



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

EMMANUEL DE SOUSA JEREISSATI

**Transformação genética de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e
tabaco (*Nicotiana tabacum*) com uma quitinase de classe I**

FORTALEZA-CE

2012

EMMANUEL DE SOUSA JEREISSATI

**Transformação genética de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e
tabaco (*Nicotiana tabacum*) com uma quitinase de classe I**

Tese Submetida à Coordenação do Curso de Pós-
Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau
de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra.: Cristina Paiva da Silveira
Carvalho

FORTALEZA-CE

2012

EMMANUEL DE SOUSA JEREISSATI

**Transformação genética de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e
tabaco (*Nicotiana tabacum*) com uma quitinase de classe I**

Tese Submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica. A transcrição de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Tese Aprovada em: ____/____/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro (Conselheiro)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Maria Erivalda Farias de Aragão (Conselheiro)
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. José Hélio Costa (Conselheiro)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha (Conselheiro)
Universidade Estadual Vale do Acaraú

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

J54t

Jereissati, Emmanuel de Sousa.

Transformação genética de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e tabaco (*Nicotiana tabacum*) com uma quitinase de classe I / Emmanuel de Sousa Jereissati – 2012.

120 f. : il., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Bioquímica.

Orientação: Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho.

Co-orientação: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro.

1. Quitina. 2. Silenciamento genético. 3. Apoplasto. I. Título.

CDD 574-192

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu Amor e a minha família.

A professora Cristina Paiva pela orientação deste trabalho e pela paciência e esforço feito para minha formação.

Ao professor Thalles Barbosa Grangeiro pela idealização e orientação deste trabalho, e pelas dicas valiosas.

Ao professor Francisco José Lima Aragão por me receber em seu laboratório e pela orientação e motivação sou muito grato.

Aos professores José Hélio Costa, Rodrigo Maranguape Silva da Cunha, Maria Erivalda Farias de Aragão por prontamente aceitarem o convite de serem membros da banca examinadora e pelas sugestões importantes.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao CNPq, FUNCAP e FCPC, por financiarem este trabalho.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por permitir a realização de parte deste trabalho em Brasília-DF.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Gabriela, Ítalo, Rosa, Stéfanie, Júnior e em especial ao amigo Edvar.

Aos Amigos do Laboratório de Citogenética e Genética Molecular, Cícero, Denise, Juliana, Marcel, Marina, Patrícia, Rafael, Suelen, Takase e em especial à Sandra que realizou parte deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Transferência de Genes, Abdul, Aisy, Aline, Ana Zotta, André, Bruno Caucaia, Carol, Cristiana, Cristiane, Cristiano, Cristina, Daniel, Emanuel, Giovanni, Heitor, Helen, Juliane, Lívia, Luís, Maria Laine, Mayara, Mirela, Natália, Nayhanne, Nicolau, Pedro, Roberto, Sérgio, Taina, Thaís, Rebeca e em especial às amigas Elsa e Andréa que me deram treinamento em algumas técnicas deste trabalho.

Aos Funcionários e Professores do DBBM.

A todos que de algum modo contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

A expressão heteróloga de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) representa uma alternativa promissora para o desenvolvimento de plantas resistentes ao ataque de fungos. Dentre as PR-proteínas com grande potencial biotecnológico, estão as quitinases, hidrolases que catalisam a degradação da quitina, que é um polímero constituinte da parede celular de muitas espécies de fungos fitopatogênicos. Além da função relacionada aos mecanismos de defesa, acredita-se que essas enzimas podem desempenhar outros papéis, como a regulação de processos de crescimento e desenvolvimento em plantas. O objetivo deste trabalho foi estudar o papel de uma quitinase de classe I de feijão-caupi (*VuChiI*) na defesa e no desenvolvimento vegetal e para isso duas abordagens foram conduzidas. A primeira consistiu no silenciamento do gene que codifica esta proteína em plantas de feijão-caupi. Nos experimentos de silenciamento gênico foram utilizados meristemas apicais de plântulas de feijão-caupi, que foram então bombardeados com micropartículas portando um vetor de silenciamento (pKANNIBAL), onde foi clonada uma construção em grampo (*intron harpin*) do gene de *VuChiI*. As plantas regeneradas em meio de cultura de Murashige e Skoog (MS) contendo o herbicida *imazapyr*, como agente de seleção, foram analisadas por PCR, o que resultou na confirmação da transformação genética de cinco plantas, a partir de 1.092 meristemas apicais bombardeados. O RNA foi extraído das plantas transformadas e utilizado em análises de *Northern blot* que possibilitou a detecção de siRNAs no RNA total extraído das plantas putativamente transgênicas. Apenas uma das plantas transformadas produziu uma vagem contendo seis sementes, das quais apenas uma germinou. As plantas transformadas apresentaram ciclo de vida de mais de 365 dias enquanto que o esperado é de 65-70 dias. Com base nos resultados sugere-se que o silenciamento da quitinase de classe I de feijão-caupi pode ter promovido alteração no desenvolvimento da planta. A segunda estratégia de transformação genética consistiu no co-cultivo de discos foliares de tabaco com suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* LB4404, com o intuito de expressar a proteína recombinante no espaço extracelular das plantas regeneradas. Essa estratégia tem como objetivo fazer com que a proteína entre em contato com o fungo antes mesmo que este agente patogênico penetre na célula vegetal. Para tanto, o inserto referente à quitinase de feijão-caupi foi clonado no vetor binário pCAMBIA1305.2 sob controle do promotor CaMV35S e fundido ao peptídeo sinal GRP (*glycine-rich protein* de *Oryza sativa*), que permite a secreção da proteína recombinante via apoplasto. Foram produzidas três linhagens de plantas que tiveram a transformação genética confirmada por PCR. As sementes obtidas

