

Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas
(Imunologia & DIP/Genética & Biotecnologia)

Danielle Luciana Aurora Soares do Amaral

AVALIAÇÃO DA SEGREGAÇÃO DO GENE DA OXALATO
DESCARBOXILASE E DA RESISTÊNCIA AO *Fusarium oxysporum*
NA GERAÇÃO T₁ DE FUMO TRANSFORMADO COM OXDC.

Juiz de Fora
2014

Danielle Luciana Aurora Soares do Amaral

Avaliação da segregação do gene da Oxalato Descarboxilase e da resistência ao *Fusarium oxysporum* na geração T₁ de fumo transformado com *OXDC*.

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

Orientador: Professor Doutor Marcelo de Oliveira Santos

Juiz de Fora

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Amaral, Danielle Luciana Aurora Soares do.

Avaliação da segregação do gene da Oxalato Descarboxilase e da resistência ao *Fusarium oxysporum* na geração T1 de fumo transformado com OXDC. / Danielle Luciana Aurora Soares do Amaral. -- 2014.

42 p.

Orientador: Marcelo de Oliveira Santos

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2014.

1. Transformação de Plantas. 2. Transgênicos. 3. Resistência a fungos. I. Santos, Marcelo de Oliveira, orient. II. Título.

DANIELLE LUCIANA AURORA SOARES DO AMARAL

Avaliação da segregação do gene da oxalato descarboxilase e da resistência ao *Fusarium oxysporum* na geração T₁ de fumo transformado com *OXDC*.

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.

Aprovada em

BANCA EXAMINADORA

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

Professor Doutor Wagner Campos Otoni
Departamento de Biologia Vegetal da UFV

Professor Doutor José Marcello Salabert de Campos
Instituto de Ciências Biológicas da UFJF

Dedico aos meus avós Zélia e Vitorino, que me deram todo amor e carinho que eu poderia ter e infelizmente não estão mais aqui para ver esta conquista. Aos meus pais José Carlos e Sônia, ao meu irmão Christian, aos meus avós Carmelina e Manoel, por todo apoio e carinho. Ao Vitor, por ser meu melhor amigo, meu porto seguro. Aos meus amores Mel e Costelinha, pela compreensão e amor que não precisam de palavras.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de estudos que possibilitou a dedicação integral à pós-graduação.

Ao Professor Dr. Marcelo pela orientação científica e profissional.

Ao Dr. Carlos, que é acima de tudo um amigo, por tudo. Para ele, não há palavras suficientes para agradecer.

Ao Dr. Lyderson por abrir as portas do Laboratório de Genética e Biotecnologia para mim.

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

Ao Dr. Saulo por toda ajuda e dedicação.

À Mestra Letícia pelos momentos de companheirismo no laboratório e por compartilhar seus conhecimentos.

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

À Dra. Eveline por esclarecer minhas dúvidas sempre que necessário.

Ao meu pai por ter me dado todo apoio necessário as minhas vitórias e conquistas.

A minha mãe pelos anos de dedicação.

Ao meu irmão pelos momentos de companheirismo e também pelos momentos de brigas e discussões.

Ao meu noivo Vitor, amigo e companheiro de todas as horas, por me acalmar nos momentos de desespero. Apoio sem o qual eu não teria chegado até aqui.

Aos meus avós paternos, Zélia e Vitorino, e maternos, Carmelina e Manoel, por todo amor.

Aos integrantes do Laboratório de Bioquímica, em especial à Michelle e ao Leo por sempre estarem prontos a ajudar.

Aos integrantes do Laboratório de Biologia Celular pela contribuição e empréstimos de materiais.

Aos meus amigos de todas as horas Erick, Juliana, Bárbara, Rafael, Daniel e Lilian por todas as conversas jogadas fora *inbox*, pelas risadas, momentos felizes e apoio nos momentos tristes.

Ao Vinícius, companheiro de todas as horas, por toda ajuda e dedicação, sem a qual nada do que fiz seria possível, pela companhia nas caminhadas ao R.U. e ao laboratório de Biossegurança, pelas conversas e brincadeiras.

À Natália, por toda ajuda, por tudo que me ensinou, principalmente a perseverar.

Ao Leonardo, companheiro de mestrado, por compartilhar comigo todos os sofrimentos e alegrias.

Aos colegas do laboratório Sirlei, Aryane, Melvis, Camila, Shayani, Renata, Francisco, Thalita, Juliana, Paola, Flávia Rangel, Ludymila, Ana Luisa, Aline, Jéssica, Flávia, Marízia, Romena, Matheus pela paciência em dividir o espaço tão disputado e pela convivência.

A minha família por torcerem por mim e compreenderem minhas ausências.

Aos meus 28 cachorros, por serem a alegria dos meus finais de semana. Em especial os meus amados Mel e Costelinha, por saberem ouvir e confortar mesmo sem saberem dizer uma palavra.

Na certeza de que ninguém se faz sozinho, obrigada!

RESUMO

Desde a domesticação das plantas para a utilização humana, as doenças vêm causando grandes perdas na produção. Fungos fitopatogênicos tais como *Sclerotium rolfsii*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum* são capazes de infectar diferentes espécies de plantas. A infecção por estes fungos leva a perdas consideráveis na época da colheita. A fase inicial da infecção envolve a produção e o acúmulo de grande quantidade de ácido oxálico (AO), que parece ser um dos maiores determinantes da patogenicidade. *Fusarium oxysporum* é a espécie mais comum do gênero e causa murcha vascular em diferentes espécies de plantas. Esse fungo causa perdas severas em muitas lavouras, como algodão, fumo, banana, café, morango e cana de açúcar. Genes que conferem resistência a fitopatógenos tornam-se de importância agrônômica como recursos para melhoramento. Dentre esses, destacamos o da enzima oxalato descarboxilase (OXDC), capaz de catalizar a degradação do AO em ácido fórmico e dióxido de carbono, diminuindo a capacidade de infecção do fungo. Na geração T₀ de fumo transformado com gene da OXDC, foram obtidas quatro linhagens resistentes ao fungo, estas foram analisadas na T₁. O objetivo deste trabalho foi avaliar a segregação do transgene OXDC para a geração T₁ de fumo e avaliar se a geração T₁ de plantas transformadas é capaz de resistir ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Trinta plantas de cada linhagem T₁ de fumo transformado com OXDC foram avaliadas, por PCR, quanto a presença do HPTII. Estas quatro linhagens foram analisadas apresentaram proporção de segregação de 3:1. Uma planta PCR positiva de cada linhagem foi submetida a bioensaios para verificar a resistência ao fungo e ao AO. No ensaio de resistência ao fungo *Fusarium oxysporum*, este não foi capaz de infectar as linhagens transgênicas, mostrando um aumento da resistência da T₁ em relação a T₀ quando os resultados foram comparados. Os níveis de expressão do transgene foram avaliados por RT-PCR. As linhagens T1, T4 e T6 mostraram níveis de expressão semelhantes, já a linhagem T2 apresentou menor nível de expressão que as demais linhagens, de maneira que este resultado pode ser correlacionado com menor resistência ao AO. Com base nestes resultados pode-se concluir que a enzima Oxalato Descarboxilase demonstrou ser eficiente no combate ao patógeno *Fusarium oxysporum* e potencialmente eficiente no combate a outros fungos que também utilizem AO no processo de infecção.

Palavras-chave: OXDC, transformação genética, *Fusarium oxysporum*, resistência, transgênicos.

ABSTRACT

Since the domestication of plants for human use, the diseases are causing major production losses. Pathogenic fungi such as *Sclerotium rolfsii*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium oxysporum* are capable of infecting various plant species. Infection by these fungi leads to considerable losses at harvest. The initial phase of the infection involves the production and accumulation of large amounts of oxalic acid (OA), which seems to be one of the biggest determinants of pathogenicity. *Fusarium oxysporum* is the most common species of the genus and causes vascular wilt in different plant species. This fungus causes severe losses in many crops such as cotton, tobacco, bananas, coffee, strawberry and sugar cane. Genes that confer resistance to pathogens become of agronomic importance as resources for improvement. Among these we highlight the enzyme oxalate decarboxylase (OXDC) capable of catalyzing the degradation of OA in formic acid and carbon dioxide, decreasing the infectivity of the fungus. In the T₀ generation of tobacco transformed with OXDC gene four resistant fungal strains were obtained, they were analyzed in T₁. The objective of this study was to evaluate the segregation of the transgene OXDC for T₁ generation of smoke and assess whether the T₁ generation of transformed plants are able to resist the pathogen *Fusarium oxysporum*. Thirty T₁ plants of each line of tobacco transformed with OXDC were evaluated by PCR for the presence of *HPTII*. These four strains were analyzed showed a segregation ratio of 3:1. A positive PCR plant of each strain was subjected to bioassays to verify resistance to the fungus and the OA. In the test of resistance to the fungus *Fusarium oxysporum*, this was not able to infect the transgenic lines, showing an increase of the resistance of T₁ relative to T₀ when the results were compared. The levels of transgene expression were assessed by RT-PCR. T1, T4 and T6 strains showed similar levels of expression, the T2 strain showed lower expression level than other strains, so that this result can be correlated with lower resistance to OA. Based on these results it can be concluded that the enzyme Oxalate Descarboxylase demonstrated to be effective in combating the pathogen *Fusarium oxysporum* and potentially efficient against other fungi which also use OA in the infection process.

