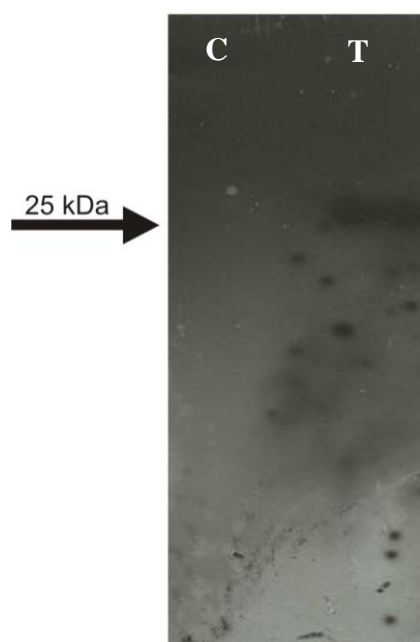


Fig.15: Western blot realizado a partir do extrato proteico bruto das folhas de tabaco PgAMP₁. C: planta não transformada; T – planta transformada com o peptídeo PgAMP₁.

5 DISCUSSÃO

Todos os organismos vivos, incluindo as plantas desenvolveram mecanismos induzíveis ou constitutivos para se protegerem da invasão microbiana. Nas plantas esses mecanismos incluem a produção de proteínas (proteínas antimicrobianas, AMPs), de metabólitos secundários tóxicos para os microrganismos (fenóis, terpenos e compostos contendo nitrogênio e enxofre), de espécies reativas de oxigênio (como peróxido de hidrogênio e ânions de superóxido), o estabelecimento de barreiras estruturais (taninos, celulose, polissacarídeos e colonização pelos microrganismos) e ou a resposta hipersensitiva, que resulta em morte celular programada das células infectadas da planta, isolando o patógeno invasor da fonte de nutrientes (MITTLER et al., 2004; MANNERS, 2007).

Nos últimos anos, AMPs tem sido objeto de interesse como principais candidatos à proteção das plantas (MONTESINOS, 2007; SARIKA, IQUEBAL e RAI, 2012). Um dos grupos de antimicrobianos que vem recebendo destaque é o das proteínas ricas em glicina. Tal grupo é caracterizado por possuir grandes quantidades e sequências repetitivas de resíduos de glicina baseado em motivos (Gly-X)_n (MOUSAVI & HOTTA, 2005). O Pg-AMP₁, primeiramente identificado em sementes de goiaba possui as características do grupo citado acima. Poucos trabalhos demonstram a atividade de proteínas ricas em glicina promovendo defesa em plantas. Naqvi et al. (1998), ao analisar plantas de tabaco infectadas com o vírus do mosaico do tabaco observou que os níveis de proteínas ricas em glicina aumentavam, indicando que a presença do patógeno é importante para o aumento da produção de proteínas desse grupo. Outras duas proteínas ricas em glicina extraídas das raízes de *Capsella bursa pastoris* (*Sheperin I e II*) apresentaram atividade contra várias bactérias Gram-negativas e contra vários fungos (PARK et al., 2000). Aliado a essas características, algumas proteínas ricas em glicina são capazes de se ligar à quitina, inibindo, assim, o crescimento de alguns fungos filamentosos, o que é observado em *Ginkgo biloba* e em *Avena sativa* (HUANG, XIE e GONG, 2000; LI e CLAESON, 2003).

No presente trabalho, o extrato bruto contendo o peptídeo Pg-AMP₁ foi testado em placas de 96 poços de polipropileno em diferentes concentrações contra o microrganismo fitopatogênico de morangueiros, *Xanthomonas fragariae* objetivando comprovar se a atividade antimicrobiana descrita por Pelegrini et al. (2008) foi preservada após a transformação genética das plantas de tabaco. Dois dos sete extratos testados (extrato da planta 1 e planta 11) foram eficazes em inibir o crescimento da bactéria testada nas concentrações de 200 e 100 µg/mL de extrato protéico bruto e de apresentar blots através da técnica de Western. Tais resultados estão de acordo com os encontrados anteriormente onde o Pg-AMP₁ mostra atividade contra bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (PELEGRINI et al., 2008), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 11229 e ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 35218 e contra linhagens Gram-positivas do gênero *Staphylococcus*, *S.*

aureus ATCC 2592-3 e ATCC 2921-3, *S. epidermidis* ATCC 1222-8 e *S. aureus* MEC-A ATCC 3359-1 causadoras de infecção hospitalar (TAVARES et al., 2012). Os resultados encontrados no presente trabalho eram esperados, uma vez que *Xanthomonas fragariae* é uma fitobactéria Gram-negativa.

No presente trabalho observou-se que o peptídeo Pg-AMP₁ apresentou atividade bactericida contra a bactéria fitopatogênica testada, enquanto que o trabalho de Tavares et al. (2012) mostrou apenas ação bacteriostática contra bactérias patogênicas humanas. Apesar do mecanismo de ação não estar bem estabelecido para todos os peptídeos antimicrobianos, o mecanismo de ação proposto para AMPs envolve o reconhecimento, a ligação e a permeabilização da membrana celular do patógeno, através da interação mediada por receptores da bicamada lipídica, promovendo a desorganização dos canais de íons dependentes de voltagem (MATZUSAKI, 1999; RADEK e GALLO, 2007). Alguns AMPs possuem hidrolases que degradam a parede celular, geram perturbações das funções da membrana e danos cruciais aos alvos intracelulares após internalização do peptídeo (ZASLOFF, 2002). Outras hipóteses adicionais têm sido propostas para explicar os mecanismos pelos quais peptídeos matam as células alvo. Algumas hipóteses incluem a ruptura da membrana, enquanto outros sugerem que os peptídeos de defesa atravessam a bicamada lipídica interagindo com alvos intracelulares como DNA e RNA, inibindo a síntese de ácidos nucleicos, proteínas ou atividade enzimática, presumivelmente interferindo nas funções metabólicas e, assim, conduzindo a célula à morte (BROGDEN, 2005; HALE e HANCOCK, 2007; CHO e KIM, 2010). Segundo Pelegrini et al. (2008), a forma provável de ação do PgAMP₁ se dá pela ligação do peptídeo à superfície da membrana celular do patógeno, levando à formação de poros.

Os extratos das plantas 2 e 4 através da análise por western blot foram capazes de desencadear a presença de blots. No entanto estes extratos não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano, o que leva a crer que a proteína possa não ter sido expressa em quantidades suficientes.

Utilizando SDS-PAGE e análise *in silico*, Tavares et al. (2012) determinaram que o Pg-AMP₁ recombinante possui massa molecular de 6,98

kDa e pI 8,01. Entretanto, a análise do western blot nos possibilitou a recuperação de bandas na altura de 24 kDa, o que pode indicar que nosso peptídeo tenha sofrido uma modificação pós traducional, se agrupando e originando um tetrâmero. Relatos anteriores demonstram a capacidade desse mesmo peptídeo em sofrer dimerização em presença de água devido à existência de alguns resíduos hidrofóbicos ao longo de sua estrutura (PELEGRINI et al., 2008; TAVARES et al., 2012). O peptídeo Pg-AMP₁ possui uma cauda de histidina acoplada, que possibilita a purificação do peptídeo expresso por uma coluna de cromatografia de afinidade, uma vez que a histidina possui afinidade pelo níquel da coluna. Além de facilitar a purificação da proteína, a cauda de histidina pode aumentar o rendimento através da prevenção de proteólise e aumentar a solubilidade. Entretanto a cauda de histidina pode atuar de maneira negativa, modificando a conformação protéica e alterando a atividade biológica (ARNAU et al., 2006). Tal fato também foi observado por Tavares et al. (2012), uma vez que a proteína, em sua forma nativa, não tem atividade contra as bactérias Gam-positivas e a proteína recombinante, com a cauda de histidina, é ativa contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*.

Os extratos das plantas 3 e 10 não foram capazes de demonstrar ação contra o microrganismo testado e não revelaram a presença da proteína através da técnica de Western blot, remetendo ao fato de que o gene foi inserido no genoma da planta mas não foi capaz de ser transcrito. Vários fatores podem estar relacionados à expressão variável ou pela não expressão do transgene, incluindo efeitos relacionados ao número de cópias e à integração aleatória do transgene em sítios não específicos no genoma da planta, além da tendência de o DNA exógeno sofrer rearranjo antes da integração e de efeitos de hipermetilação do DNA (KONEZ et al., 1989; REMY et al., 2005; GELVIN e KIM, 2007). O extrato da planta 8 será novamente analisado quanto a presença do peptídeo recombinante, uma vez que inibiu o crescimento da bactéria testada mas não apresentou banda na análise por western blot.