das plantas transformadas, geração R1, foram semeadas em meio seletivo para a análise da transmissão do transgene. O teste de X^2 indicou que o transgene foi transmitido para a progênie em proporções Mendelianas. Os modelos experimentais desenvolvidos neste trabalho poderão contribuir para a elucidação dos papéis biológicos da quitinase de classe I de feijão-caupi.

Palavras-chave: quitina, silenciamento gênico, apoplasto.

ABSTRACT

Heterologous expression of genes encoding pathogenesis related proteins (PR-proteins) represents a promising alternative for the development of plants resistant to fungi. Among the PR-proteins with great biotechnological potentials are the chitinases, a class of hydrolases which catalyze the degradation of chitin, a polymer constituent of cell wall of several species of pathogenic fungi. Besides their function related to defense mechanisms, it is believed that these enzymes may play other roles, such as regulation of growth and development processes in plants. Using two approaches, this study sought to investigate the role of a class I chitinase of cowpea (*VuChiI*) in defense and plant development. The first approach consisted of silencing of the gene encoding for *VuChiI* in cowpea. Apical meristems excised from cowpea seeds were bombarded with microparticles containing a silencing vector (pKANNIBAL), which was cloned with a construct harboring an intron harpin of the gene *VuChiI*. Plants regenerated in a Murashige and Skoog (MS) media containing imazapyr as a selection agent, were analyzed by PCR, resulting in confirmation of genetic transformation of five plants from the 1092 apical meristems bombarded. Northern blot analysis of total RNA extracted from the putative transgenic plants allowed for the detection of siRNAs. Upon regeneration and germination, only one of the five transformed plants produced a pod containing six seeds. Of these, only one germinated when further planted. The transformed plants exhibited a life cycle of over 365 days, as against the normal cycle of 65-70 days. Based on these results we posit that silencing of class I cowpea chitinase may have led to changes in plant development. The second strategy consisted of co-cultivation of tobacco leaf discs with *Agrobacterium tumefaciens* strain LB4404 suspension to express recombinant protein in the extracellular space of the regenerated plants in order to expose the protein fungus even before its penetration into the plant cell. To achieve this, a sequence of cowpea chitinase insert was cloned into the binary vector pCAMBIA1305.2 under the control of CaMV35S promoter and signal peptide fused to glycine-rich protein of *Oryza sativa* (GRP), which allowed the secretion of recombinant protein via apoplast. This led to the generation of three strains as confirmed by PCR. Seeds obtained from transformed R1 generation of the plants were germinated and analyzed for transmission of the transgene using X^2 test, which confirmed its transmission to the progeny in a Mendelian fashion. The experimental models developed in this work may serve to further assess the biological roles of class I chitinase from cowpea.

Keywords: chitin; gene silencing; apoplast.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1	- Mapa circular do vetor pGEM-T Easy.....	43
Figura 2	- Esquema de construção do cassete de silenciamento e mapa circular do vetor pKANNIBAL.....	48
Figura 3	- Mapa circular do vetor pAC321.....	50
Figura 4	- Alinhamento das seqüências dos clones de silenciamento com a seqüência do molde, o clone R7.....	56
Figura 5	- Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de digestão de pKANNIBALVuChiIS (1ª subclonagem) com as enzimas <i>XbaI</i> e <i>HindIII</i> ..	57
Figura 6	- Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de digestão de pKANNIBALVuChiIS (2ª subclonagem) com as enzimas <i>XhoI</i> e <i>KpnI</i>	58
Figura 7	- Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de digestão de pKANNIBAL::QUIT K3 (2ª subclonagem) com a enzima <i>XbaI</i>	60
Figura 8	- Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de digestão de pAC321::QUIT K3 com a enzima <i>Not I</i>	61
Figura 9	- Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de digestão do clone 4 de pAC321::VuChiIS com a endonuclease <i>XbaI</i>	62
Figura 10	- Plântula de feijão-caupi transformada geneticamente via bombardeamento de micropartículas e regenerada em meio de seleção MS adicionado de sacarose 3%, Agar 0,7%, BAP 10 mg/L e <i>imazapyr</i> 200 nM	64
Figura 11	- a) Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de amplificação do DNA genômico extraído das plantas de feijão-caupi regeneradas em meio seletivo utilizando os iniciadores CAMV35SF e Qui <i>HindKpn</i> . b) Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de amplificação do DNA genômico extraído das plantas de feijão-caupi regeneradas em meio seletivo utilizando os iniciadores AHASP124 e AHAS500C.....	65
Figura 12	- Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de amplificação do DNA genômico extraído das plantas de feijão-caupi regeneradas em meio seletivo utilizando os iniciadores CAMV35SF e Qui <i>HindKpn</i> . b) Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de amplificação do DNA	

genômico extraído das plantas de feijão-caupi regeneradas em meio seletivo utilizando os iniciadores AHASP124 e AHAS500C.....	66
Figura 13 - Plantas de feijão-caupi em casa de vegetação.....	70
Figura 14 - Análise de <i>Northern blot</i>	71