Keywords : OXDC , genetic transformation , *Fusarium oxysporum* , resistance , transgenics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Modelo para a transformação genética mediada por *Agrobacterium* (TZFIRA e CITOVSKY, 2006).....16
- Figura 2 *Fusarium oxysporum*. A, B, C, D: Macroconídeos. E: Clamidiósporo. F: Conidióforo.(PLOETZ, 2005).....18
- Figura 3 Análise por PCR para detecção do gene. M: marcador de peso molecular 1Kb ladder (Promega®); C-: Reação sem DNA. C+: controle positivo (plasmídeo pCAMBIAOxDc); NT: planta não transgênica; P1, P2, P4 e P6: plantas transgênicas.....28
- Figura 4 Resistência das plantas transgênicas a inoculação com *Fusarium oxysporum*. C-: planta não transgênica não inoculada. C+: planta não transgênica inoculada com o fungo. P1, P2, P4 e P6: linhagens transgênicas inoculadas com o fungo. A: após 70 h de inoculação. B: Após 94 h de inoculação. C: Planta não transformada infectada após 46 h de inoculação. D: Planta 2 inoculada, fungo crescendo sobre a superfície foliar, porém sendo incapaz de causar necrose (barra = 1cm).....29
- Figura 5 Efeito do ácido oxálico (20 mM) em plantas da geração T₁ de transformadas de tabaco, após 24 h de exposição. C-: planta não transgênica exposta a água, pH 4. C+: planta não transgênica exposta ao AO. P1, P2, P4 e P6: linhagens transgênicas expostas ao AO. (barra = 1cm).....30
- Figura 6 Efeito do ácido oxálico (20 mM) em plantas da geração T₁ transformadas de tabaco, após 48 h de exposição. C-: planta não transgênica exposta a água, pH 4. C+: planta não transgênica exposta ao AO. P1, P2, P4 e P6: linhagens transgênicas expostas ao AO. (barra = 1cm).....30
- Figura 7 RT-PCR para a detecção da expressão do transgene *OXDC* e do gene endógeno *18S rRNA* nas linhagens transgênicas de fumo.....31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise da segregação do transgene em 4 linhagens de fumo.....	27
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AO	Ácido oxálico
AUDPC	Área sob a curva de progresso da doença
BDA	Meio de cultura: Batata, dextrose e ágar
CTAB	Brometo de Cetil Trimetil Amônio
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Kb	Unidade de milhar(s) de par (s) de base (s)
LB	Meio de Cultura <i>Lysogny broth</i>
mg	Miligramas
µg	Microgramas
mL	Mililitros
MS	Meio de cultura Murashige e Skoog
µl	Microlitro
mM	Milimolar
µM	Micromolar
NT	Não transformada
NEP	“Necrosis and ethylene-inducing peptides”- Peptídeos indutores de etileno e necrose
OXDC	Oxalato Descarboxilase
<i>OXDC</i>	Gene da Oxalato Descarboxilase
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico

PVP	Polivinilpirrolidona
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase semi-quantitativa
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossomal
T-DNA	DNA indutor de tumor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS.....	14
1.1.1 Transformação via <i>Agrobacterium</i>	14
1.2 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	16
1.2.1 <i>Fusarium oxysporum</i>	17
1.3 O ÁCIDO OXÁLICO E A OXALATO DESCARBOXILASE.....	19
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	22
3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	22
3.2.1 Extração do DNA genômico.....	22
3.2.2 Análise da progênie.....	23
3.2.3 Avaliação da presença do transgene na linhagem T1 de fumo.....	24
3.3 TESTE DE RESISTÊNCIA DAS PLANTAS TRANSGÊNICAS AO ÁCIDO OXÁLICO.....	24
3.4 TESTE DE RESISTÊNCIA AO <i>Fusarium oxysporum</i> IN VITRO.....	25
3.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO TRANSGENE OXDC PELA TÉCNICA DE RT-PCR.....	25
4 RESULTADOS.....	27
4.2 ANÁLISE DA PROGÊNIE.....	27
4.1 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO TRANSGENE OXDC NA GERAÇÃO T ₁ DE FUMO TRANSFORMADO.....	27
4.3 TESTE DE RESISTÊNCIA AO <i>Fusarium oxysporum</i> IN VITRO.....	28
4.4 TESTE DE RESISTÊNCIA DAS PLANTAS TRANSGÊNICAS AO ÁCIDO OXÁLICO.....	29
4.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE OXDC PELA TÉCNICA DE RT-	

PCR.....	31
5 DISCUSSÃO.....	32
6 CONCLUSÃO.....	37
7 REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS

A transformação genética em plantas tem como finalidade obter cultivares com maior produção, mais resistentes a pragas ou mesmo alterar a composição nutricional. Ela é também utilizada como ferramenta nos estudos de genômica funcional (AHMAD et al., 2012) para o desenvolvimento de plantas como biorreatores, o que era uma promessa em meados anos 90 (GODDIJN e PEN, 1995) e mais recentemente é largamente utilizada. Há alguns desafios como baixa expressão e processamento secundário, que podem ser superados utilizando-se de espécies apropriadas como o arroz (OU et al., 2014) e utilizadas até como veículos para vacinação tanto de doenças que acometem humanos (SMITH et al., 2014) como das que atacam animais (OKAMURA et al., 2014).

Existem diferentes modos de transformação de plantas: a eletroporação, a introdução de genes via polietilenoglicol (PEG), a biobalística e a transformação mediada por *Agrobacterium*. A transformação mediada por *Agrobacterium* tipicamente produz linhagens com baixo número de cópias do transgene (OLTMANNNS et al., 2010), o que é interessante do ponto de vista comercial.

A frequência de transformação e regeneração depende de diversos fatores, como a linhagem bacteriana, concentração da bactéria, período de pré-cultivo, período de co-cultivo, concentração de acetoseringona, temperatura, pH, tipo de explante, quantidade de luz dentre outros (URANBEY et al., 2005).

1.1.1 TRANSFORMAÇÃO VIA *Agrobacterium*

A *Agrobacterium* transforma seus hospedeiros naturalmente através da transferência de um segmento de DNA do seu plasmídio indutor de tumor para o genoma da célula hospedeira (GELVIN, 2003). Na natureza esse segmento é o T-DNA ou DNA indutor de tumor, este carrega uma série de oncogenes que induzem crescimento neoplásico das células da planta hospedeira e produção

de opinas e derivados de aminoácidos que são utilizadas pela bactéria como fonte de nutrientes (GAUDIN, VRAIN e JOUANIN, 1994).

Apesar de largamente utilizada na transformação de plantas, algumas publicações demonstraram o uso de *Agrobacterium* em hospedeiros não-vegetais, de procariotos a células humanas (LACROIX et al., 2005). Kunik e colaboradores (2001) transformaram células HeLa utilizando *Agrobacterium*.

A maquinaria molecular necessária para a produção do T-DNA requer proteínas oriundas tanto do DNA cromossômico como do plasmídio indutor de tumor. Além disso, já foi reportado o uso de várias proteínas da célula hospedeira no processo de transformação, principalmente nos estágios mais tardios da transformação como transporte intracelular do T-DNA (GELVIN, 2003).

As linhagens utilizadas na transformação genética, chamadas linhagens desarmadas, têm o gene de interesse inserido no T-DNA.

O processo de transformação compreende dez passos principais (Figura 1) e começa com o reconhecimento e ancoragem da *Agrobacterium* à célula hospedeira e o reconhecimento de sinais da planta pelo sistema de transdução de sinais da *Agrobacterium* (VirA/VirG). Em seguida, há a ativação dos genes Vir e uma cópia do T-DNA é gerada pelo complexo protéico VirD1/VirD2. Então o DNA é levado ao citoplasma da célula hospedeira complexado com VirD2 e diversas outras proteínas Vir. No próximo passo, há a associação da VirE2 com o complexo de DNA, assim o complexo maduro vai, pelo citoplasma, até o núcleo, onde é transportado para dentro ativamente. Uma vez dentro do núcleo, o DNA é recrutado pelo ponto de integração, desligado das proteínas que o escoltaram e integrado ao núcleo (TZFIRA e CITOVSKEY, 2006).