Existem relatos na literatura de peptídeos antimicrobianos atuando contra bactérias do gênero *Xanthomonas*. As defensinas cecropinas A e B expressas em plantas arroz conferiram resistência contra *Xanthomonas oryzae* (SHARMA et al., 2000). Análogos sintéticos de cecropinas como o Shiva-1, expresso em *Anthuriumwas*, foi efetivo contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *Dieffenbachia* (KUEHNLE et al ., 2004), D4E1, análogo de cecropina B, inibiu o crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (DELUCCA e WALSH, 1999). Melitina híbrida, um derivado de cecropina A, mostrou inibição ativa contra *Xanthomonas vesicatoria* (HONGBIAO et al., 2005). Entretanto, esta é a primeira vez que uma proteína rica em glicina é descrita na literatura apresentando propriedades antimicrobianas contra o gênero *Xanthomonas*.

Uma vez que a proteína antimicrobiana analisada foi inicialmente considerada uma proteína de armazenamento, outras proteínas vegetais já descritas na literatura também podem vir a ter ação de defesa como característica secundária, o que sugerir a necessidade de avaliação de outras proteínas vegetais a fim de se identificar novas proteínas com ação antimicrobiana.

6 CONCLUSÃO

O peptídeo PgAMP₁ expresso em folhas de fumo apresentou ação contra a bactéria *Xanthomonas fragarie*, apresentando, assim, potencial para ser utilizado como uma nova ferramenta biotecnológica contra fitopatógenos através da engenharia genética.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, A. M. 2004. Integrated Approaches for Detection of Plant Pathogenic Bacteria and Diagnosis of Bacterial Diseases. **Annual Review of Phytopathology**, **42**: 339–366.
- ARNAU, J.; LAURITZEN, C.; PETERSEN, G.E.; PEDERSEN, J. 2006. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. **Protein Expression and Purification**, **48**: 1–13.
- AUDY, P.; LAROCHE, A.; SAINDON, G.; HUANG, H. C.; GILBERTSON, R. L. 1994. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv.phaseoli and *X. c. phaseoli* var *fuscans*, using the polymerase chain-reaction. **Phytopathology**, **84**:1185–1192.
- BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. 1998. Manual de transformação genética de plantas. **Brasília: Embrapa**. 309 p.
- BROGDEN, K.A. 2005. Antimicrobial peptides pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, **3**: 238-250.
- CHO, J.H.; KIM, S.C. 2010. Non-membrane targets of antimicrobial peptides: novel therapeutic opportunities? In: Wang G (ed) Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies. **Oxfordshire, England**, pp 128–140.
- DELUCCA, A.J.; WALSH, T.J. 1999 Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **43** : 1–11.
- GELVIN, S.B.; KIM, S. 2007. Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration and transgene expression. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1769**: 410 – 421.
- HALE, J.D.; HANCOCK, R.E.W. 2007. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, **5**:951–959.

HONGBIAO, W.; BAOLONG, N.; MENGKUI, X.; LIHUA, H.; WEIFENG, S.; ZHIQI, M. 2005. Biological activities of cecropin B-thanatins hybrid peptides. **Journal of peptide research**, **66**: 382-6.

HUANG, X.; XIE, W.; GONG, Z. 2000. Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, **478**:123-126.

KELLER, B.; SAUER, N.; LAMB, C.J. 1988. Glycine-rich cell wall proteins in bean: gene structure and association of the protein with the vascular system. **European Molecular Biology Organization Journal**, **7**:3625–33.

KELLER, B.; TEMPLETON, M.D.; LAMB, C.J. 1989. Specific localization of a plant cell wall glycine-rich protein in protoxylem cells of the vascular system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **86**: 1529–33.

KONEZ, C.; MARTINI, N.; MAYERHOFER, R.; KONEZ, K.Z.; KORBER, H.; REDEI, G.P. 1989. High frequency T-DNA mediated gene tagging in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **86**: 8467–8471.

KOVALSKAYA, N.; ZHAO, Y.; HAMMOND, R.W. 2011. Antibacterial and Antifungal Activity of a Snakin-Defensin Hybrid Protein Expressed in Tobacco and Potato Plants. **The Open Plant Science Journal**, **5**: 29-42.

KUEHNLE, A.R.; FUJII, R.; CHEN, F.C.; ALVAREZ, A.; SUGII, N.; FUKUI, R.; ARAGON, S.L. 2004. Peptide biocides for engineering bacterial blight tolerance and susceptibility in cut flower *Anthurium*. **HortScience**, **39** : 1327–1331.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins using assembly of the head of the bacteriophage. **Nature**, **227**: 680–685.

LI, S.S.; CLAESON, P. 2003. Cys/Gly-rich proteins with a putative single chitin-binding domain from oat (*Avena sativa*) seeds. **Phytochemistry**, **63**:249–255.

MANGEON, A; JUNQUEIRA, R.M.; MARTINS, G.S. 2010. Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. **Plant Signaling & Behavior** **5**:2, 99-104.

MANNERS, J.M. 2007. Hidden weapons of microbial destruction in plant genomes. **Genome Biology**, **8**: 225.

MATSUZAKI, K. 1999. Why and how peptide-lipid interaction utilized for self defense? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, **1462**:. 1-10.

- MITTLER, R.; VANDERRAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. 2004. Reactive oxygen network of plants. **Trends in Plant Science**, **9**: 490-8.
- MONTESINOS E. 2007. Antimicrobial peptides and plant disease control. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, **270**: 1-11.
- MOUSAVI, A.; HOTTA, Y. 2005. Glycine-rich proteins: a class of novel proteins. **Applied Biochemistry Biotechnology**, **120**:169–74.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, **15**:473–497.
- NAQVI, S. M. S.; PARK, K.S.; YI, S.Y.; LEE, H.W.; BOK, S.H.; CHOI, D. 1998. A glycine-rich RNA-binding protein gene is differentially expressed during acute hypersensitive response following Tobacco Mosaic Virus infection in tobacco. **Plant Molecular Biology**, **37**: 571–576.
- NCCLS/ CSLI. 2003. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**. 6th ed, 23 (2). www.clsi.org
- PARK, C.J.; PARK, C.B.; HONG, S.S.; LEE, H.S.; LEE, S.Y.; KIM, S.C. 2000. Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa pastoris*. **Plant Molecular Biology**, **44**: 187–197.
- PELEGRINI, P.B.; MURAD, A.M.; SILVA, L.P.; SANTOS, R.C.P.; COSTA, F.T.; TAGLIARI, P.D.; BLOCH, C.J.; NORONHA, E.L.; MILLER, R.N.G.; FRANCO, O.L. 2008. Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against gram-negative bacteria. **Peptides**, **29**: 1271-1279.
- PELEGRINI, P.B.; SARTO, R.P.; SILVA, O.N.; FRANCO, O.L.; GROSSI-DE-SA, M.F. 2011. Antibacterial Peptides from Plants: What They Are and How They Probably Work. **Biochemistry Research International**, **2011**: 1-9.
- RADEK, K.; GALLO, R. 2007. Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system. **Seminary of Immunopathology**, **29**: 27–43.
- REMY, S.; THIRY, E.; COEMANS, B.; WINDELINCKX, S.; SWENNEN, R.; SÁGI, L. 2005. Improved T-DNA vector for tagging plant promoters via high-throughput luciferase screening. **Biotechniques**, **38**:763-770.
- RINGLI, C.; KELLER, B.; RYSER, U. 2001. Glycine-rich protein as structural components of plant cell walls. **Cellular and Molecular Life Sciences**; **58**:1430–41.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. 2001. **Molecular cloning. A Laboratory Manual**. New York. Cold Spring Harbor. (1, 2 e 3).

SARIKA; IQUEBAL, M.A.; RAI, A. 2012. Biotic stress resistance in agriculture through antimicrobial peptides. **Peptides**, **36**:322-330.

SHARMA, A.; SHARMA, R.; IMAMURA, M.; YAMAKAWA, M.; MACHII, H. 2000 Transgenic expression of cecropin B, an antibacterial peptide from *Bombyx mori*, confers enhanced resistance to bacterial leaf blight in rice. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, **484**: 7–11.

STÖGER, A., BARIONOV, D., CALZOLARI, A., GOZZI, R., RUPPITSCH, W., SCORTICHIN, M. 2008. Genetic Variability of *Xanthomonas Fragariae* strains Obtained from Field Outbreaks and Culture Collections as Revealed by Repetitive-Sequence Pcr And Aflp. **Journal of Plant Pathology**, **90**: 469-473.

STÖGER, A., RUPPITSCH, W. 2004. A rapid and sensitive method for the detection of *Xanthomonas fragariae*, causal agent of angular leaf spot disease in strawberry plants. **Journal of Microbiological Methods**, **58**: 281-284.

TAVARES, L.S. 2009 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO Pg-AMP1 RECOMBINANTE, UM PEPTÍDEO RICO EM GLICINA, ISOLADO DE GOIABA (*Psidium guajava* L.) **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, 82p.

TAVARES, L.S.; RETTORE, V.J.; FREITAS, R.M.; PORTO, W.F.; DUQUE, A.P.N.; SINGULANI, J.L.; SILVA, O.N.; DETONI, M.L.; VASCONCELOS, E.G.; DIAS, S.C.; FRANCO, O.L.; SANTOS, M.O. 2012. Antimicrobial Activity of Recombinant Pg-Amp₁, a Glycine-Rich Peptide from Guava Seeds. **Peptides**, (in press: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.017>)

YE, X.Y.; NG, T.B. 2000. Mungin, a novel cyclophilin-like antifungal protein from the mungbean. **Biochemistry Biophysics Research Communication**, **273**: 1111–1115.