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Mapa circular do vetor binário pCAMBIA 1305.2.....	95
Figura 2 - Reação de amplificação de <i>VuChiI</i> (894 pb, destacada no retângulo) em pGEM T-Easy com os primers <i>QuiBg/III</i> e <i>QuiBstEII</i>	99
Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% da digestão dos clones de pGEM-T Easy:: <i>VuChiI</i> com <i>Bg/III</i> e <i>BstEII</i>	100
Figura 4 - Alinhamento da sequência do clone S1 com a sequência do molde, o clone R7.....	101
Figura 5 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos codificadas pelos clones S1 e R7.....	102
Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 0,6% da digestão do plasmídeo pCAMBIA 1305.2:: <i>VuChiI</i> com as enzimas <i>Bg/III</i> e <i>BstEII</i>	104
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% de pCAMBIA1305.2:: <i>VuChiI</i> amplificado com os iniciadores específicos <i>Qui/Bg/III</i> e <i>Qui/BsteII</i>	105
Figura 8 - Regeneração de tabaco em meio seletivo.....	107
Figura 9 - Reação de PCR utilizando como molde o DNA gênomico extraído de plantas de tabaco regeneradas em meio de seleção.....	109
Figura 10 - Plantulas de tabaco da geração R1 (Linhagem T4A3) germinadas em meio MS basal e acrescido de higromicina.....	111
Figura 11 - Atividade do extrato protéico total das linhagens transformadas e do controle negativo de tabaco.....	113

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO 1

Quadro 1 - Famílias de proteínas relacionadas à patogênese.....	19
---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Porcentagem de germinação das sementes da geração R1 em meio MS basal e em meio MS suplementado com higromicina (MSH).....	112
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - *Adenosine Triphosphate*
BAP - 6-Benzilaminopurina
BSA - *Bovine Serum Albumin*
CaMV- *Cauliflower mosaic virus*
cDNA - DNA complementar
CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamônio
cv. - Cultivar, variedade cultivada
DNA - Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs - *Deoxynucleotide Triphosphates*
dsRNA - *double strand RNA*
f. sp. - *formae speciales*
FAO - *Food and Agriculture Organization*
FAOSTAT - Divisão de estatísticas da FAO
GRP - *Glycine Rich Protein*
GUS - *beta-glucuronidase*
ihprna - *intron hairpin RNA*
IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
MAPK - *Mitogen-Activated Protein Kinase*
mRNA - RNA mensageiro
nptII - *neomycin phosphotransferase*
OCS - *octopine synthase*
pAC321 - Vetor de Bombardeamento
pCAMBIA 1305.2 - Vetor binário utilizado para expressão extracelular de *VuChiI*
PCR - *Polimerase Chain Reaction*
pdk - *pyruvate orthophosphate dikinase*
pGEM-T Easy - Vetor de Clonagem e Sequenciamento
pKANNIBAL - Vetor de Silenciamento
proteínas PR - Proteínas relacionadas à patogênese
PTGS - *Post-transcriptional gene silencing*
RT-PCR - *Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction*
SAR - *Systemic acquired resistance*
siRNA - *small interfering RNA*

T4A3, T4B6 e T4D1 - Linhagens de tabaco transformadas com *VuChiI*

VuChiI - Quitinase de classe I de feijão-caupi

VuChiIS - Fragmento de Silenciamento de *VuChiI*

X-GAL - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- beta-D-galactopiranosideo

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	16
1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	Proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas PR)	18
2.2	Quitinases	20
2.2.1	<i>Quitinases de plantas</i>	21
2.2.2	<i>Transformação genética de plantas com genes de quitinases</i>	22
	REFERÊNCIAS	25
	CAPÍTULO 2	28
1	INTRODUÇÃO	28
1.1	Problemas relacionados à cultura do feijão-caupi e mecanismos de defesa	29
1.2	Transformação genética de feijão-caupi	32
1.3	Silenciamento gênico	35
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivo Geral	37
2.2	Objetivos específicos	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	Materiais	38
3.1.1	<i>Sementes</i>	38
3.1.2	<i>Bactérias</i>	38
3.1.3	<i>Enzimas</i>	38
3.1.4	<i>Plasmídios</i>	38
3.1.5	<i>Outros reagentes e materiais</i>	39
3.2	Métodos	39
3.2.1	<i>Extração do DNA genômico de folhas de feijão-caupi</i>	39
3.2.2	<i>Desenho dos Iniciadores</i>	40
3.2.3	<i>Amplificação do fragmento gênico de VuChiIS</i>	41
3.2.4	<i>Purificação do produto de PCR</i>	41
3.2.5	<i>Ligação em pGEM-T Easy e eletroporação em E. coli</i>	42
3.2.6	<i>Extração de Plasmídios</i>	44
3.2.7	<i>Sequenciamento dos clones transformados</i>	46