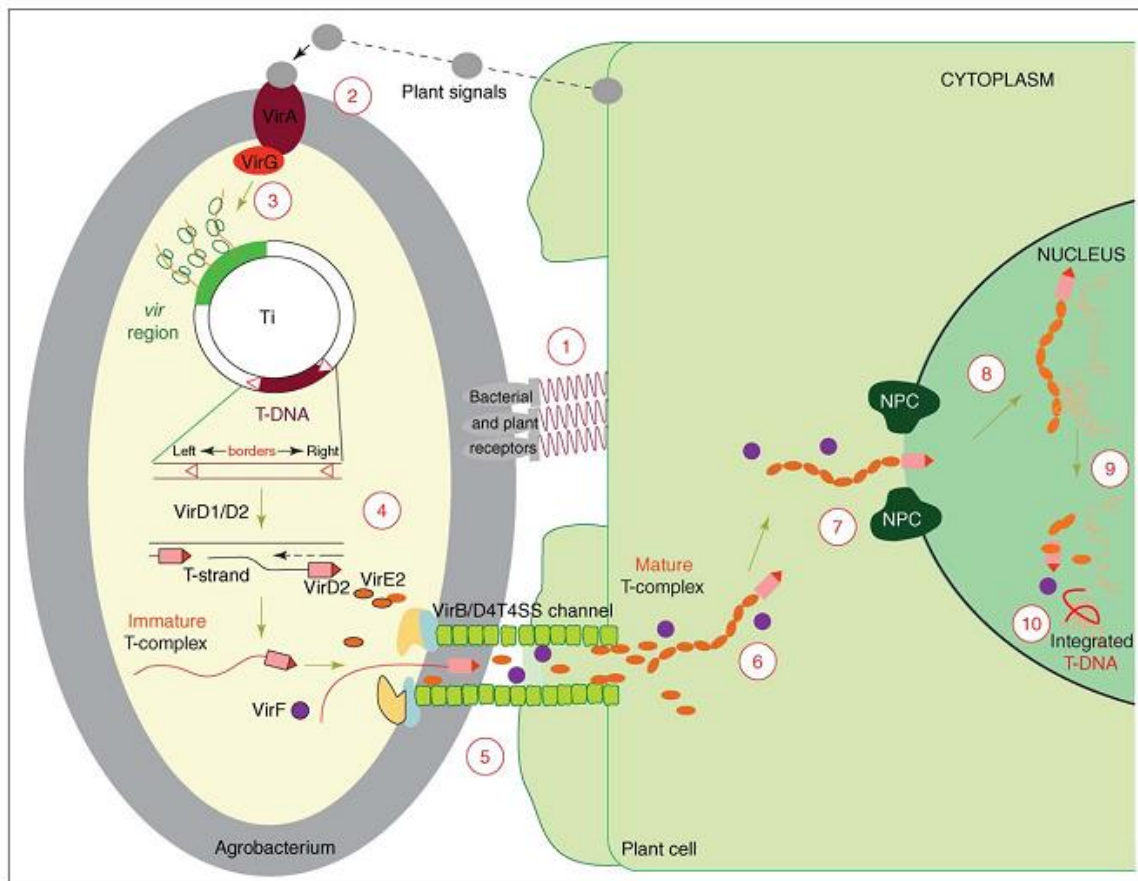


Figura 1: Modelo para a transformação genética mediada por *Agrobacterium* (TZFIRA e CITOVSKY, 2006).

1.2 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Infecções causadas por fungos são cada vez mais reconhecidas como uma ameaça à produção de alimentos ao redor do mundo (PENNISE, 2010). No século XIX na Inglaterra, a requeima, causada por um fungo, na batata irlandesa levou a morte por fome e à ruína do governo. A ameaça das doenças causadas por fungos não foi minimizada pelo tempo. Esse problema foi intensificado pela adaptação dos microrganismos a novos ecossistemas, disseminado pelo comércio, transporte e flutuações climáticas (ANDERSON et al., 2004).

Segundo Fisher e colaboradores (2012), as perdas nas cinco principais culturas mundiais (arroz, trigo, milho, batata e soja), causadas por fungos poderiam alimentar 8,5% da população existente no mundo em 2011. Em caso

da ocorrência de uma epidemia severa nas cinco culturas citadas, haveria alimento suficiente para somente 39% da população.

Pode-se citar como exemplo desses fungos fitopatogênicos responsáveis por perdas em algumas lavouras *Sclerotium rolfsii*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum*. A fase inicial da infecção por fungos necrotróficos envolve a produção e acúmulo de grande quantidade de ácido oxálico (AO), que parece ser um dos maiores determinantes da patogenicidade (DUTTON e EVANS, 1996).

1.2.1 *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum é a espécie mais comumente encontrada dentre as espécies do gênero *Fusarium* ao redor do mundo. É dispersa, a curta distância, pela água ou por equipamentos utilizados na lavouras e, a longa distância, pelo transporte de plantas e sementes contaminadas (AGRIOS, 2005).

Em fungos, propágulos assexuados são produzidos durante todo ciclo de vida e hifas e estágios assexuados são produzidos enquanto há nutrientes disponíveis. Dentre as espécies do gênero *Fusarium*, diferentes tipo de reprodução são encontradas: assexuada, homotática e heterotática. *F. oxysporum* não tem reprodução sexuada conhecida (BROWN e PROCTOR, 2013) e produz três tipos de esporos assuxuados. Os macroconídios são produzidos, na maioria das vezes, em conidióforos ramificados na superfície das plantas infectadas ou *in vitro*, em meios de cultura. Estes esporos são de paredes finas com uma célula basal bem definida e uma célula apical pontiaguda. Os microconídeos podem ser ovais ou em forma de rins e ocorrem nos pequenos microconidióforos nos micélios aéreos. Tanto os macroconídeos como os microconídeos podem ser formados no xilema das plantas infectadas. No entanto, as formas mais comumente encontradas nos tecidos das plantas infectadas são os microconídeos (MACE, BELL e BECKMAN, 1981).

Já os clamidiósporos têm paredes grossas e são produzidos nas hifas. São formados tanto em meio de cultura, *in vitro*, quanto no tecido morto de plantas infectadas, no estágio final da doença. Estes são esporos de resistência, capazes de sobreviver por longos períodos nos restos das plantas

no solo, mesmo na ausência de hospedeiros (MACE, BELL e BECKMAN, 1981).

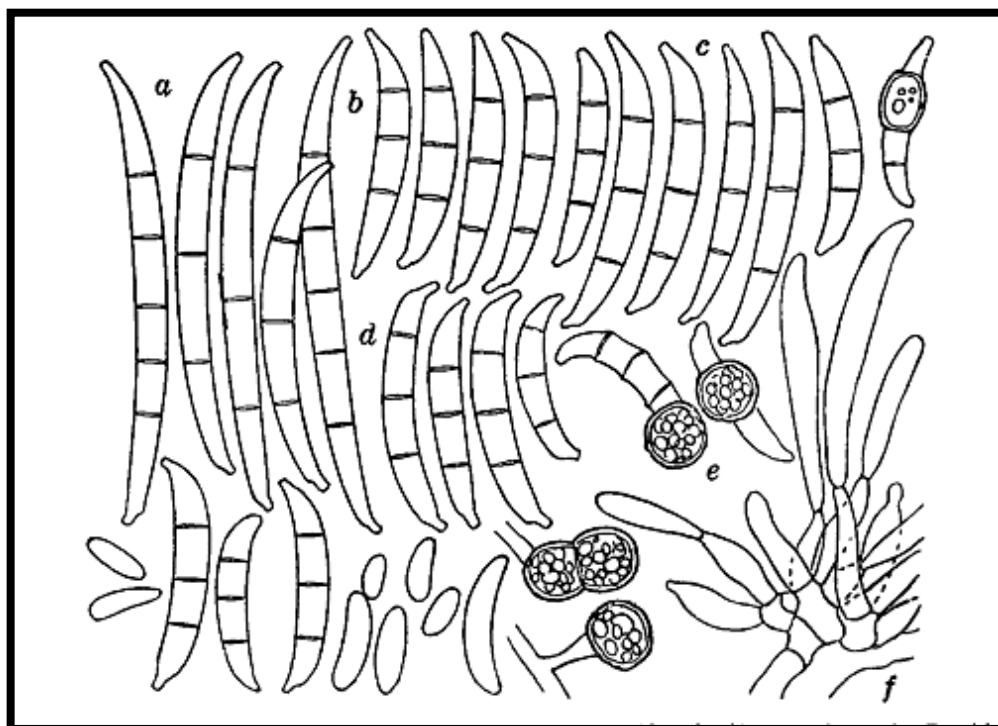


Figura 2: *Fusarium oxysporum*. A, B, C, D: Macroconídeos. E: Clamidiósporo. F: Conidióforo. (PLOETZ, 2005).

Fusarium oxysporum causa perdas severas em lavouras de algodão, fumo, banana, café, pêra, lentilha, batata-doce, melancia, melão, abóbora, morango, cana de açúcar, dentre outras, causando a murcha vascular. Os sintomas iniciais são a murcha vascular incluindo o clareamento das nervuras e epinastia das folhas, seguido de redução do porte/vigor da planta, amarelecimento das folhas mais jovens, murcha progressiva das folhas e pecíolos, senescência e abscisão foliar e finalmente morte da planta (MACE, BELL e BECKMAN, 1981; DI PIETRO et al., 2003).

Além desta doença, causada por *F. oxysporum*, também há outras causadas pelo gênero que trazem grande prejuízo à agricultura, como o apodrecimento das raízes corticais, dos frutos e das raízes e a mancha das folhas.