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

Capítulo 3

Efeitos do Nitrato de Amônio Sobre a Brotação e Desenvolvimento *in vitro* do Morangueiro *Fragaria x ananassa*

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é considerado um dos mais importantes fatores, limitantes ao bom crescimento e desenvolvimento das plantas. De acordo com Tapia e Gutierrez (1997), o suprimento adequado de nitrogênio é fundamental para que ocorra uma boa formação das estruturas vegetativas, o florescimento e o crescimento dos frutos. Adicionalmente, o N é o principal constituinte dos aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, moléculas essenciais para as plantas.

Estudos mostram que a resposta das plantas, tanto ao NO_3^- quanto ao NH_4^+ , varia de acordo com a espécie, temperatura do meio, intensidade luminosa, concentração de nitrogênio, pH do meio e suprimento de K^+ (EDWARDS e HORTON, 1982; MAGALHAES e WILCOX, 1983; ZHU et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2008; SOUZA et al., 2010). Especialmente em morangueiros, foi observado que as características vegetativas são negativamente afetadas por altas taxas de NH_4NO_3 em solução nutritiva, e que tanto na presença de altas concentrações de NO_3^- quanto de NH_4^+ hoá um efeito inibitório no crescimento das plantas, o que se torna mais pronunciado em ambientes sombreados. Todavia quando cultivadas em taxas balanceadas de NH_4NO_3 (25:75 ou 50:50), foi demonstrado que as plantas apresentam um melhor crescimento (TABATABAEI et al., 2008).

Apesar de bem estabelecida, a toxicidade gerada pelos íons amônio é pouco compreendida, sendo geralmente considerada resultado de um ou mais dos seguintes efeitos: (i) deficiência de nutrientes minerais induzida pelo amônio, decorrentes da reduzida absorção de íons metálicos, (ii) inibição do crescimento secundário decorrente da acidificação da rizosfera, (iii) alterações no pH intracelular e no equilíbrio osmótico, (iv) desacoplamento entre fotofosforilação oxidativa e o transporte de elétrons, seguido do acúmulo de amônio nas folhas, (v) além do metabolismo de poliamina e de fitormônios serem alterados (CRAMER e LEWIS, 1993; CLAUSSEN e LENZ, 1995; LAM et al., 1996; GERENDAS et al., 1997).

O morango é produzido e consumido nas mais variadas regiões do mundo, sendo a espécie do grupo dos pequenos frutos de maior apreciação e grande retorno econômico. A planta é propagada vegetativamente através de estolhos e também por micropropagação, técnica que apresenta diversas vantagens, como produção de mudas em larga escala e curto espaço de tempo, além da possibilidade de eliminação de fitopatógenos causadores de doenças.

Um dos principais problemas na cultura do morangueiro é a incidência de doenças, que podem aparecer em várias fases do ciclo da cultura, atacando desde a muda recém plantada até os frutos na fase final de produção. Devido à susceptibilidade a doenças e pragas, o uso de pesticidas é usual no cultivo de morangos. No entanto, a aplicação de pesticidas não somente aumenta significativamente os custos de produção trazendo sérios riscos ambientais, mas, também, contribui para o aumento do número de espécies resistentes a antimicrobianos (HOFFMANN et al., 2006).

Uma alternativa para contornar esse problema é produzir morangueiros geneticamente modificados resistentes a essas doenças. No entanto, dois fatores que influenciam na produção de tais plantas é a integração do transgene de interesse no genoma das plantas e a capacidade de regeneração das mesmas (LANDI e MEZZETTI, 2006; HUSAINI e ABDIN, 2007; QUIN et al., 2008). Apesar dos suficientes níveis de regeneração atingidos a partir de explantes foliares de alguns morangueiros comerciais, a regeneração das

plantas transformadas de morangueiro ainda é difícil e parece ser fortemente dependente do genótipo (LANDI e MEZZETTI, 2006).

A aplicação de nitrogênio nas plantações de morangueiro é complicada devido às suas raízes serem superficiais, necessitando de irrigações regulares, levando grande parte do nitrogênio presente no solo à lixiviação. Para se entender melhor os efeitos do nitrogênio no morangueiro, mais estudos precisam ser realizados em soluções nutritivas (DARNEL e STUTTE, 2001).

Apesar do morango cultivado (*Fragaria x ananassa* Dover.) ser uma das culturas mais valiosas para os produtores da região da Mantiqueira em Minas Gerais, ele tem sido pouco utilizado na pesquisa biotecnológica. *Fragaria x ananassa* Dover é uma cultivar octaploide ($2n=8x=86$) e devido a essa genética complicada, apresenta uma grande barreira para o desenvolvimento eficiente de marcadores genéticos e ferramentas genômicas funcionais e estruturais (FOLTA, DHINGRA e STEWART, 2006).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos das concentrações de nitrato de amônio na produção e desenvolvimento de brotos geneticamente transformados de *Fragaria x ananassa* (cultivar Dover).

2 OBJETIVOS

Avaliar se os efeitos do nitrato de amônio interferem na brotação *in vitro* e conseqüentemente, sobre o desenvolvimento de plantas de morangueiro, cultivar DOVER.

2.1 Objetivos específicos

- 1- Avaliar os efeitos do NH_4NO_3 sobre o crescimento dos explantes foliares;
- 2- Avaliar os efeitos do NH_4NO_3 e da radiação luminosa sobre a multiplicação dos explantes foliares;
- 3- Analisar a ocorrência de variações anatômicas em resposta às diferentes concentrações de nitrato de amônio;
- 4- Analisar a ocorrência de variação do ciclo celular das plantas por citometria de fluxo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Plantas utilizadas no experimento

No presente trabalho, folhas não expandidas de *Fragaria x ananassa*, cultivar Dover, mantidas em casa de vegetação da Universidade Federal de Juiz de Fora, foram usadas como fonte de explantes. As folhas foram esterilizadas com água e detergente tween 20 por 2 minutos, álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 15% por 10 minutos. Posteriormente, foram lavadas em água destilada autoclavada por 5 vezes e secas em papel filtro. Os lobos foliares foram separados e colocados em meio de regeneração: MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 7g/L de agar, 30g/L de glicose, 0,2mg/L de AIB (Sigma®), 1mg/L de TDZ(Sigma®) e 200mg/L de timentim (Sigma®) em pH 5,8, a fim de fazer um pré-cultivo. As folhas foram mantidas nesse meio no escuro por uma semana. Aquelas folhas que não apresentaram contaminação foram transferidas para meio de cultura com os mesmos componentes da etapa de pré cultivo, porém, suplementado com diferentes concentrações de nitrato de amônio (tabela 1) e incubadas em fotoperíodo de 16/8h (luz/escuro).

Tabela 1: Diferentes concentrações de nitrato de amônio para 1 litro de meio de cultura. 1X: controle, quantidade de 20,6 mM, padrão do meio MS Murashige e Skoog (1962).

Tratamentos administrados no experimento	Concentração de NH_4NO_3 em mM	Concentração de NH_4NO_3 em g
1X	20,6 mM	0,5 g
2X	41,2 mM	1g
3X	61,8 mM	1,5g
4X	82,4 mM	2g
5X	103 mM	2,5g

3.2 Avaliação dos efeitos do NH_4NO_3 no crescimento dos explantes

foliares

As folhas foram medidas com o auxílio de um paquímetro com o objetivo de avaliar a expansão das mesmas, em resposta às diferentes concentrações de nitrato de amônio. O experimento foi realizado em triplicata contendo 3 folhas por placa e repetido seis vezes. As folhas foram medidas no dia em que foram transferidas para o meio com nitrato e após 15 dias. O comprimento médio de cada placa e de cada repetição foi obtido, sendo a última utilizada para as análises estatísticas.

3.3 Avaliação dos efeitos do NH_4NO_3 e da radiação luminosa sobre a multiplicação dos explantes foliares

A unidade experimental foi composta por uma placa de petri com nove explantes. O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados no tempo, sendo as repetições escolhidas por meio de sorteio, com 4 repetições por tratamento, em um arranjo fatorial 3 x 5 (3 intensidades luminosas – baixa ($30 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), m\u00e9dia ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e alta ($110 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) x 5 concentra\u00e7\u00f5es de NH_4NO_3 . Foram utilizadas lâmpadas fluorescentes, variando o n\u00famero das mesmas e mantendo a mesma dist\u00e2ncia das lâmpadas para as preteleiras. Os resultados foram submetidos \u00e0 an\u00e1lise de vari\u00e2ncia e as m\u00e9dias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.4 An\u00e1lises anat\u00f4micas

Ap\u00f3s 15 dias, folhas tratadas com diferentes concentra\u00e7\u00f5es de NH_4NO_3 foram fixadas em formalina: (\u00e1cido ac\u00e9tico: etanol 70% FAA, 18:01:01) e armazenadas em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). Os estudos foliares foram baseados em cortes transversais do limbo foliar realizados a m\u00e3o livre. Essas sec\u00e7\u00f5es foram clarificadas em solu\u00e7\u00e3o de 50% de hipoclorito de s\u00f3dio comercial, e coradas com azul de astra (LUQUE, SOUSA e KRAUS, 1996).