3.2.8	<i>Construção dos vetores de silenciamento e bombardeamento</i>	46
3.2.9	<i>Preparação do vetor de bombardeamento pAC321::VuChiIS</i>	49
3.2.10	<i>Transformação genética e regeneração de feijão-caupi</i>	51
3.2.11	<i>Triagem das plantas transgênicas por PCR</i>	53
3.2.12	<i>Análise por Northern blot</i>	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	Construção do vetor de bombardeamento	55
4.2	Bombardeamento e regeneração <i>in vitro</i>	63
5	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	74
	CAPÍTULO 3	82
1	INTRODUÇÃO	82
1.1	Transformação de plantas de tabaco com genes de quitinases	82
1.2	Expressão extracelular de proteínas de defesa	85
2	OBJETIVOS	88
2.1	Objetivo Geral	88
2.2	Objetivos específicos	88
3	MATERIAL E MÉTODOS	89
3.1	Material	89
3.1.1	<i>Plantas</i>	89
3.1.2	<i>Bactérias</i>	89
3.1.3	<i>Enzimas</i>	89
3.1.4	<i>Plasmídeos</i>	89
3.1.5	<i>Reagentes e outros materiais</i>	89
3.2	Métodos	90
3.2.1	<i>Extração do DNA genômico de folhas de feijão-caupi</i>	90
3.2.2	<i>Desenho dos Iniciadores</i>	90
3.2.3	<i>Amplificação do fragmento gênico de VuChiI</i>	90
3.2.4	<i>Purificação do produto de PCR</i>	91
3.2.5	<i>Ligação em pGEM-T Easy e eletroporação em E. coli</i>	91
3.2.6	<i>Extração do DNA plasmidial</i>	92
3.2.7	<i>Sequenciamento dos clones produzidos</i>	92
3.2.8	<i>Clonagem do inserto no vetor de expressão extracelular</i>	93
3.2.9	<i>Transformação de tabaco (Nicotiana tabacum var. Xanthi) via agroinfecção</i>	94

3.2.10	<i>Análise dos transformantes primários por PCR</i>	96
3.2.11	<i>Obtenção das gerações de plantas de tabaco contendo o inserto VuChiI</i>	96
3.2.12	<i>Extração de proteínas dos tecidos vegetais</i>	96
3.2.13	<i>Atividade quitinásica</i>	97
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
4.1	Construção do vetor recombinante binário pCAMBIA 1305.2::VuChiI	98
4.2	Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404 com o inserto de VuChiI	103
4.3	Transformação de plantas de tabaco com o inserto VuChiI	106
5	CONCLUSÃO	115
	REFERÊNCIAS	116

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios da agricultura mundial está na proteção das plantas ao ataque de fitopatógenos, sendo as doenças causadas por fungos umas das mais preocupantes (SINGH *et al.*, 2007). Diversas estratégias têm sido empregadas na tentativa de reduzir as grandes perdas causadas pelo ataque de fungos e dentre as técnicas mais tradicionais estão: o uso de compostos químicos, rotação de culturas e o uso de cultivares resistentes (FIOCCHETTI *et al.*, 2008, DI MARO *et al.*, 2010). Em contrapartida o melhoramento genético de plantas tem se apresentado como uma das estratégias para o alcance da sustentabilidade na agricultura. Além dos métodos clássicos de melhoramento vegetal, a tecnologia do DNA recombinante tem contribuído para solucionar problemas agrícolas. Segundo Valois (2001), as vantagens dos transgênicos incluem: aumento da produção e produtividade com redução de custos; redução do uso de agrotóxicos; maior velocidade na geração de novos cultivares; melhores condições para vencer impedimentos de ordem biótica e abiótica; facilidade na exploração de condições ecológicas adversas pelo direcionamento da criação de novos genótipos adaptados, dentre outras.

Em adição aos fatores supracitados, a engenharia genética de plantas representa, atualmente, uma importante alternativa para investigação da função de genes de diversas origens e tem se apresentado como uma ferramenta para o controle de pragas e doenças com o desenvolvimento de variedades resistentes a insetos, fungos, vírus, bactérias e nematóides (BHAT E SRINIVASAN, 2002). Entretanto, apesar dos enormes investimentos no desenvolvimento de organismos geneticamente modificados, poucas variedades resistentes a fungos estão disponíveis no mercado. Entre as plantas transgênicas cultivadas, as tolerantes a herbicidas são as mais produzidas, seguidas das variedades resistentes a insetos, transformadas com genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* (COLLINGE *et al.*, 2008).

Os estudos de mecanismos de defesa de plantas permitiram a identificação de diversas proteínas, peptídeos e alguns metabólitos secundários que possuem atividades antimicrobianas. As proteínas PR ou proteínas relacionadas à patogênese são expressas em condições basais nos tecidos saudáveis e que se acumulam quando as plantas são desafiadas por algum patógeno, sugerindo um papel na defesa de plantas (FERREIRA *et al.*, 2007, SELS *et al.*, 2008).