O controle do fungo é dificultado por sua alta capacidade de permanecer no solo por longos períodos, fazendo com que rotação de culturas seja ineficiente. Algumas opções utilizadas são retirar os restos da colheita, para

evitar a dispersão pelos tecidos contaminados, utilização de fungicidas tanto no solo como nas plantas e a utilização de sementes não infectadas. Porém a melhor opção é o uso de variedades resistentes e retirar os restos culturais o que não é viável para todas as plantas cultivadas.

O uso de transgênicos resistentes à doenças é uma alternativa para as espécies que não possuem variedades naturalmente resistentes.

Desta forma genes de importância agrônômica tais como aqueles que conferem resistência a insetos e a fitopatogênicos e a melhoria da qualidade nutricional têm sido isolados a partir de plantas e outros organismos (HOSHIKAWA, ISHIHARA e NAKAMURA, 2012; GURURANI et al., 2012). Dentre os genes descritos na literatura e disponíveis para pesquisa, vários são conhecidos por conferir resistência a fitopatogênicos. Dentre esses, inclui-se o gene da oxalato descarboxilase (OXDC), primeiramente isolado do basidiomiceto *Flammulina velutipes* (MEHTA e DATTA, 1991).

1.3 O ÁCIDO OXÁLICO E A OXALATO DESCARBOXILASE

Sabe-se que alguns fungos fitopatogênicos necrotróficos secretam AO como parte do processo de invasão de tecidos de plantas. O AO favorece a degradação da parede celular vegetal, alterando o pH apoplástico para um valor próximo ao ideal de ação de enzimas que degradam a parede celular, elevando Ca^{2+} , regulando as células guarda e também pode causar intupimento dos vasos com cristais de oxalato (DUTTON e EVANS, 1996). e também pode inibir a “explosão” oxidativa nas plantas (GUO e STOTZ, 2007). Esta “explosão” oxidativa é uma das primeiras respostas das plantas contra microrganismos invasores (KIM et al., 2008) e consiste em elevada, rápida e transiente produção de espécies reativas de oxigênio (WOJTASZEK, 1997). Kim e colaboradores (2008) mostraram que o AO atua como um ativador da morte celular programada em plantas e é responsável por características apoptóticas no vegetal durante o desenvolvimento da doença, em um mecanismo que envolve produção de espécies reativas de oxigênio.

Tal aparato é um dos mais importantes determinantes em impedir a instalação e o 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 alimento. Neste caso a morte celular ajuda na colonização do tecido vegetal hospedeiro (VAN KAN, 2006).

Pode-se citar como exemplo, o experimento realizado com *Sclerotium rolfsii*, que é um fungo que provoca doenças em quase 100 famílias de plantas. Quantidades consideráveis de oxalato foram detectadas em tecidos de plantas infectadas, mas não nas plantas saudáveis. O AO produzido por este fungo desempenhou papel essencial em sua capacidade patogênica. Linhagens de *Sclerotinia sclerotiorum* mutantes, sem a capacidade de produzir AO, não são patogênicas, mesmo com todas as enzimas de degradação da parede celular sendo funcionais (GODOY et al., 1990; WILLIAM et al., 2011)

A enzima oxalato descarboxilase (OXDC) é capaz de degradar o ácido oxálico (SVEDRUZIC et al., 2005). A OXDC possui a capacidade de catalizar a degradação de ácido oxálico em ácido fórmico e dióxido de carbono (MEHTA e DATTA, 1991).

O gene codificador da enzima Oxalato Descarboxilase (OXDC), foi isolado do basidiomiceto *Flammulina velutipes*. Estudos demonstraram a capacidade desse gene em conferir resistência de plantas de tabaco, tomate, soja e alface ao fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (KESARWANI et al., 2000, DIAS et al., 2006, CUNHA et al., 2010) e ao fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da vassoura-de-bruxa em cacauzeiros (SILVA, 2011).

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu plantas de fumo transgênicas, com o gene OXDC resistentes ao fungo *Fusarium oxysporum* e ao AO (PINTO, 2012) e foram feitas as análises das plantas T₀. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a presença do gene OXDC e a resistência ao *Fusarium oxysporum* nas plantas de fumo da geração T₁ das plantas geradas por Pinto (2012).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1- Avaliar a presença do gene *OXDC* na geração T₁ das plantas produzidas por Pinto (2012);
- 2 - Avaliar a resistência das plantas transgênicas contra o fungo necrotrófico *Fusarium oxysporum in vitro*;
- 3- Avaliar a resistência das plantas transgênicas ao ácido oxálico;
- 4- Analisar os níveis de expressão do gene *OXDC* na geração T₁ por RT-PCR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Todo trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular da UFJF. O laboratório possui certificado de qualidade de biossegurança junto à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO) 129/2004.

Para obtenção de plantas da geração T₁ de fumo (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) transgênico, sementes de quatro linhagens que apresentaram resistência ao fungo *Fusarium oxysporum* e ao AO na geração T₀ (Pinto, 2012), foram desinfestadas e germinadas no Laboratório de Biossegurança - UFJF para cultivo *in vitro*. A desinfestação constou da imersão das sementes em água e detergente Tween 20 por 2 minutos, em álcool etílico 70% (v/v) por 30 segundos e em solução de hipoclorito de sódio 15% (v/v) por 10 minutos, seguido por cinco enxágues com água deionizada estéril.

Posteriormente, as sementes foram germinadas em placas de Petri contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de glicose 20 g/L, ágar 7g/L, pH 5,8 e do agente seletivo higromicina 10 mg/L, a fim de obter somente plantas resistentes a higromicina. As sementes foram germinadas em sala de crescimento a 25± 2 °C, com fotoperíodo de 16:8 h (claro: escuro) e 30 μmol fótons m⁻² s⁻¹. As plantas obtidas foram mantidas sob condições *in vitro*, em sala de crescimento, e utilizadas como fonte de explantes para os experimentos.

Além das plantas mantidas *in vitro*, que foram utilizadas para os testes de resistência, também foram mantidas plantas das linhagens transgênicas em casa de vegetação, que foram utilizadas para a avaliação da segregação do transgene.

3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

3.2.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A extração do DNA genômico das plantas de fumo foi realizada utilizando-se o método CTAB com modificações. Cerca de 300 a 500 mg de tecido vegetal fresco de cada planta foram macerados no Tissue Lyser II Quiagen®. Foram adicionados 700 µl de tampão CTAB, acrescido e 1% de PVP (polivinilpirrolidona) e 0,2% de Beta-mercaptoetanol. As amostras foram incubadas a 65°C por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 500 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, 14.000 rpm recuperando-se o sobrenadante (300 microlitros). Posteriormente, adicionou-se 0,54% do volume do sobrenadante de isopropanol gelado e 0,08% do volume de Acetato de Amônio 7,5 M e as amostras foram mantidas a -20 °C por 30 minutos a fim de permitir a precipitação do DNA, em seguida, novamente centrifugadas a 14.000 rpm, porém por 5 minutos. Os precipitados recuperados foram lavados com 1 mL de etanol 70 % e novamente centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos, seguindo em lavagem com etanol 95%. O DNA precipitado foi seco em câmara de fluxo laminar e ressuspendido em 50 µl de água ultra-pura. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente overnight antes do seu armazenamento a -20 °C.

3.2.2 ANÁLISE DA PROGÊNIE

A fim de testar a hipótese de que a segregação do transgene oxalato descaboxilase segue a proporção mendeliana de 3:1, foram avaliadas 30 plantas de cada linhagem quanto à presença transgene inserido no genoma pela reação em cadeia da polimerase (PCR) 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 (1 minuto a 95° C; 1 minuto a 58° C; 1 minuto 72° C) e um ciclo de extensão final de 5 minutos a 72° C. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e corados com *syber green* a fim de se visualizar um fragmento de 404 bp. O gel

do material analisado foi capturado e armazenado em sistema de fotodocumentação digital.

A hipótese foi testada pelo teste do qui-quadrado com nível de confiança de 95%.

3.2.3 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO TRANSGENE NA LINHAGEM T₁ DE FUMO.

As plantas obtidas na presença de higromicina foram mantidas em meio MS. Estas plantas foram avaliadas quanto à presença do transgene *OXDC* pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR foi realizada em termociclador Eppendorf modelo Mastercycler® utilizando-se os primers *OXDC 873* (5'-TGGGCTCGACAGAGGAGAAG-3' e *OXDC371* (5'-CGGCAGCAGAATGAGGTC-3') que anelam-se dentro da região codificadora da *OXDC*. Para a reação de PCR das quatro linhagens de plantas transformadas com *OXDC* foi usado uma etapa de 95° C por 5 minutos; 34 ciclos (1minuto a 95° C; 1 minuto a 58° C; 1 minuto 72° C) e uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72° C. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e corados com syber green a fim de se visualizar um fragmento de 502 pb. O gel do material analisado foi capturado e armazenado em sistema de fotodocumentação digital.