Medidas do comprimento par\u00eanquima pali\u00e7\u00e1dico e esponjoso foram obtidas para cada tratamento utilizando lâmina de escala microm\u00e9trica. Para cada tratamento foram utilizadas tr\u00eas folhas e 10 sec\u00e7\u00f5es de cada folha. As observa\u00e7\u00f5es foram capturados em um microsc\u00f3pio de luz Olympus \u2122 BX41 usando uma c\u00e2mera CCD de cor CoolSNAP-Pro (MEDIA CYBERNETCS\u2122).

3.5 An\u00e1lise do ciclo celular por citometria de fluxo

Após permanecerem por 15 dias nos diferentes tratamentos com nitrato de amônio, as folhas foram submetidas à citometria de fluxo com o objetivo de determinar parâmetros de ciclo celular. O tecido foliar (entre 20 a 30mg) foi macerado em placa de Petri contendo 1mL do tampão de lise celular LB01 (DOLEZEL, BINAROVA e LUCRETTI, 1989) para obtenção da suspensão nuclear. A suspensão foi aspirada através de duas camadas de gaze com o auxílio de uma pipeta plástica e filtrada em uma malha de 50µm, sendo coletada em um tubo de poliestireno. À suspensão nuclear foram adicionados 50µl de iodeto de propídio (1mg/ml) e 5µL de RNase (1mg/mL), seguido, então, da leitura em citômetro de fluxo FacsCalibur (BD). Nos histogramas obtidos foram analisados os percentuais de núcleos em G1, S e G2 e de subpartículas-G1, além da intensidade de fluorescência dos núcleos G1, FSC e SSC.

4 RESULTADOS

4.1 Expansão foliar

O tratamento utilizando a concentração de 2x de NH_4NO_3 promoveu uma maior expansão das folhas, seguido do tratamento de 1x (Figura 16). As folhas que permaneceram por 2 semanas nos tratamentos contendo 4x e 5x de NH_4NO_3 apresentaram um maior espessamento, ficando mais translúcidas e com aparência hiperídrica, com sintomas de amolecimento.

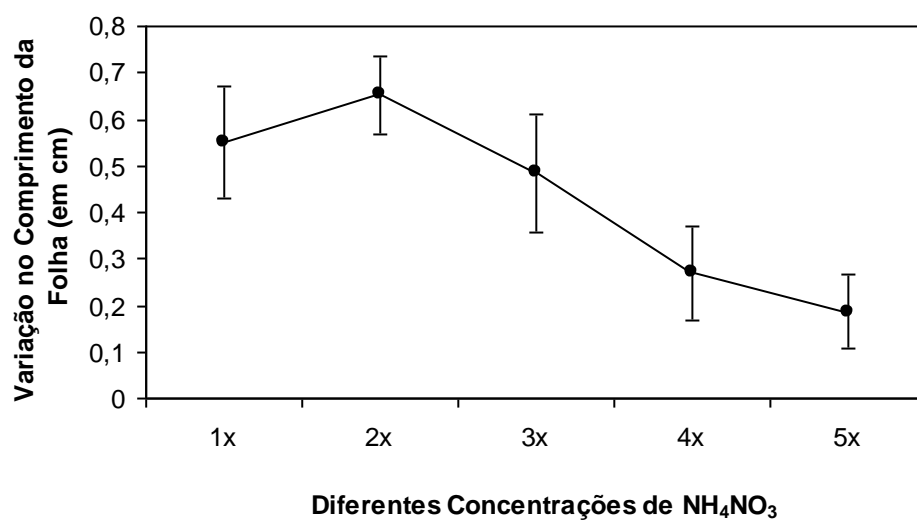


Figura 16: Comprimento médio das folhas de morangueiro (em cm) após 15 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de NH_4NO_3 . Barras: erro padrão da média.

4.2 Efeitos do NH_4NO_3 e da luz sobre a multiplicação *in vitro*

No que se refere à brotação dos explantes, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de NH_4NO_3 . Todavia, em relação à intensidade luminosa, foi observado que baixas intensidades comprometeram a multiplicação *in vitro* das plantas, reduzindo, significativamente, a quantidade de brotos formados (Figura 17).

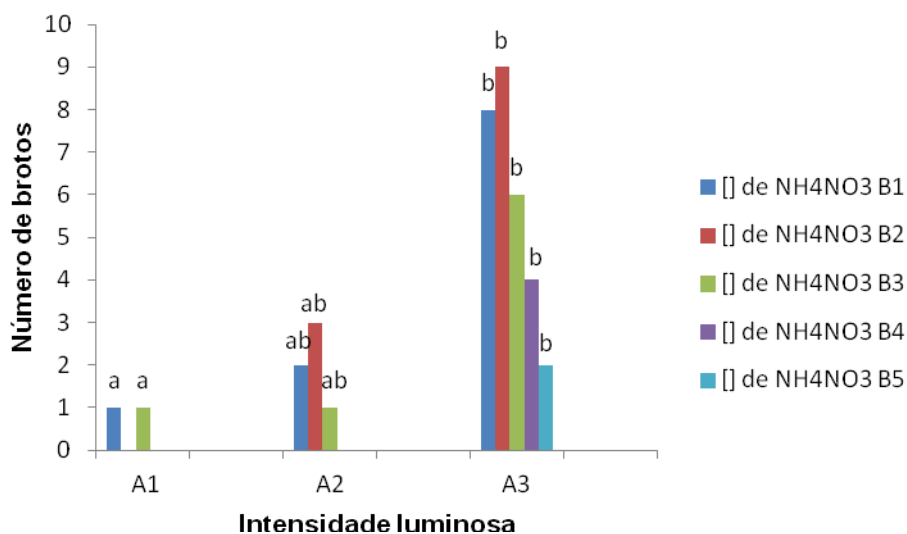


Figura 17: Número de brotos formados em resposta a diferentes concentrações de NH_4NO_3 e sob diferentes intensidades luminosas (lâmpadas fluorescentes). A1: $30 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; A2: $60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; A3: $110 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. B1: 20,6 mM de NH_4NO_3 ; B2: 41,2 mM de NH_4NO_3 ; B3: 62,8 mM de NH_4NO_3 ; B4: 82,4 mM de NH_4NO_3 ; B5: 103 mM de NH_4NO_3 . Barras com letras diferentes, para cada intensidade luminosa, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3 Avaliação da anatomia foliares

Foram observadas diferenças anatômicas em resposta às concentrações de nitrato de amônio (Figura 18).

As camadas dos parênquimas paliçádico e lacunoso sofreram aumentos significativos de espessura. Em alguns cortes dos tratamentos com 3x e 5x de NH_4NO_3 o parênquima paliçádico apresentou 2 a 3 camadas, enquanto que, no parênquima lacunoso, as células tiveram um aumento no tamanho com espaçamentos entre as mesmas. Tais folhas também apresentaram acúmulo de oxalato de cálcio (Figura 19).

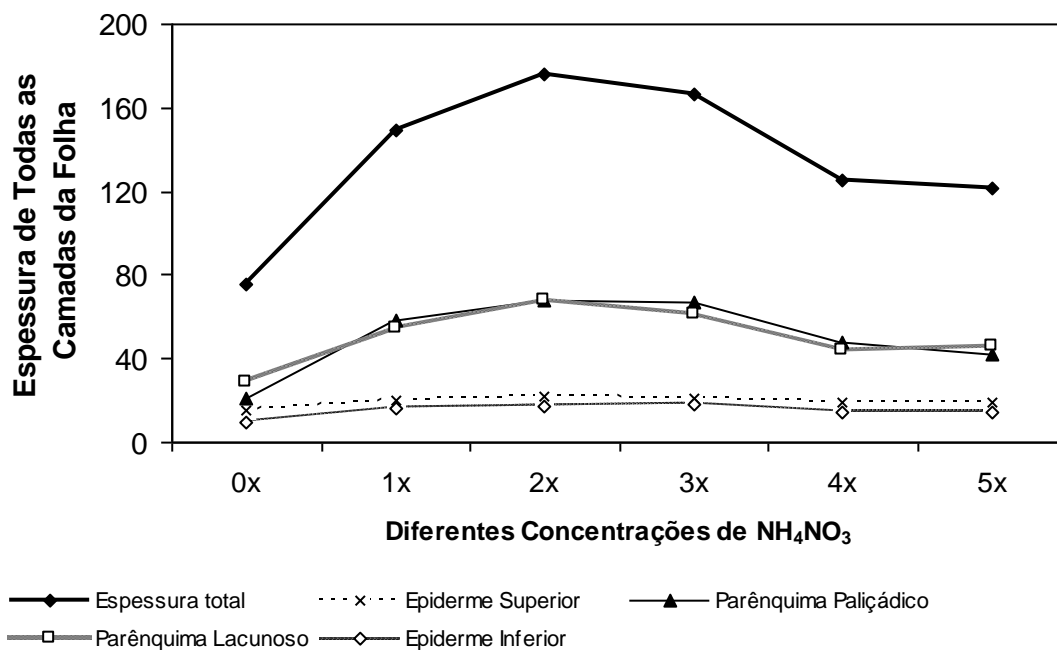


Figura 18: Espessura média do limbo foliar das camadas das folhas de morangueiro (em μm) 15 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de NH_4NO_3 .