A biossíntese e acúmulo das proteínas PR são considerados os principais mecanismos de defesa contra fungos fitopatogênicos, essas propriedades podem ser observadas tanto *in vitro*, como também, sendo induzidas *in vivo* em um grande número de plantas (FERREIRA *et al.*, 2007). A expressão heteróloga de genes que codificam para proteínas PR representa uma alternativa bastante promissora para o desenvolvimento de plantas resistentes ao ataque de fungos (COLLINGE *et al.*, 2008, SINGH *et al.*, 2007). Dentre as PR-proteínas com atividade anti-fúngica, as quitinases apresentam grande potencial biotecnológico no controle de pragas e doenças, uma que vez que consistem em hidrolases que degradam quitina presente na parede celular de fungos e no exoesqueleto de insetos.

Este trabalho foi desenvolvido com o intuito de estudar a função de uma quitinase de classe I de feijão-caupi (*VuChiI*). Para isso foram utilizadas dois tipos de abordagens. A primeira abordagem teve por objetivo silenciar o gene *VuChiI* em plantas de feijão-caupi como estratégia para avaliar a função desta enzima na planta. A segunda abordagem consistiu na expressão do gene de *VuChiI* em plantas de tabaco utilizando uma construção gênica sob o controle de um promotor constitutivo (2x CaMV35S) e fundida à sequência de um peptídeo sinal GRP (*Glycine-Rich Protein*) que assegura a secreção da proteína recombinante para o espaço extracelular.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas PR)

As proteínas PR incluem diferentes grupos de proteínas não relacionadas estrutural e funcionalmente, apresentando diferentes atividades biológicas. Elas foram descritas inicialmente como consequência do ataque de patógenos e estresses abióticos, mas posteriormente sua indução foi relacionada com a injúria, elicitores da parede celular de fungos, etileno, ácido salicílico, luz UV e metais pesados. As proteínas PR também são expressas constitutivamente em determinados estágios do desenvolvimento. A indução de proteínas PR durante a resposta hipersensitiva e SAR (*Systemic Acquired Resistance*) indicam um papel na defesa natural das plantas para protegê-las da infecção por patógenos. As proteínas PR foram classificadas em 17 famílias baseada na sua estrutura primária, relações sorológicas e atividade biológica (KASPRZEWSKA, 2003, VAN LOON *et al.*, 2006, FERREIRA *et al.*, 2007). As características das diferentes famílias estão sumarizadas no Quadro 1.

Quadro 1: Famílias de proteínas relacionadas à patogênese

FAMÍLIA	MEMBRO TÍPICO	PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS	MASSA MOLECULAR (kDa)
PR-1	Tabaco PR-1a	Desconhecida	15-17
PR-2	Tabaco PR-2	β -1,3-glucanase	30-41
PR-3	Tabaco P, Q	Quitinase de classe I, II, IV, VI, VII	35-46
PR-4	Tabaco R	Endoquitinase	13-14
PR-5	Tabaco S	Proteína semelhante a taumatina	16-26
PR-6	Tomate inibidor I	Inibidor de proteinase	8-22
PR-7	Tomate P ₆₉	Endoproteinase	69
PR-8	Quitinase de Pepino	Quitinase de classe III	30-35
PR-9	Peroxidase formadora de lignina de Tabaco	Peroxidase (POC)	50-70
PR-10	Salsa PR-1	Semelhante a ribonuclease	18-19
PR-11	Quitinase classe V de Tabaco	Quitinase classe V	40
PR-12	Rabanete Rs-AFP3	Defensina	5
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI-2.1	Tionina	5-7
PR-14	Cevada LTP4	Proteína transferidora de lipídios	9
PR-15	Cevada OxOa	Oxidase do oxalato	22-25
PR-16	Cevada OxOLP	Semelhante a oxidase do oxalato	100 (hexâmero)
PR-17	Tabaco PRp27	Desconhecida	Desconhecida

Fonte: Adaptado de Kasprzewska, 2003, Van Loon *et al.*, 2006 e Ferreira *et al.*, 2007

Uma das estratégias usadas para aumentar a resistência a doenças em culturas agrícolas economicamente importantes consiste no aumento da expressão de proteínas PR. Dentro deste grupo de proteínas, as quitinases são consideradas uma classe importante de enzimas, sendo promissoras para a obtenção de plantas com níveis elevados de resistência a doenças causadas por fungos.

2.2 Quitinases

As quitinases são enzimas hidrolíticas produzidas por uma grande variedade de organismos que possuem especificidade por quitina, sendo altamente seletivas e não-tóxicas para vertebrados superiores. Devido a essas propriedades, essas enzimas são consideradas candidatas promissoras para serem utilizadas como biopesticidas e acentuadoras da proteção vegetal (DI MARO *et al.*, 2010). Além do papel de defesa, as quitinases podem estar envolvidas em mecanismos de crescimento, desenvolvimento e reprodução vegetal, sendo também importantes na tolerância a diversas condições de estresse (DE JONG *et al.*, 1992, 1993, REGALADO *et al.*, 2000, KASPRZEWSKA, 2003).