3.3 TESTE DE RESISTÊNCIA DAS PLANTAS TRANSGÊNICAS AO ÁCIDO OXÁLICO

Três folhas de plantas transgênicas e controle (não-transformada) de *N. tabacum* cv Xanthi foram testadas quanto à resistência a concentração de 20 mM de ácido oxálico (AO), concentração ótima para teste com AO em plantas de fumo previamente estabelecida por SILVA (2011). A metodologia utilizada foi a descrita por Kesarwani et al. (2000) e consistiu na excisão das folhas, seguida por incubação imediata das folhas em placas de Petri com papel filtro e 2 mL AO (20 mM). O tratamento controle foi constituído da incubação das

folhas da planta não-transformada (controle) em placas de petri com papel filtro e 2 mL água, pH 4. Foram utilizadas 3 folhas de cada planta por tratamento e cada unidade experimental foi constituída por uma folha. Para cada linhagem uma planta foi analisada. Os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento por 72h a 25 °C e 16:8 h (claro:escuro). O ensaio foi fotodocumentado após 24 h e 48 h de exposição ao AO.

3.4 TESTE DE RESISTÊNCIA AO *Fusarium oxysporum* IN VITRO

O fungo utilizado, *Fusarium oxysporum* foi mantido em meio Batata Dextrose Ágar (BDA; batata 200 g/L, dextrose 20 g/L e ágar 15 g/L) em 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 único micélio de aproximadamente 3 mm de comprimento foi colocado no centro de uma nova placa de BDA. A cultura foi incubada a 20° C durante 2 dias no escuro. Micélios com aproximadamente 3 mm de comprimento foram cortados a partir das margens de crescimento e aplicados à superfície adaxial de folhas jovens totalmente expandidas, sendo 3 folhas de cada linhagem transgênica e não transgênica. Cada folha foi colocada em uma placa de Petri contendo duas folhas de papel de filtro umedecidas com água autoclavada e incubadas a 20° C no escuro. As folhas foram fotografadas em três períodos diferenciados (46, 70 e 94 horas).

3.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO TRANSGENE OXDC PELA TÉCNICA DE RT-PCR

O RNA total das folhas de fumo foi extraído utilizando o kit SV total RNA isolation system da Promega®. A síntese do cDNA foi realizada em tubos de microcentrífuga estéreis, utilizando o SuperScript® III First-Strand (Invitrogen™), de acordo com as instruções do manual. Aproximadamente 30 ng do cDNA obtido foi utilizado para detecção da expressão do transgene OXDC, através da amplificação utilizando os oligonucleotídeos OXDC 873 (5'-

TGGGCTCGACAGAGGAGAAG-3' e OXDC371 (5'-CGGCAGCAGAATGAGGTC-3'). Como controle endógeno, foram utilizados oligonucleotídeos referentes à sequência interna do 18S rRNA. (5'GAGCTAATACGTGCAACAAACC-3' e 5' AGGGAATTGCTCCTAGGTAA-3').

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DA PROGÊNIE

Linhagens transgênicas (geração T₀) foram aclimatadas e produziram sementes, geração T₁. A geração T₁ das quatro linhagens transgênicas foram analisadas por PCR quanto à presença do gene *HPTII*. As quatro linhagens T₀ segregaram o transgene para a geração T₁ em proporções mendelianas (Tabela 1). As linhagens analisadas apresentaram proporção de 3:1 entre a presença e ausência no gene *HPTII*, respectivamente.

Tabela 1: Análise da segregação do transgene em 4 linhagens de Fumo

Linhagem T ₀	Geração T ₁ *		Proporção de segregação testada	χ ²
	Positivo	Negativo		
P1	25	5	3:1	1,11
P2	24	6	3:1	0,4
P4	25	5	3:1	1,11
P6	22	8	3:1	0,04

* Dados baseados em avaliação da presença do gene *HPTII* por PCR. X² tabelado: 3,84

4.2 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO TRANSGENE *OXDC* NA GERAÇÃO T₁ DE FUMO TRANSFORMADO

As quatro linhagens avaliadas, P1, P2, P4 e P6, já haviam mostrado a presença do gene *HPTII* e resistência ao fungo *F. oxysporum* na geração T₀ (PINTO, 2012). Devido às linhagens citadas já terem apresentado resultados satisfatórios na T₀, a geração T₁ das mesmas foi avaliada quanto à presença do gene *OXDC*, a fim de utilizar nos testes de resistência plantas positivas para o transgene. O fragmento amplificado pode ser visualizado na figura abaixo (Figura 2).

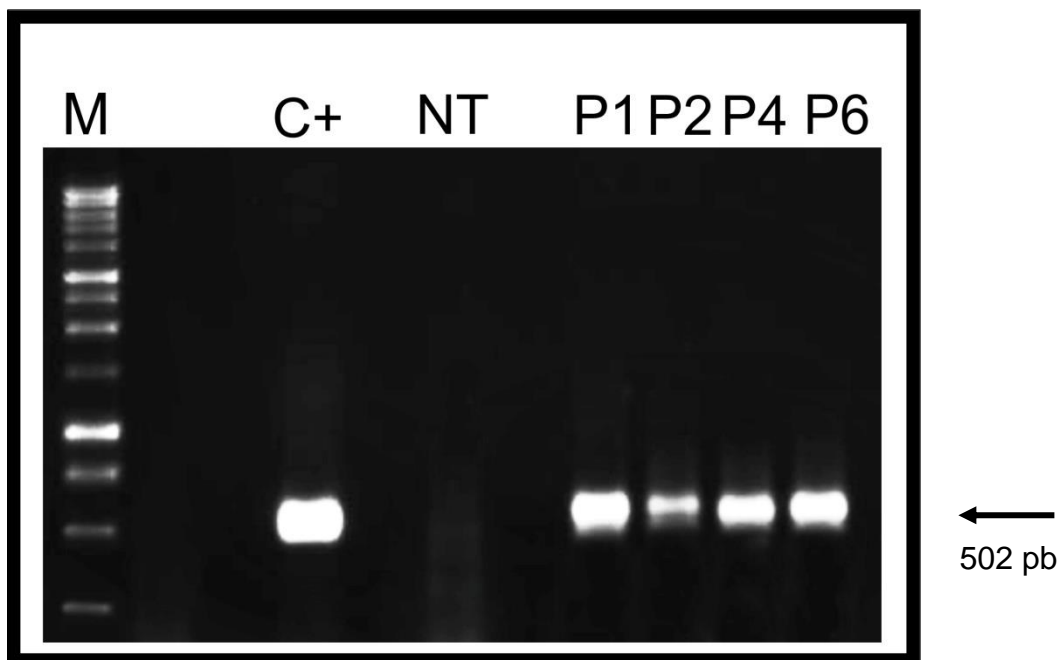


Figura 3: Análise por PCR para detecção do gene. M: marcador de peso molecular 1Kb ladder (Promega®); C-: Reação sem DNA. C+: controle positivo (plasmídeo pCAMBIAOxDc); NT: planta não transgênica; P1, P2, P4 e P6: plantas transgênicas.

4.3 TESTE DE RESISTÊNCIA AO *Fusarium oxysporum* IN VITRO

As quatro linhagens analisadas, P1, P2, P4 e P6, mostraram-se resistentes à infecção pelo fungo (Figura 4 A e 4 B). Nas linhagens P1, P4 e P6, o fungo foi capaz de iniciar seu crescimento, porém não foi capaz de prosseguir com os procesos de infecção, já na planta não transformada o fungo foi capaz de infectar e iniciar o proceso de necrose com 46 h da inoculação (Figura 4 C). Na linhagem P2, o fungo foi capaz de emitir micelio e crescer sobre a superfície adaxial das folhas, porém não foi capaz de causar necrose mesmo após 90 h (Figura 4 D).