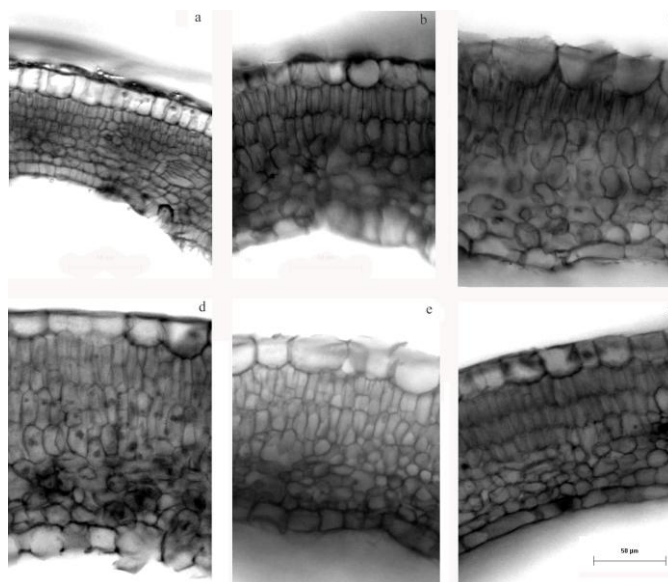


Figura 19: Secção transversal de lâmina foliar de morangueiro *cv* Dover, cultivada *in vitro*, em diferentes concentrações de NH_4NO_3 . a: folha sem tratamento (material de campo); b: 20,6 mM; c: 41,2 mM; d: 61,8 mM; e: 82,4 mM; f: 103 mM (Aumento: 20 X).

4.4 Citometria de fluxo

Os resultados da análise de citometria de fluxo são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros do ciclo celular, intensidade de fluorescência e FSC analisados por citometria de fluxo a partir de folhas de morangueiro após 15 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de NH_4NO_3 . Resultados com * não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamento	Sub-G1	G1	G1 Fluorescence intensity	G1 FSC	S+G2
1x	7,84 ±1,45	65,43±3,24	100	100	26,73±1,23
2x	6,69±2,34	58,75±7,89*	99,87	102,34	34,56±3,56*
3x	17,53±9,34*	53,26±8,32*	87,34*	92,34*	29,21±4,67*
4x	37,66±9,23*	50,23±4,32*	80,34*	90,23*	12,11±2,45*
5x	62,23±10,11*	34,56±6,78*	78,35*	89,75*	3,21±0,45*

É possível observar pela tabela 2 que os tratamentos com as concentrações 2x e 3x de NH_4NO_3 induziram aumentos no percentual de células em divisão (Tukey, $p < 0,05$), embora o tratamento com 3x de NH_4NO_3 também tenha induzido aumentos significativos no percentual de partículas Sub-G1, um indicativo de provável indução de morte celular. As evidências de morte celular, também são suportadas pelas reduções nas intensidades de fluorescência e FSC dos núcleos em G1 obtidos após exposição ao tratamento 3x (Tukey, $p < 0,05$). Os mesmos resultados foram encontrados para os tratamentos 4x e 5x, corroborando a possibilidade de indução de morte celular em concentrações mais elevadas de NH_4NO_3 . Adicionalmente, reduções nos percentuais de células em divisão, como consequência da indução de morte celular, também foram observadas para esses tratamentos (4x e 5x) (Tukey, $p < 0,05$). Histogramas representativos das análises são mostrados na Figura 20.

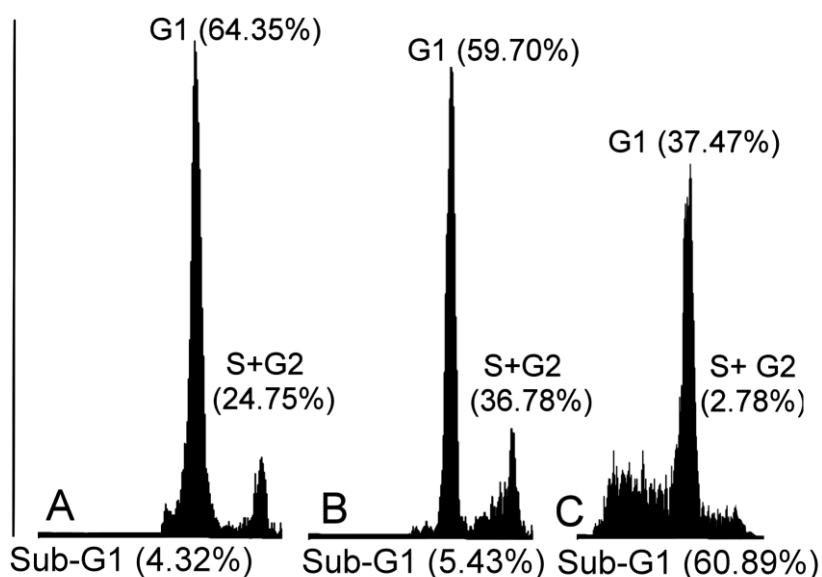


Figura 20: Histogramas representativos das análises de citometria de fluxo. (A) Tratamento 1x; (B) Tratamento 2x (note o aumento dos percentuais de células em S e G2, indicativo de aumento da taxa de divisão celular); (C) Tratamento 5x (note a redução dos percentuais de células em divisão e aumento do percentual de partículas sub-G1, indicativo de morte celular).

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram que as diferentes concentrações de NH_4NO_3 afetaram algumas características vegetativas nas plantas de morango. Os efeitos negativos da aplicação de concentrações elevadas de NH_4NO_3 podem ser devido ao acúmulo de íons NO_3^- e NH_4^+ .

Os resultados obtidos indicam que as plantas que permaneceram no tratamento com 2x de NH_4NO_3 mostraram-se mais saudáveis e apresentaram maior alongamento quando comparadas com as plantas dos demais tratamentos.

As folhas que permaneceram nos tratamentos de 4x e 5x de nitrato de amônio tiveram o crescimento inibido, apresentando espessamento foliar,

hiperidricidade e coloração verde pálida, sugerindo uma reduzida quantidade de clorofila. O menor crescimento das folhas pode ser associado à ação negativa do íon NH_4^+ sobre a condutância estomática das plantas, como foi observado em estudos com mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) (CRUZ, PELACANI e ARAÚJO, 2008). Um dos fatores que interferem no crescimento das plantas é a condutância estomática que pode ser diretamente afetada pela abertura e fechamento dos estômatos das plantas cultivadas em níveis elevados de NH_4NO_3 , interferindo na transpiração e fotossíntese e, assim, comprometendo o crescimento das plantas. Tabatabaei et al. (2008), demonstraram que a redução da taxa fotossintética em plantas de morango é devida ao aumento da concentração de NH_4NO_3 . Resultados semelhantes foram obtidos por Ivanova e Staden (2007) com brotos de *Aloe polyphylla* cultivados em concentrações elevadas de NH_4NO_3 onde os brotos obtidos apresentaram-se frágeis, atrofiados e com coloração verde pálida.

Apesar da redução da fotossíntese em níveis elevados de NH_4^+ ser bem conhecida, a explicação para a redução da taxa fotossintética em resposta a concentrações elevadas de NO_3^- ainda não é conhecida. Segundo Andreeva, Maevskaia e Voevudskaya (1998), o aumento da concentração de NO_3^- no meio levou a supressão da fotossíntese em plantas de mostarda (*Sinapsis alba*), reduzindo o acúmulo de amido e a produtividade das plantas, modificando a forma de assimilação de nitrogênio pelas folhas.

Barreiro et al. (2006) relata que acréscimos na área foliar indicam aumentos na espessura das folhas resultante do aumento do tamanho e do número de células. O que é corroborado pelos dados obtidos pela citometria de fluxo.

A hiperidricidade observada nas plantas *in vitro* pode ser resultante da modificação no funcionamento dos estômatos. O NH_4^+ reduz a concentração foliar de diversos nutrientes essenciais, inclusive o potássio (LASA et al., 2000; BRITTO e KRONZUCKER, 2002), o qual é importante para o funcionamento normal dos estômatos (TAIZ e ZEIGER, 2002). Adicionalmente, a elevação dos níveis de ácido abscísico, como consequência da fertilização amoniacal, também pode ter concorrido para o mau funcionamento estomático (PEUKE,

JESCHKE e HARTUNG, 1998). Como consequência do fechamento estomático, as plantas cultivadas com concentrações elevadas de NH_4^+ apresentam significativa redução da transpiração.