As quitinases são enzimas que catalisam a clivagem hidrolítica de ligações glicosídicas β -1,4 presentes nos biopolímeros de N-acetilglucosamina, principalmente a quitina e estão presentes em uma grande variedade de organismos, desempenhando diversas funções (KASPRZEWSKA, 2003).

Segundo Ferreira *et al.* (2007) as quitinases são enzimas que constituem o segundo maior grupo de proteínas antifúngicas e são amplamente distribuídas entre os organismos como insetos, bactérias, plantas superiores, humanos e alguns vírus (COHEN-KUPIEC E CHET, 1998). Estas proteínas apresentam diferentes funções no desenvolvimento, como na degradação das cutículas de insetos e crustáceos, na defesa de plantas relacionadas a patógenos, funções nutricionais e de parasitismo em bactérias e fungos, defesa contra patógenos em humanos e na separação das células filha em leveduras (DE JONG *et al.*, 1992, ESCOTT E ADAMS, 1995, RENKEMA, 1995, CARSTENS *et al.*, 2003, FERREIRA *et al.*, 2007).

De acordo com Sahai e Manocha (1993) as quitinases são classificadas por seu padrão predominante de clivagem. As quitinases podem ser divididas em dois grupos: endoquitinases, que realizam a clivagem aleatoriamente em sítios internos da cadeia de quitina, gerando produtos de baixa massa molecular, quito-oligosacarídeos de 2-6 resíduos de N-acetil-D-glucosamina e exoquitinases, atuando nas extremidades não-redutoras da

cadeia de quitina, promovendo a liberação de diacetilquitobiose (DAHIYA *et al.*, 2006, FERREIRA *et al.*, 2007).

2.2.1 *Quitinases de plantas*

As plantas são altamente vulneráveis ao ataque de fitopatógenos resultando em perdas significativas para a agricultura mundial. Ao longo do processo evolutivo foram selecionadas diversas estratégias de defesa que são desencadeadas após o desafio de um agente patogênico, como a expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e fitoalexinas (SINGH *et al.*, 2007).

As quitinases de origem vegetal são classificadas nas famílias 18 e 19 de glicosil hidrolases (HENRISSAT E BAIROCH, 1996) e em sete diferentes classes, as quais diferem na estrutura protéica, especificidade do substrato, mecanismos de catálise e sensibilidade a inibidores. A família 19 de hidrolases inclui as quitinases de classe I, II, IV, VI e VII as quais compartilham homologia do domínio catalítico e o peptídeo sinal. As quitinases de classe III e V constituem a família 18 (COHEN-KUPIEC E CHET, 1998, KASPRZEWSKA, 2003, SHAKBAZAU E KARTEL, 2008). Essas classes estão agrupadas em quatro famílias de proteínas PR (Quadro 1): quitinases das classes I, II, IV, VI e VII são incluídas na família PR-3. As de classe III e V estão incluídas nas famílias PR-8 e PR-11. Além dessas, algumas proteínas com atividade de endoquitinase ocorrem na família PR-4.

As quitinases pertencentes à classe I apresentam um domínio N-terminal rico em cisteína com 40 resíduos de aminoácidos, um domínio de ligação à quitina semelhante à heveína, uma região central conservada e uma alça (*loop*). Estas enzimas também apresentam um peptídeo sinal rico em valina e estão localizadas principalmente nos vacúolos. São expressas constitutivamente nos tecidos florais e raízes de diversas plantas e a expressão é aumentada de acordo com a idade da planta, sendo observada uma atividade quitinolítica maior para folhas maduras quando comparada com tecidos jovens. A classe I de quitinases é dividida nas subclasses Ia e Ib que incluem quitinases acídicas e alcalinas, respectivamente. As enzimas desta classe são características de plantas (KASPRZEWSKA, 2003, FERREIRA *et al.*, 2007).

As quitinases de classe II são similares às de classe I, porém ocorrem também em fungos e bactérias e não possuem o domínio N-terminal, nem o peptídeo sinal C-terminal que assegura a localização vacuolar. As quitinases de classe II não se ligam à quitina e são secretadas para o apoplasto. As quitinases de classe III, por sua vez, são completamente

diferentes das outras classes já citadas e formam estruturas com oito hélices α e oito folhas β (barril TIM). As de classe IV representam um grupo de quitinases extracelulares semelhantes às de classe I, mas com quatro grandes deleções que limitam o seu tamanho e são encontradas principalmente em plantas dicotiledôneas. A classe V é caracterizada por uma duplicação no domínio heveínico, enquanto que as quitinases de classe VI são similares as exoquitinases de bactérias (MELCHERS *et al.*, 1994, THEIS E STAHL, 2004, SHAKBAZAU E KARTEL, 2008).

As propriedades bioquímicas gerais de quitinases de muitas plantas foram descritas por Bol *et al.* (1990). Em comparação com as quitinases fúngicas, a maioria das quitinases de plantas são endoquitinases e apresentam massa molecular entre 26 e 43 kDa, podendo ter natureza ácida ou básica (SAHAI E MANOCHA, 1993, SHAKBAZAU E KARTEL, 2008). A maioria das quitinases de classe Ia, III e VI apresentam um elevado pI e estão localizadas nos vacúolos. As quitinases acídicas pertencentes às classes Ib, II, III, IV e VI são secretadas para o espaço apoplástico (ARIE *et al.*, 2000).