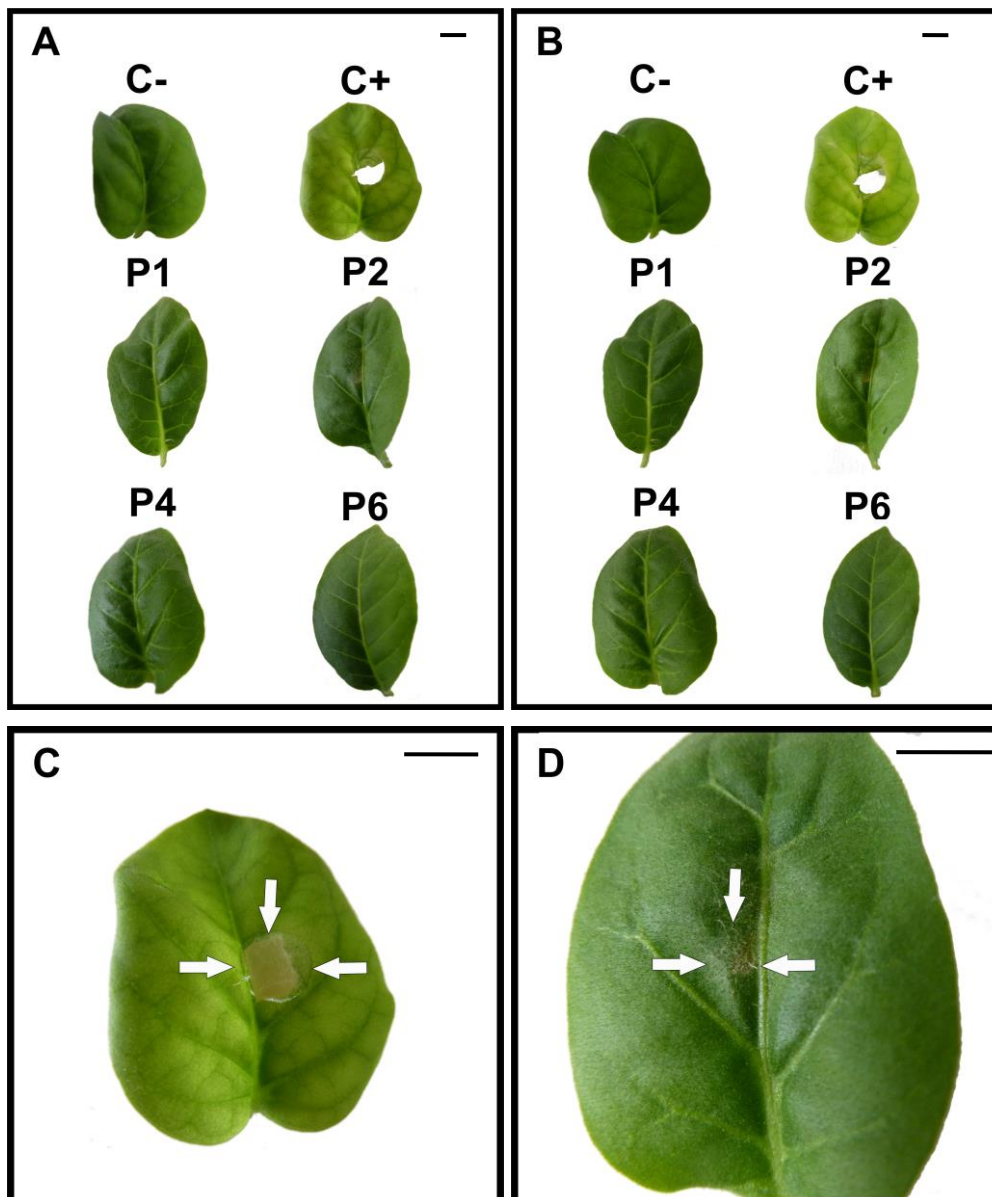


Figura 4: Resistência das plantas transgênicas a inoculação com *Fusarium oxysporum*. C-: planta não transgênica não inoculada. C+: planta não transgênica inoculada com o fungo. P1, P2, P4 e P6: linhagens transgênicas inoculadas com o fungo. A: após 70 h de inoculação. B: Após 94 h de inoculação. C: Planta não transformada infectada após 46 h de inoculação. D: Planta 2 inoculada, fungo crescendo sobre a superfície foliar, porém sendo incapaz de causar necrose (barra = 1cm)

4.4 TESTE DE RESISTÊNCIA DAS PLANTAS TRANSGÊNICAS AO ÁCIDO OXÁLICO

Analisando a resistência das plantas transgênicas ao AO, verificamos que as linhagens transgênicas foram mais resistentes ao estresse oxidativo. A progressão dos sintomas provocados pelo ácido oxálico nas 4 linhagens transgênicas e no tratamento correspondente ao controle positivo, 24 horas

após a exposição, está ilustrado na Figura 4. Pode-se observar, após esse período, o início de lesões necróticas nas folhas das plantas controle e também nas linhagens transgênicas, porém os sintomas foram menos severos nas linhagens transgênicas. A linhagem P2 demonstrou maior suscetibilidade ao estresse causado pelo ácido oxálico (Figura 5).

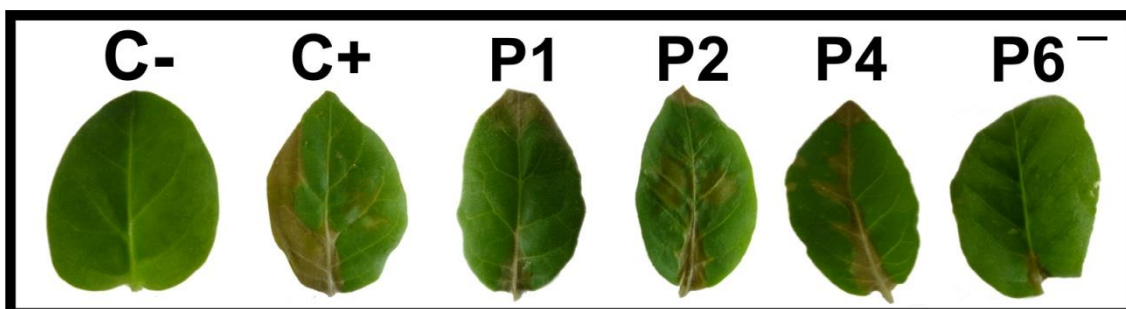


Figura 5: Efeito do ácido oxálico (20 mM) em plantas da geração T_1 de transformadas de tabaco, após 24 h de exposição. C-: planta não transgênica exposta a água, pH 4. C+: planta não transgênica exposta ao AO. P1, P2, P4 e P6: linhagens transgênicas expostas ao AO. (barra = 1cm)

Após 48 h de exposição foi observada de maneira clara a diferença na resposta de resistência entre as linhagens transgênicas P1, P4 e P6 e o controle (Figura 6).

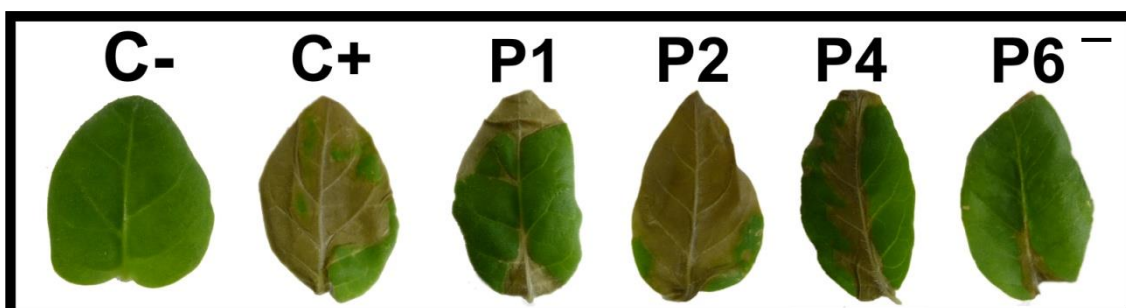


Figura 6: Efeito do ácido oxálico (20 mM) em plantas da geração T_1 transformadas de tabaco, após 48 h de exposição. C-: planta não transgênica exposta a água, pH 4. C+: planta não transgênica exposta ao AO. P1, P2, P4 e P6: linhagens transgênicas expostas ao AO. (barra = 1cm)

As três linhagens apresentaram menor necrose e murchamento. Já a linhagem P2 mostrou-se bastante suscetível ao estresse. Após 48 h de exposição ao ácido oxálico, a linhagem P2 teve comportamento similar ao controle, apresentando folhas necrosadas e completamente murchas (Figura 6).

4.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE *OXDC* PELA TÉCNICA DE RT-PCR

A análise por RT-PCR da presença dos transcritos do gene *OXDC* foi feita nas linhagens P1, P2, P4 e P6. As linhagens P1, P4 e P6 mostraram níveis semelhantes de transcritos, já a P2 mostrou nível de transcritos mais baixos que das outras três linhagens. A planta controle, não transformada, não mostrou transcritos do gene *OXDC*. Todas as plantas, incluindo a não transgênica, mostraram níveis semelhantes de transcritos do gene *18S rRNA* (Figura 7).

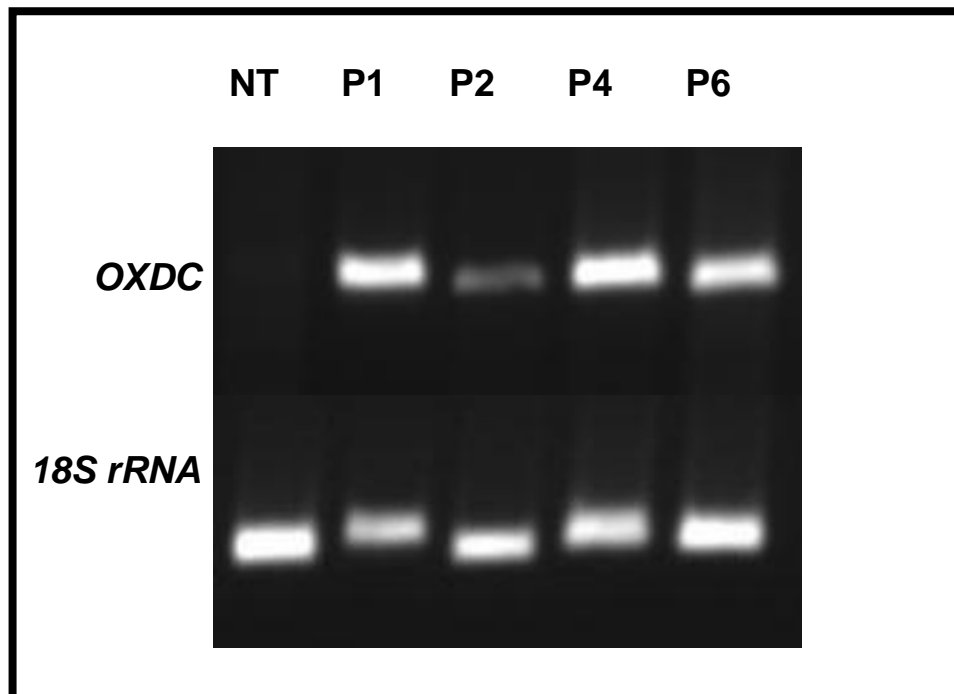


Figura 7: RT-PCR para a detecção da expressão do transgene *OXDC* e do gene endógeno *18S rRNA* nas linhagens transgênicas de fumo.