A aparência clara das folhas possivelmente é resultante da sua senescência precoce, que pode ter sido causada pela acidificação do meio de cultura, prejudicando ou, até mesmo, impedindo a absorção de nutrientes. Raab e Terry (1994), observaram que a acidificação do meio de cultura, provocada pela liberação de H^+ inibe a absorção de nutrientes, inclusive nitrogênio, nutriente que está presente na molécula de clorofila. Tal fato também foi observado em plantas de tabaco (BOYKO, MATSUOKA e KOVALCHUK, 2009) e em plantas de girassol (SILVA, COUTO e SANTOS, 2010).

Apesar dos efeitos tóxicos causados pelas formas de nitrogênio administradas em altas quantidades, alguns trabalhos demonstram efeitos benéficos do NO_3^- e do NH_4^+ quando aplicados em conjunto em uma concentração adequada no crescimento de diferentes plantas, inclusive de morango (CRUZ, PELACANI e ARAÚJO, 2006; TABATABAEI et al., 2006; TABATABAEI et al., 2008; SOUZA et al., 2010). Esses resultados foram corroborados no presente trabalho, onde a administração conjunta e balanceada das duas formas de nitrogênio através de NH_4NO_3 não provocou diferenças estatísticas na multiplicação *in vitro* das plantas de morangueiro, mesmo sob diferentes concentrações de NH_4NO_3 .

Na cultura de tecidos, o fotoperíodo, a qualidade e a intensidade de radiação luminosa, ou seja, períodos de claro e escuro, comprimento de onda específico (luz vermelha 650–665 nm, azul 450–470 nm e vermelho-distante 700-730) e a densidade de fluxo de fótons influenciam o crescimento e a morfogênese das plantas cultivadas *in vitro* (LIAN et al., 2002). A intensidade luminosa também regula o tamanho das folhas e caules e sua via morfogênica e está envolvida na formação de pigmentos e na hiperdricidade (DEBERGH et al., 1992).

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a necessidade de maior ou menor intensidade luminosa pode variar de acordo com a espécie em estudo,

sendo as diferenças encontradas fortemente influenciadas pelo genótipo. Li et al. (2012), observaram que, mesmo sob fluxo luminoso de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, plantas de *Brassica campestris* L. não alcançaram um bom rendimento de massa fresca e seca nos brotos e massa fresca e seca nas raízes. Cassana (2007), trabalhando com plantas de batata doce observou que houve uma maior capacidade de expansão foliar com o aumento da concentração de sacarose, principalmente em irradiância de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em contrapartida Zanandrea (2006), demonstrou que o número de folhas por brotação de macieira foi estatisticamente superior aos demais no tratamento com $14 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ocorrendo uma redução significativa com $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, independente do meio de cultura utilizado.

Costa (2012), em experimentos realizados *ex vitro* com o morangueiro *Fragaria x ananassa* Duch cv. Albion constatou que à medida que a radiação luminosa aumentou houve incremento na fotossíntese nos três horários de avaliação, constatando, também, que acima de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, houve certa estabilização da atividade fotossintética. De acordo com Morgan (2006), plantas de morangueiro apresentam nível de saturação de luz entre 800 a $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fluxo de fótons, em ambiente com temperatura em torno de 25°C .

Wu et al. (2009) demonstraram que lâmpadas fluorescentes com alta intensidade luminosa ($110\text{-}122 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) não somente aumentaram o crescimento das plantas de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch. cv. Toyonoka), mas, também, promoveram o aumento dos estolões e o crescimento dos clones. Além disso, as plantas cultivadas sob alta intensidade luminosa, apresentaram maior peso seco, maior conteúdo de carboidratos solúveis e dos níveis de amido. Plantas de morangueiro requerem uma grande quantidade de carboidratos, não somente para o crescimento vegetativo, mas, também, para o crescimento reprodutivo. Nhut et al. (2003), relataram que plantas de morangueiro cv. Akihime cultivadas sob intensidade luminosa de $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram um maior número de folhas e estas tornaram-se mais largas. Além disso, tais plantas apresentaram um maior comprimento do que aquelas que permaneceram sob intensidade luminosa de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Segundo Kozai et al. (1991), brotos ou plantas de morangueiro cultivadas sob condições fotoautórficas, ou seja, sob altas densidade de fluxo luminoso, além de serem mais vigorosas, são mais facilmente aclimatizadas, visto que estarão menos sujeitas a alterações no ambiente físico, fisiológico e nutricional, quando da transferência das condições *in vitro* para *ex vitro*.

No que se refere às diferentes intensidades luminosas, observou-se claramente, no presente trabalho, a exigência das plantas de morangueiro por intensidades luminosas mais elevadas na fase de brotação, na faixa de $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo que os explantes que permaneceram em intensidade luminosa menores não brotaram e necrosaram rapidamente com o provavelmente resultado da baixa quantidade e qualidade da radiação luminosa administrada, aliado ao estresse oxidativo causado pelo aumento do conteúdo de etileno no meio e à baixa quantidade de clorofila nas folhas. Estudos têm mostrado que as lâmpadas fluorescentes brancas, utilizadas para a cultura de tecidos, emitem radiação deficiente nas faixas do vermelho e do azul (SEABROOK, 1987; WILSON et al. 1993). Sabe-se que a radiação vermelha é importante para o alongamento dos brotos/pecíolos, para as respostas do fitocromo e para as alterações na anatomia das folhas (SCHUERGER et al., 1997). Em contraste, a luz azul é importante na biossíntese das clorofilas, na abertura estomática, na síntese de enzimas, na maturação dos cloroplastos e na fotossíntese (TIBBITTS, MORGAN e WARRINGTON, 1983). Assim, em alguns casos o uso generalizado de lâmpadas fluorescentes brancas em salas de crescimento de laboratórios de cultura de tecidos deve ser avaliado.

Dessa forma, estudos sobre a qualidade da radiação luminosa fornecida pelos diodos emissores de luz (LEDs) têm sido realizados buscando-se o refinamento das técnicas de micropropagação e das condições de cultivo utilizadas na obtenção de mudas de melhor qualidade e em valores mais competitivos. Além da iluminação das salas de crescimento dos laboratórios de cultura de tecidos por LEDs proporcionar maior desenvolvimento dos explantes, estas são particularmente vantajosas pela maior vida útil, que pode chegar a 100.000 horas de uso, enquanto que as lâmpadas fluorescentes

apresentam vida útil média de 8.000 horas. Isso se deve ao fato de que LEDs não contêm eletrodos e, portanto, não queimam como lâmpadas incandescentes ou fluorescentes que precisam ser substituídas periodicamente (YEH e CHUNG, 2009). Em acréscimo, os LEDs são isentos de substâncias tóxicas, como o mercúrio, e apresentam elevada eficiência na conversão de luz (STEELE, 2007). Os LEDs também permitem o controle da composição espectral e do ajustamento da intensidade da luz para simular as mudanças de intensidade de luz solar durante o dia, tendo a capacidade para produzir níveis elevados de radiação com menor emissão de calor radiante. Normalmente, esses fatores compensam o maior custo de instalação de uma sala de crescimento com LEDs do que com lâmpadas fluorescentes (YEH e CHUNG, 2009). Com o avanço tecnológico, os LEDs tornar-se-ão uma fonte de luz proeminente para sistemas de cultura de plantas e pesquisas fotobiológicas.

Quanto às características anatômicas, segundo Metcalfe e Chalk (1950) as plantas de morangueiro podem apresentar de uma a três camadas de parênquima paliçádico. No presente trabalho, todos os cortes que não passaram por tratamentos com NH_4NO_3 (grupo controle) apresentaram somente uma camada de parênquima paliçádico. Entretanto, os cortes que passaram pelos tratamentos de 3x, 4x e 5x apresentaram parênquima paliçádico com duas a três camadas. Possivelmente, o aumento no número de camadas pode ser uma forma de defesa das plantas em resposta ao estresse causado pelo excesso de NH_4NO_3 . Em relação ao parênquima lacunoso, Braga et al. (2009) relataram que os espaços intracelulares observados são característicos de folhas de morangueiro cultivadas *in vitro*, porém o aumento no tamanho das mesmas não é bem descrito.

Como ressaltado anteriormente, as folhas cultivadas *in vitro* com altas concentrações de NH_4NO_3 apresentaram acúmulo de oxalato de cálcio, provavelmente causado pelo estresse devido ao excesso desse sal. Esse acúmulo também foi observado por Goncharova e Dobrenkova (1981) em morangueiros, sob estresse salino e hídrico, e por Lisek, Habdas e Gawrohski (2002) também em morangueiros, sob estresse causado pela aplicação de altas concentrações de herbicidas. Outro fator importante observado por

Sanchez et al. (2000) foi que a aplicação de altas taxas de NH_4NO_3 em feijão verde resultou no acúmulo de H_2O_2 , que aparentemente reduziu a produção da biomassa. Os explantes nos tratamentos com 4x e 5x de nitrato de amônio mostraram-se oxidados, amolecidos e necrosados.