Os genes que codificam para quitinases podem ser induzidos pelo ataque de patógenos e a característica dessa expressão pode ser sistêmica ou local, dependendo do patógeno, da virulência ou da classe da quitinase (DAHIYA *et al.*, 2006). Essas enzimas desempenham um papel na defesa da planta catalisando a degradação de quitina dos fungos filamentosos (COLLINGE *et al.*, 1993). As quitinases podem estar envolvidas na inibição direta do crescimento do fungo e/ou na liberação de elicitores relacionados com a defesa. Além da função relacionada a mecanismos de defesa, acredita-se que essas enzimas podem desempenhar diversos outros papéis, como a regulação de processos de crescimento e desenvolvimento em plantas (DE JONG *et al.*, 1992, 1993, KASPRZEWSKA, 2003, BOWMAN E FREE, 2006, DAHIYA *et al.*, 2006).

2.2.2 Transformação genética de plantas com genes de quitinases

As proteínas com atividade antifúngica são agrupadas de acordo com suas propriedades enzimáticas, estrutura ou similaridades com outros tipos de proteínas já conhecidas (THEIS E STAHL, 2004).

Um dos principais alvos das proteínas antifúngicas é a parede celular dos fungos, que corresponde de 20-30% do peso seco das células desses organismos (BOWMAN E FREE, 2006, THEIS E STAHL, 2004). A parede celular consiste em uma estrutura complexa contendo quitina, glucanos, lipídeos e peptídeos incorporados em uma matriz protéica

(SELITRENNIKOFF, 2001). O mecanismo de ação das quitinases sobre os fungos é devido à propriedade de hidrólise da quitina, o que leva a um enfraquecimento da parede celular causando, subseqüentemente, lise da célula (THEIS E STAHL, 2004, SHAKBAZAU E KARTEL, 2008). A quitina que é o polissacarídeo estrutural básico da parede celular da maioria dos fungos é amplamente distribuída na natureza e possui um papel importante para o crescimento desses organismos, permitindo o alongamento das hifas (DAHIYA *et al.*, 2006, HERRERA E CASTELLANOS, 2010).

Atualmente, plantas transgênicas transformadas com genes que codificam para quitinases de diversas origens têm sido largamente produzidas. No trabalho de Khan *et al.* (2008) foi relatada a transformação de plantas de batata, com o gene ChiC, que codifica para uma quitinase isolada de uma cepa de *Streptomyces griseus*. O experimento mostrou que as plantas transformadas apresentaram resistência contra o fungo *Alternaria solani* quando comparadas com as plantas controle.

As plantas também produzem uma grande quantidade de enzimas quitinolíticas que atuam nos mecanismos de proteção, sendo induzidas por infecção de agentes patogênicos, moléculas sinais, reguladores de crescimento e injúrias no tecido. Diversos genes que codificam para quitinases de plantas já foram clonados e expressos para estudos de sua estrutura molecular, localização e atividade biológica (SHAKBAZAU E KARTEL, 2008).

He *et al.* (2008) mostraram que plantas de inhame transformadas com uma quitinase de arroz apresentaram um percentual de 42 a 63% de redução das lesões causadas pelo fungo *Sclerotium rolfsii*. A quitinase de arroz foi também responsável por conferir resistência, em plantas de morango, contra o fungo *Sphaerotheca humuli* (ASAO *et al.*, 1997).

A clonagem e caracterização do promotor de um gene codificador para uma quitinase de *Brassica juncea* revelou que ele responde a ferimentos e tratamento com metil-jasmonato, assim como tratamentos com NaCl e polietilenoglicol, indicando que esse promotor induz a transcrição do gene diante de estresse biótico e abiótico. Além disso, observou-se que o promotor dirigiu a expressão constitutiva em estigmas e frutos em desenvolvimento, o que pode ser interpretado como um possível papel no desenvolvimento reprodutivo ou um mecanismo de defesa para os órgãos reprodutivos jovens e sensíveis (WU *et al.*, 2009).

A expressão de uma quitinase de arroz de classe IV em *Arabidopsis thaliana* resultou em resistência moderada ao fungo *Botrytis cinerea*. Os autores sugerem que essa enzima pode atuar na inibição do crescimento do fungo por meio da degradação da quitina e liberação de elicitores que ativam respostas de defesa (PAK *et al.*, 2009). Plantas transgênicas de limão expressando uma quitinase do fungo *Trichoderma harzianum* também apresentaram

resistência ao fungo *B. cinerea*. Este trabalho mostrou que existe uma influência significativa da inserção do gene exógeno sobre a expressão de genes envolvidos na interação patógeno-hospedeiro (DISTEFANO *et al.*, 2008).

Apesar da grande quantidade de dados na literatura científica que mostram a modulação dos genes das quitinases em resposta aos estresses bióticos e abióticos, o papel destes genes na defesa e no desenvolvimento das plantas ainda não está bem estabelecido e por esse motivo, existe uma necessidade de estudos que possam contribuir para a elucidação destes detalhes que permanecem não esclarecidos.