5. DISCUSSÃO

A progênie (geração T₁) de linhagens transgênicas foi testada para a presença do gene *HPTII*, que é transferido para a planta junto com o gene *OXDC* e confere resistência à higromicina. O teste foi feito analisando-se, por PCR, 30 plantas de cada linhagem.

Foram escolhidas para a análise as linhagens P1, P2, P4 e P6, as quais na T₀ apresentaram maior resistência ao fungo *F. oxysporum* e ao AO (PINTO, 2012). As análises indicaram a integração do transgene em um único *locus*, como indicado pela proporção de segregação mendeliana de 3:1. Dias e colaboradores (2006), desenvolveram linhagens transgênicas de alface com o gene *OXDC* e, analisando a progênie baseando-se na tolerância *in vitro* à higromicina, também encontraram a mesma proporção de segregação.

A transformação de plantas mediada por *Agrobacterium* normalmente produz linhagens com baixo número de cópias e o transgene é transmitido para próxima geração de forma mendeliana (BUDAR et al., 1986; GELVIN, 1998).

As quatro linhagens transgênicas, da geração T₁, utilizadas no teste de resistência *in vitro* contra o fungo *F. oxysporum* já haviam demonstrado resistência a estes patógenos na geração T₀ (PINTO, 2012). No presente trabalho, as linhagens P1, P2, P4 e P6 apresentaram excelentes níveis de resistência ao fungo. Nas linhagens P1, P4, P6 o fungo não foi capaz de crescer sobre a superfície foliar. Já na linhagem P2, o fungo foi capaz de crescer, causando pequena infecção, mas não foi capaz de produzir a necrose característica do progresso da doença.

No trabalho de Pinto (2012) estas quatro linhagens também apresentaram resistência ao fungo *F. oxysporum*, porém na geração T₀ o fungo foi capaz de causar necrose nas folhas, o que não aconteceu no presente trabalho, havendo, portanto, um aumento da resistência na geração T₁ em relação à geração T₀. Mesmo a linhagem P2 que se mostrou menos resistente que as linhagens P1, P4 e P6 na T₁, apresentou melhor resposta à infecção pelo *F. oxysporum* do que na geração T₀.

Em 2006, Dias e colaboradores, observaram que linhagens de alface transformadas com o gene *OXDC* também não apresentaram sintomas quando

inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*, demonstrando que o gene *OXDC* tem grande potencial para ser utilizado como fonte de resistência plantas de interesse comercial.

Plantas de fumo transformadas com arginina descarboxilase também mostraram maior atividade da enzima na geração T_1 em relação à geração T_0 . Em ensaios quantitativos, os autores encontraram aumento de até quatro vezes na atividade enzimática da geração T_1 em relação à T_0 (MASGRAU et al., 1997).

A proporção de segregação do transgene de 3:1 indica que as plantas regeneradas do processo de transformação (T_0) eram heterozigotas. Segundo German e colaboradores (2003), quando uma linhagem na T_1 apresenta proporção do transgene de 3:1 (transgênicas: não transgênicas), tal linhagem na geração T_0 é suposta ser heterozigota, já que se a mesma fosse homozigota para o transgene, todas as suas sementes seriam transgênicas.

Quando a geração T_1 foi analisada observamos a proporção de três plantas transgênicas para uma não transgênica. Supondo-se que esta geração foi originada de plantas heterozigotas, de cada três plantas transgênicas uma delas é homozigota para o transgene.

Os teste de suscetibilidade ao fungo *F. oxysporum* na geração T_1 foi feito utilizando uma planta, PCR positiva para o transgene, de cada linhagem. Somente pela PCR não é possível determinar se a planta é homozigota ou heterozigota para o transgene. Portanto análises futuras serão necessárias para avaliar se as plantas resistentes são homozigotas ou heterozigotas para o transgene.

Levando-se em consideração que a plantas das linhagens P1, P2, P4 e P6 da geração T_1 mostraram-se mais resistentes ao fungo *F. oxysporum* que a geração T_0 , há a hipótese de que as plantas da geração T_1 utilizadas para os ensaios sejam homozigotas, o que aumentaria a quantidade da enzima oxalato descarboxilase, aumentando a resistência à infecção pelo patógeno. A título de exemplo, pode-se citar o estudo feito por Dai e colaboradores (1999), no qual tomateiros foram transformados para superexpressar hexoquinase, uma enzima que fosforila açúcares. Ao comparar o nível de fosforilação dos açúcares de linhagens homozigotas e heterozigotas para o transgene, avaliou-

se que as plantas homozigotas tinham quantidade de açúcar fosforilados duas vezes maior que as plantas heterozigotas.

No ensaio de resistência ao stress causado pelo AO, as linhagens P1, P4 e P6 mostram-se capazes de resistir ao estresse. Mesmo após 48h de exposição ao AO (20 mM), estas linhagens apresentaram, em relação ao controle, menor necrose e murcha, assim como na geração T₀, na qual estas linhagens também mostraram-se resistentes ao AO. Já a linhagem P2, mostrou-se mais suscetível aos danos causados pelo AO. Resultados semelhantes foram observados por Kesarwani et al. (2000) e por Silva et al. (2011) que observaram que as plantas transgênicas tratadas com ácido oxálico foram mais resistentes à murcha e a necrose foliar do que as plantas não transformadas com o gene *OXDC*.

Ao analisarmos os níveis de mRNA transcritos do gene *OXDC*, observamos similaridade nos níveis de expressão na geração T₁ das linhagens P1, P4 e P6 e um menor nível na linhagem P2, sendo este o provável motivo de sua menor resistência ao fungo *F. oxysporum* e ao AO em relação as três outras linhagens.

O sucesso do processo de colonização do hospedeiro por patógenos necrotróficos exige indução da morte celular no hospedeiro a fim de prover nutrientes para a estabilização da doença. Assim o maior determinante da patogenicidade é a capacidade desses patógenos de produzir metabólitos e enzimas capazes de matar as células hospedeiras (VAN KAN, 2006).

O ácido oxálico é conhecido como determinante na patogenicidade de fungos fitopatogênicos necrotróficos (VAN KAN, 2006). Existem alguns mecanismos propostos para explicar como o AO atua no processo de infecção e progressão da doença causada por fungos necrotróficos. Utilizando plantas de soja (FAVARON, SELLA e D'OVIDIO, 2004) mostraram que o AO produzido pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é acumulado nos tecidos da planta e baixa o pH, permitindo que as enzimas de degradação da parede celular possam funcionar. O pH baixo também está envolvido com a regulação de certos genes que promovem a patogenicidade em fungos (ROLLINS e DICKMAN, 2001; CHEN et al., 2004). O AO é capaz de alterar a integridade da parede celular da planta por quelar íons de Ca²⁺ permitindo assim que enzimas hidrolisem componentes da parede celular, especificamente pectinases (BATEMAN e

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

Além do AO, há outras moléculas de fitopatógenos que induzem a morte celular programada. Podemos citar os peptídeos indutores de etileno e necrose (NEP) (PEMBERTON e SALMOND, 2004), que elevam o nível intracelular de Ca^{2+} , aumentando a formação de espécies reativas de oxigênio, a síntese de etileno e de proteínas relacionadas com a patogênese. Fungos transformados com NEP de *F. oxysporum* tiveram sua virulência e a quantidade de hospedeiros aumentados (AMSELLEM et al, 2002) e em *S. sclerotiorum*, com a expressão de NEP diminuída ou totalmente inibida, a capacidade de infectar o hospedeiro foi menor ou nula, respectivamente (BASHI et al, 2010).

A oxalato descarboxilase (OXDC) é capaz de degradar o AO, convertendo-o em dióxido de carbono e formato. A transformação com a OXDC já se mostrou, em outros trabalhos, capaz de conferir à planta resistência a fungos. Linhagens transformadas de alface (DIAS et al, 2006), soja (CUNHA et al, 2010), tomate e tabaco (KESARWANI et al, 2010) mostraram-se resistentes ao fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.

Além disso, a degradação do AO pela OXDC possui a vantagem de não produzir peróxido de hidrogênio como subproduto, suprimindo os efeitos negativos provocados pela explosão oxidativa. Devido a estes fatores plantas transgênicas contendo o gene *OXDC* podem ser consideradas de alto potencial agrícola, uma vez que apresentam resistência a fitopatógenos que provocam grande impacto na produção vegetal, como o *F. oxysporum*.