Os resultados encontrados neste trabalho nas análises de citometria de fluxo poderiam indicar a ocorrência de morte celular nas concentrações mais elevadas de NH_4NO_3 . A estimativa da quantidade de DNA com o uso de corantes como o iodeto de propídeo, permitem a detecção de alguns parâmetros de morte celular. A condensação do DNA nuclear tem sido apontada como uma das etapas iniciais do processo de apoptose, e essa condensação, geralmente, dificulta o acesso do iodeto ao DNA, o que pode ser identificado como uma redução na intensidade de fluorescência, sendo detectado como um deslocamento, para a esquerda, do pico G1 na análise de um histograma por citometria de fluxo (O'BRIEN et al., 1998). Essa redução foi observada para os tratamentos 3x, 4x e 5x. Adicionalmente, a clivagem do DNA por endonucleases também tem sido apontada como um evento posterior à condensação do DNA no processo de apoptose. Como consequência, as células em apoptose em estágios precoces perdem fragmentos de DNA, e a análise desses núcleos por citometria evidencia uma subpopulação de células, designadas sub-G1, com intensidade de fluorescência para DNA reduzida (ORMEROD et al., 1995). Aumentos significativos para essas partículas sub-G1 foram evidenciados nos tratamentos 3x, 4x e 5x.

A transformação de plantas possui alguns fatores limitantes, inclui a integração do transgene e o estabelecimento de um protocolo de regeneração eficiente, que proporcione os meios para a seleção e recuperação de plantas geneticamente modificadas (JAMES, PASSEY e RUGINI, 1988; PASSEY, BARRETT e JAMES, 2003). A integração do transgene depende, principalmente, da integração correta do mesmo no genoma do hospedeiro. Já a regeneração da planta depende da totipotência, da habilidade da célula em se diferenciar e se dividir, dando origem a uma nova plântula (CITOVSKY et al. 2007). Um dos fatores que pode melhorar a transformação gênica refere-se às condições adequadas de pré-cultivo das folhas antes da infecção com

Agrobacterium tumefaciens. O pré-cultivo cria condições para aumentar o número de células competes em divisão para a regeneração e integração do transgene (BIRCH, 1997). Husaini e Adbin (2010), fizeram um pré-cultivo de 7 dias e observaram que a média de transformação dos explantes foliares foi duas vezes maior do que a dos explantes que não passaram pelo pré-cultivo. As folhas apresentaram uma maior proporção de eventos de recombinação, o que pode ser devido ao fato de as mesmas possuírem um metabolismo mais intenso, o que gera maiores danos e reparos no DNA, momento oportuno para a transferência do transgene da bactéria para a folha (BOYKO et al., 2006). Neste sentido, o tratamento 2x evidenciou um aumento nas taxas de divisão celular. Níveis mais elevados de divisão celular podem gerar erros durante a replicação do DNA, levando ao reparo, aumentando as oportunidades de integração do DNA exógeno no genoma hospedeiro. Assim, o tratamento 2x pode ser uma ferramenta importante para a integração do transgene.

De acordo com os resultados observados no presente estudo, a concentração de 2x não modificou o fenótipo da planta e aumentou a quantidade de brotos formados. Segundo Boyko et al. (2009), a presença de nitrato de amônio no meio de cultivo aumenta a taxa de recombinação. O aumento das concentrações de nitrato de amônio promove um efeito positivo no crescimento das plantas e na aparência fenotípica. Plantas que permaneceram em meios enriquecidos com nitrato de amônio apresentaram um aumento significativo na frequência da transformação estável, e uma maior integração do transgene no genoma hospedeiro.

Vários relatos também demonstraram a utilização do NH_4NO_3 como ferramenta que potencializa a brotação e crescimento das plantas. Em experimentos *in vitro* Poddar, Vishnoi, e Kothari (1997) em plantas de Capim pé-de-galinha (*Eleusine coracana*); Araújo et al. (2009) em plantas de Orquídea (*Cattleya loddigesii*) e Silva, Couto e Santos (2010) em plantas de girassol (*Helianthus annuus*). Em experimentos *ex vitro* Cruz, Pelacani e Araujo (2006) em plantas de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*); Tabatabaei et al. (2006, 2008) em plantas de morango (*Fragaria x ananassa*) e Souza et al. (2010) em plantas de berinjela (*Solanum melongena* L.).

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho sugere que o enriquecimento do meio de cultivo com nitrato de amônio promove um maior crescimento de tecidos e aumenta a taxa de divisão celular na concentração 2x. Esse aumento potencializa a expansão, a brotação e alongamento dos tecidos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREEVA, T.F.; MAEVSKAYA, S.N.; VOEVUDSKAYA, S.Y. 1998. The relationship between photosynthesis and nitrogen assimilation in Mustard plants exposed to elevated nitrate rates in nutrient solutions. **Russian Journal of Plant Physiology**, **45**: 702-705.

ARAÚJO, A.G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F.A.; CARVALHO, J.G.; ZARRAGA, D.Z.A. 2009. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, **31**: 35-39.

BARREIRO, A.P.; ZUCARELI, V.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. 2006. Análise de crescimento de plantas de manjeriço tratadas com reguladores vegetais. **Bragantia**, **65**: 563-567.

BIRCH, R.G. 1997. Plant transformation: problem and strategies for practical application. **Plant Molecular Biology**, **48**: 297–326.

BRAGA, F.T.; NUNES, C.F.; FAVERO, A.C.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J.C.; CASTRO, E.M.; 2009. Características anatômicas de mudas de morangueiros micropropagados com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **44**: 28-132.

BOYKO, A.; FILKOWSKI, J.; HUDSON, D.; KOVALCHUK, I. 2006. Homologous recombination in plants organ specific. **Mutat. Res**, **595**: 145-155.

BOYKO, A.; MATSUOKA, A.; KOVALCHUK, I. 2009. High frequency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated plant transformation induced by ammonium nitrate. **Plant Cell Report**, **28**: 737–757.

BRITTO, D.T.; KRONZUCKER, H.J. 2002. NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of Plant Physiology**, **159**: 567-584.

CASSANA, F.F. 2007. Caracterização fotossintética e do desenvolvimento de plantas de batata-doce cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, 56p.

CITOVSKY, V.; KOZLOVSKY, S.V.; LACROIX, B.; ZALTSMAN, A.; DAFNY-YELIN, M.; VYAS, S.; TOVKACH, A.; TZFIRA, T. 2007. Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. **Cell Microbiology**, **9**: 9–20.

CLAUSSEN, W.; LENZ, F.; 1995. Effect of ammonium and nitrate on net photosynthesis, flower formation, growth and yield of eggplants *Solanum melongena* L. **Plant Soil**, **171**:267–274.

- COSTA, R.C. 2012. Ecofisiologia, Rendimento e Qualidade de Morangueiro de Dias Neutros Cv. Albion em Diferentes Substratos. **Tese de Doutorado**, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil, 163p.
- CRAMER, M.D.; LEWIS, O.A.M. 1993. The influence of nitrate and ammonium nutrition on the growth of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) plants. **Annals of Botany**, **72**: 359–365.
- CRUZ, J.L.; PELACANI, C.R.; ARAÚJO, W.L. 2006. Efeito do nitrato e amônio sobre o crescimento e eficiência de utilização do nitrogênio em mandioca. **Bragantia**, **65**: 467-475.
- CRUZ, J.L.; PELACANI, C.R.; ARAÚJO, W.L. 2008. Influência do nitrato e do amônio sobre a fotossíntese e a concentração de compostos nitrogenados em mandioca. **Ciência Rural**, **38**: 643-649.
- DARNEL, R.L.; STUTTE, G.W. 2001. Nitrate concentration effects on NO₃- N uptake and reduction, growth, and fruit yield in strawberry **Journal of the American Society for Horticultural Science**, **125**: 560-563.
- DEBERGH, P.C.; AITKEN-CHRISTIE, J.; COHEN, D.; GROUT, B.; VON AMOLD, S.; ZIMMERMAN, R.; ZIV, M. 1992. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, **30**: 135–140.
- DOLEZEL, J.; BINAROVA, P.; LUCRETTI, S.; 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biology Plantarum**, **31**: 113–120.
- EDWARDS, J.; HORTON, B.D.; 1982. Interaction of peach seedlings to NO₃:NH₄ ratios in nutrient solutions. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, **107**, 142-147.
- FOLTA, K.M.; DHINGRA, A.; STEWART, L.H.P.J. 2006. Characterization of LF9, an octoploid strawberry genotype selected for rapid regeneration and transformation. **Planta**, **224**: 1058–1067.
- GERENDAS, J.; ZHU, Z.; BENDIXEN R.; RATELIFFE, G.; SATTELMACHER, B. 1997. Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, **160**: 239–251.
- GONCHAROVA, E.A.; DOBRENKOVA, L.G. 1981. Functional role of anatomical changes in strawberry in the course of adaptation to drought and salinity. **Tr. prikl. bot. genet. sel.** **71**: 100-108.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. 1998. Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **Embrapa-SP / Embrapa-CNPq**,183-260.