Tanto o AO quanto NEP são indutores da morte celular programada, que envolve espécies reativas de oxigênio e o oxalato pode ser uma potencial fonte de espécies reativas de oxigênio. Silva e colaboradores (2011)

demonstraram que a degradação do AO pela OXDC pode inibir o processo de infecção por fungos que utilizem tanto o AO quanto NEP como recurso de instalação da doença (DIAS et al., 2006; CUNHA et al., 2010), outros trabalhos já haviam demonstrado a inibição dos efeitos prejudiciais do AO. Desta forma o gene da oxalato descarboxilase mostrou-se eficiente em garantir resistência a fungos necrotróficos que utilizem tanto AO quanto NEP como elicitores de morte programada e consequente inibição do progresso de instalação da doença.

6 CONCLUSÃO

A partir da transformação de fumo com o gene que codifica a enzima oxalato descarboxilase foram obtidas quatro linhagens T₁ de plantas resistentes ao fungo *Fusarium oxysporum* e ao AO, um importante determinante na patogenicidade de fungos necrotróficos. Esses resultados mostram que a expressão do gene da oxalato descarboxilase é eficiente em gerar resistência ao *Fusarium oxysporum*, sendo um importante candidato à transformação de outras plantas suscetíveis a este fungo, como algodão, banana, café, morango, cana de açúcar.

7 REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. 2005 Plant Pathology. 5th ed. Amsterdam: **Elsevier Academic**, 522.
- AHMAD, M. Z.; HUSSAIN, I.; MUHAMMAD, A.; ALI, S.; ALI, M. G.; ROOMI, S.; ZIA, A. M.; IJAZ, A. 2012. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of rice chitinase gene in *Solanum tuberosum* L. **African Journal of Biotechnology**, **11**: 9716-9723.
- AMSELLEM, Z.; COHEN, B. A.; GRESSEL, J. 2002. Engineering hypovirulence in a mycoherbicide fungus for efficient weed control. **Nature Biotechnology**, **20**:1035-1039.
- ANDERSON, P. K.; CUNNINGHAM, A. A.; PATEL, N. G.; MORALES, F. J.; EPSTEIN, P. R.; DASZAK, P. 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, **19**: 535-544.
- 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.
- BROWN, D. W.; PROCTOR, R. H. (2013). *Fusarium: Genomics, Molecular and Cellular Biology*. **Horizon Scientific Press**: 36p.
- BROWN, J. K. M.; HOVMOLLER, M. S. 2002. Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. **Science**, **297**: 537-541.
- BUDAR, F.; THIA-TOONG, L.; VAN MONTAGU, M.; HERNALSTEENS, J.P. 1986. *Agrobacterium*-mediated gene transfer results mainly in transgenic plants transmitting T-DNA as a single Mendelian factor. **Genetics**, **114**: 303-313.
- 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**(4): 654-660.

DALLAL BASHI, Z. A. F. E. R.; HEGEDUS, D. D.; BUCHWALDT, L.; RIMMER, S. R.; BORHAN, M. H. 2010. Expression and regulation of *Sclerotinia sclerotiorum* necrosis and ethylene-inducing peptides (NEPs). **Molecular plant Pathology**, **11**: 43-53.

DAI, N.; SCHAFFER, A.; PETREIKOV, M.; SHAHAK, Y.; GILLER, Y.; RATNER, K.; GRANOT, D. 1999. Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. **The Plant Cell**, **11**: 1253-1266.

DIAS, B. B. A.; CUNHA, W. G.; MORAIS, L. S.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L.; CAPDEVILLE, G. D.; 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.

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.

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.

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.

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.

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.

FISHER, M. C.; HENK, D. A.; BRIGGS, C. J.; BROWNSTEIN, J. S.; MADOFF, L. C.; McCraw, S. L.; GURR, S. J. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, **484**: 186-194.

GAUDIN, V.; VRAIN, T.; JOUANIN, L., 1994. Bacterial genes modifying hormonal balances in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, **32**: 11-29.

GELVIN, S. B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **67**: 16-37.

GERMAN, M. A.; KANDEL-KFIR, M.; SWARZBERG, D.; MATSEVITZ, T.; GRANOT, D. 2003. A rapid method for the analysis of zygosity in transgenic plants. **Plant Science**, **164**: 183-187

GODDIJN, O. J.; PEN, J. 1995. Plants as bioreactors. **Trends in Biotechnology**, **13**: 379-387.

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**: 179-191.

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

GUO, X.; STOTZ, H. U. 2007. Defense against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis* is dependent on jasmonic acid, salicylic acid, and ethylene signaling. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **20(11)**: 1384-1395.

GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; UPADHYAYA, C. P.; NOOKARAJU, A.; PANDEY, S. K.; PARK, S. W. 2012. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, **78**: 51-65.

HOSHIKAWA, K.; ISHIHARA, G.; TAKAHASHI, H.; NAKAMURA, I. 2012. Enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*) in transgenic potato plants expressing thionin genes isolated from Brassicaceae species. **Plant Biotechnology**, **29**: 87-93.

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.

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(5)**: 605-612.

KUNIK, T.; TZFIRA, T.; KAPULNIK, Y.; GAFNI, Y.; DINGWALL, C.; CITOVSKY, V. 2001. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **98(4)**:1871-1876.

LACROIX, B.; TZFIRA, T.; VAINSTEIN, A.; CITOVSKY, V. 2006. A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. **Trends in Genetics**, **22**: 29-37.

MACE, M. E.; BELL, A. A.; BECKMAN, C. H. 1981. Fungal wilt diseases of plants. **Academic Press**. 379p.

MASGRAU, C.; ALTABELLA, T.; FARRÁS, R.; FLORES, D.; THOMPSON, A. J.; BESFORD, R. T.; TIBURCIO, A. F. 1997. Inducible overexpression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants. **The Plant Journal**, **11**: 465-473.

MASON, H. S.; ARNTZEN, C. J. 1995. Transgenic plants as vaccine production systems. **Trends in Biotechnology**, **13**: 388-392.

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

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

OKAMURA, K. I.; MATSUDA, Y.; IGARI, K.; KATO, K.; ASAO, H.; MATSUI, T.; TAKIKA, E.; SAWADA, K.; FUKUDA, K.; MURASE, H. (2014). Effects of Plant Cultivation Density and Light Intensity on the Production of a Vaccine Against Swine Edema Disease in Transgenic Lettuce. *Environmental Control in Biology*, **51**(4), 207-213.

OLTMANN, H.; FRAME, B.; LEE, L.Y.; JOHNSON, S.; LI, B.; WANG, K.; GELVIN, S. B. 2010. Generation of backbone-free, low transgene copy plants by launching T-DNA from the *Agrobacterium* chromosome. **Plant Physiology**, **152**:1158– 1166.

OU, J.; GUO, Z.; SHI, J.; WANG, X.; LIU, J.; SHI, B.; YANG, D. 2014. Transgenic rice endosperm as a bioreactor for molecular pharming. **Plant cell reports**: 1-10.

PEMBERTON, C. L.; SALMOND, G. P. 2004. The Nep1-like proteins—a growing family of microbial elicitors of plant necrosis. **Molecular Plant Pathology**, **5**: 353-359.

PINTO, N. A. 2012. Expressão do gene *OxDc* de *Flammulina velutipes* em plantas de tabaco para resistência ao fungo *Fusarium oxysporum*. Dissertação de mestrado. **Universidade Federal de Juiz de Fora**, Juiz de Fora, Brasil. 138p.

PLOETZ, R C. Panama disease, an old nemesis rears its ugly head: part 1, the beginnings of the banana export trades. 2005. **Plant Health Progress**: **10**, 1094.

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.

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. 2011. Expression of an oxalate decarboxylase impairs the

necrotic effect induced by Nep1-like protein (NLP) of *Moniliophthora perniciosa* in transgenic tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **24**: 839-848.

SMITH, C. M.; FRY, S. C.; GOUGH, K. C.; PATEL, A. J.; GLENN, S.; GOLDRICK, M.; ROBERTS, I. S.; WHITELAM, G. C.; ANDREW, P. W. 2014. Recombinant Plants Provide a New Approach to the Production of Bacterial Polysaccharide for Vaccines. **PLoS one**, **9**: e88144.

SVEDRUŽIĆ, D.; JÓNSSON, S.; TOYOTA, C. G.; REINHARDT, L. A.; RICAGNO, S.; LINDQVIST, Y.; RICHARDS, N. G. 2005. The enzymes of oxalate metabolism: unexpected structures and mechanisms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **433**: 176-192.

TZFIRA, T.; CITOVSKY, V. 2006. *Agrobacterium* -mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, **17**: 147-154.

URANBEY, S.; SEVIMAY, C. S.; KAYA, M. D.; IPEK, A.; SANCAK, C.; BAŞALMA, D.; ÖZCAN, S. 2005. Influence of different co-cultivation temperatures, periods and media on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. **Biologia Plantarum**, **49**: 53-57.

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

WILLIAMS, B.; KABBAGE, M.; KIM, H. J.; BRITT, R.; DICKMAN, M. B. 2011. Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. **PLoS pathogens**, **7**: e1002107.

WOJTASZEK, P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochemistry Journal**, **322**: 681-692.