HOFFMANN, T.; KALINOWSKI, G.; SCHWAB, W. 2006. RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. **Plant Journal**, **48**: 818–26.

HUSAINI, A.M.; ABDIN, M.Z. 2007. Interactive effect of light, temperature and TDZ on the regeneration potential of leaf discs of *Fragaria x ananassa* Duch. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, **43**: 576-584.

IVANOVA, M.; STADEN, J.V. 2007. Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of in vitro regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, **92**: 227–231.

JAMES, D.J.; PASSEY, A.J.; RUGINI, E. 1988. Factors affecting high frequency plant regeneration from apple leaf tissues cultured *in vitro*. **Journal of Plant Physiology**, **132**: 148–154.

JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book.

KOZAI,T.; IWABUCHI, K.; WATANABE, K.; WATANABE, I. 1991. Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **25**: 107-115.

LAM, H.M.; COSCHIGANO, K.T.; OLIVEIRA, I.C.; MELO-OLIVEIRA, R.; CORUZZI, G.M. 1996. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**,**47**: 569–593.

LANDI, L.; MEZZETTI, B. 2006. TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. **Plant Cell Report**, **25**: 281–288.

LASA, B.; FRECHILLA, S.; ALEU, M.; GONZ´ALEZ-MORO, B.; LAMSFUS, C.; APARICIO-TEJO, P.M. 2000. Effects of low and high levels of magnesium on the response of sunflower plants grown with ammonium and nitrate. **Plant Soil**, **225**: 167–174.

LI, H.; TANG, C.; XU, Z.; LIU, X.; HAN, X. 2012. Effects of different light sources on the growth of non-heading chinese cabbage (*Brassica campestris* L.). **Journal of Agricultural Science**, **4**: 262-273.

LIAN, M.L.; MURTHY, H.N.; PAEK, K.Y. 2002. Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium* oriental hybrid 'Pesaro'. **Scientia Horticulturae**, **94**: 365-370.

LISEK, J.; HABDAS, H.; GAWROHSKI, S.W. 2002. Relationship between selected morphological, anatomical and cytological characteristics of leaves and the level of tolerance to herbicides in strawberry cultivars. **Acta Physiologiae Plantarum**, **24**: 371-378.

LUQUE, R.; SOUSA, H.C.; KRAUS, J.E. 1996. Métodos de coloração de Roeser (1972) modificado e Kropp (1972) visando a substituição do azul de Astra pelo azul de alciano 8GS ou 8GX. **Acta Botanica Brasilica**, **10**: 199-211.

MAGALHAES, J.R.; WILCOX, G.E. 1983. Tomato growth, nitrogen fraction and mineral composition in response to nitrate and ammonium foliar sprays. **Journal of Plant Nutrition**, **6**: 911-939.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. 1950. **Anatomy of the dicotyledons**. 2^a ed. Clarendon Press, Oxford.

MORGAN, L. 2006. **Hydroponic strawberry production. A technical guide to the hydroponic production of strawberries**. Suntec (NZ) Ltd, Tokomanu, New Zeland.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, **15**: 473-497.

NHUT, D.T.; TAKAMURA, T.; WATANABE, H.; OKAMOTO, K.; TANAKA, M. 2003. Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, **73**: 43-52.

O'BRIAN, I.E.O.; BAGULEY, B.C.; MURRAY, B.G.; MORRIS, B.A.M.; FERGUSON, I.B. 1998. Early stages of the apoptotic pathway in plant cells are reversible. **Plant Journal**, **13**: 803-814.

OLIVEIRA, F.A.; MEDEIROS, J.F.; MARACAJÁ, P.B.; OLIVEIRA, M.K.T.; GUIMARÃES, L.P. 2008. Desenvolvimento inicial do milho pipoca cultivado sob diferentes relações $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$. **Caatinga**, **21**: 197-201.

ORMEROD, M.G.; PAUL, F.; CHEETHAM, M.; SUN, X.M. 1995. Discrimination of apoptotic thymocytes by Forward Light Scatter. **Cytometry**, **21**: 300-306.

PASSEY, A.J.; BARRETT, K.J.; JAMES, D.J. 2003. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria X ananassa* Duch.) using a range of explant types. **Plant Cell Report**, **21**: 397-401.

- PEUKE, A.D.; JESCHKE, W.D.; HARTUNG, W. 1998. Foliar application of nitrate or ammonium as sole nitrogen supply in *Ricinus communis*. II. The flows of cations, chloride and abscisic acid. **New Phytologist**, **140**: 625-636.
- PODDAR, K.; VISHNOI, R.K.; KOTHARI, S.L. 1997. Plant regeneration from embryogenic callus of finger millet *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. on higher concentrations of NH_4NO_3 as a replacement of NAA in the medium. **Plant Science**, **129**: 101-106.
- QIN, Y.; SILVA, J.A.T.; ZHANG, L.; ZHANG, S. 2008. Transgenic strawberry: state of the art for improved traits. **Biotechnology Advances**, **26**: 219–232.
- RAAB, T.K.; TERRY, N. 1994. Nitrogen-source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. **Plant Physiology**, **105**: 1159–1166.
- SANCHEZ, E.; SOTO, J.M.; GARCIA, P.C.; LÓPEZ-LEFEBRE, L.R.; RIVERO, R.M.; RUIZ, J.M.; ROMERO, L. 2000. Phenolic compounds and oxidative metabolism in green bean plants under nitrogen toxicity. **Australian Journal of Plant Physiology** **27**, 272–277.
- SCHUERGER, A.C.; BROWN, C.S.; STRYJEWSKI, E.C. 1997. Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) grown under red light-emitting diodes supplemented with blue or far-red light. **Annals of Botany**, **79**: 273–282.
- SEABROOK, J.E.A. 1987. Changing the growth and morphology of potato plantlets by varying the illumination source. **Acta Horticulturae**, **212**:401-410.
- SILVA, P.C.C.; COUTO, J.L.; SANTOS, A.R. 2010. Efeito dos íons amônio e nitrato no desenvolvimento do girassol em solução nutritiva. Revista da **Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, **17**: 104-114.
- SOUZA, V.F.L.; OLIVEIRA, F.A.; OLIVEIRA, F.R.A.; CAMPOS, M.S.; MEDEIROS, J.F. 2010. Efeito do nitrato e amônio sobre o crescimento da berinjela. **Revista Verde Agroecologia Desenvolvimento Sustentável**, **5**: 80-88.
- STEELE, R.V. 2007. The story of a new light source. **Nature**, **1**:25-26.
- TABATABAEI, S.J.; FATEMI, L.S.; FALLAHI, E. 2006. Effect of ammonium nitrate ratio on yield, calcium, concentration, and photosynthesis rate in strawberry. **Journal of Plant Nutrition**, **29**: 1273-1285.

TABATABAEI, S.J.; YUSEFI, M.; HAJILOO, J. 2008. Effects of shading and $\text{NO}_3\text{:NH}_4$ ratio on the yield, quality and N metabolism in strawberry. **Scientia Horticulturae**, **116**: 264-272.

TAIZ, L.; ZEIGER, L. 2002. **Plant physiology**. 3.ed. Sunderland: Sinauer Assoc.

TAPIA, M.L.; GUTIERREZ, V. 1997. Distribution pattern of dry weight, nitrogen, phosphorus and potassium through tomato ontogenesis. **Journal of Plant Nutrition**, **20**: 683-791.

TIBBITS, T.W.; MORGAN, D.C.; WARRINGTON, J.J. 1983. Growth of lettuce, spinach, mustard and wheat plants under four combinations of high-pressure sodium, metal halide and tungsten halogen lamps at equal PPFD. **Journal of American Horticultural Science**, **108**: 622-630.

WILSON, D.A.; WEIGEL, R.C.; WHEELER, R.M.; SAGER, J.C. 1993. Light spectral quality effects on the growth of potato (*Solanum tuberosum* L.) nodal cuttings *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, **29**: 5-8.

WU, C.C.; HSU, S.T.; CHANG, M.Y.; FANG, W. 2009. Effect of Light Environment on Runner Plant Propagation of Strawberry. **Acta Horticulturae**, **11**: 16-19.

YEH, N.; CHUNG, J.P. 2009. High-brightness LEDs - Energy efficient lighting sources and their potential in door plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, **13**: 2175–2180.

Zanandrea, I. 2006. Desenvolvimento e caracterização fotossintética de plantas de macieira 'M-9' cultivadas *in vitro*. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, 50p.

ZHU, Z.; GERENDAS, J.; BENDIXEN, R.; SCHINNER, K.; TABRIZI, H.; SATTELMACHER, B.; HANSEN, U.P. 2000. Different tolerance to light stress in NO_3^- and NH_4^+ grown *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Biology**, **2**: 558–570.

8 PERSPECTIVAS

Obtenção de plantas de morangueiro geneticamente transformadas com o gene *OxDc* e resistentes a fungos necrotróficos que acometem a cultura;

Obtenção de plantas de morangueiro geneticamente transformadas com o gene *PgAMP₁* e resistentes a bactéria *Xanthomonas fragariae*.