REFERÊNCIAS

- ARIE, M., HIKICHI, K., TAKAHASHI, K., ESAKA, M. Characterisation of basic chitinase which is secreted by cultured pumpkin cells. **Physiologia Plantarum**, v. 110, p. 232-239, 2000.
- ASAO, H., NISHIZAWA, Y., ARAI, S., SATO, T., HIRAI, M., YOSHIDA, K., SHINMYO, A., HIBI, T. Enhanced resistance against a fungal pathogen *Sphaerotheca humuli* in transgenic strawberry expressing a rice chitinase gene. **Plant Biotechnology**, v. 14, p. 145-149, 1997.
- BHAT, S.R., SRINIVASAN, S. Molecular and genetic analyses of transgenic plants: Considerations and approaches. **Plant Science**, v. 163, p. 673-681, 2002.
- BOL, J.F., LINTHORST, H.J.M. E CORNELISSEN, B.J.C. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Annu. Rev. Phytopathology**, v. 28, p. 113-138, 1990.
- BOWMAN, S.M., FREE, S.J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, p. 799-808, 2006.
- CARSTENS, M., VIVIER, M.A., PRETORIUS, I.S. The *Saccharomyces cerevisiae* chitinase, encoded by the *CTS1-2* gene, confers antifungal activity against *Botrytis cinerea* to transgenic tobacco. **Transgenic Research** 12: 497-508, 2003.
- COHEN-KUPIEC, R., CHET, I. The Molecular Biology of Chitin Digestion, **Current Opinion Biotechnology**, v. 9, p. 270-277, 1998.
- COLLINGE, D.B., KRAGH, K.M., MIKKELSEN, J.D., NIELSEN, K.K., RASMUSSEN, U., VAD, K. Plant Chitinases. **The Plant Journal**, v. 3, p. 31-40, 1993.
- COLLINGE, D.B., LUND, O.S., THORDAL-CHRISTENSEN, H. What are the prospects for genetically engineered, disease resistant plants? **European Journal of Plant Pathology**, v. 121, p. 217-231, 2008.
- DAHIYA, N., TEWARI, R., HOONDA, G.S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 773-782, 2006.
- DE JONG, A.J., CORDEWENER, J., LO SCHIAVO, F., TERZI, M., VANDEKERCKHOVE, J., VAN KAMMEN, A., DE VRIES, S.C. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. **Plant Cell**, v. 4, p. 425-433, 1992.
- DE JONG, A.J., HELDSTRA, R., SPAINK, H.P., HARTOG, M.V., MEIJER, E.A., HENDRIKS, T., LO SCHIAVO, F., TERZI, M., BISSELING, T., VAN KAMMEN, A., DE VRIES, S.C. *Rhizobium* lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. **Plant Cell**, v. 5, p. 615-620, 1993.
- DI MARO, A., TERRACCIANO, I., STICCOA, L., FIANDRAC, L., RUOCCOD, M., CORRADOB, G., PARENTEA, A., RAO, R. Purification and characterization of a viral

chitinase active against plant pathogens and herbivores from transgenic tobacco. **Journal of Biotechnology**, v. 147, p. 1-6, 2010.

DISTEFANO, G., LA MALFA, S., VITALE, A., LORITO, M., DENG, Z., GENTILE, A. Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. **Trangenic Research**, v. 17, p. 873-879, 2008.

ESCOTT, G.M., ADAMS, D.J. Chitinase activity in human serum and leukocytes. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 4770-4773, 1995.

FERREIRA, R.B., MONTEIRO, S., FREITAS, R., SANTOS, C.N., CHEN, Z., BATISTA, L.M., DUARTE, J., BORGES, A., TEIXEIRA, A.R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p. 677-700, 2007.

FIOCCHETTI, F., D'AMORE, R., DE PALMA, M., BERTINI, L., CARUSO, C., CAPORALE, C., TESTA, A., CRISTINZIO, G., SACCARDO, F., TUCCI, M. Constitutive over-expression of two wheat pathogenesis-related genes enhances resistance of tobacco plants to *Phytophthora nicotianae*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 73-84, 2008.

HE, X., MIYASAKA, S.C., FITCH, M.M.M., MOORE, P.H., ZHU, Y.J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) with a rice chitinase gene for improved tolerance to a fungal pathogen *Sclerotium rolfsii*. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 903-909, 2008.

HENRISSAT, B., BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochemical Journal**, v. 316, p. 695-696, 1996.

HERRERA, J.R., CASTELLANOS, L.O. Analysis of the phylogenetic relationships and evolution of the cell walls from yeasts and fungi. **Federation of European Microbiological Societies-Yeast research**, v. 10, p. 225-243, 2010.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases - regulation and function. **Cellular e Molecular Biology Letters**, v. 8, p. 809-824, 2003.

KHAN, R.S., SJAHRIL, R., NAKAMURA, I., MII, M. Production of transgenic potato exhibiting enhanced resistance to fungal infections and herbicide applications. **Plant Biotechnology Reports**, v. 2, p. 13-20, 2008.

MELCHERS, L.S., APOTHEKER-DE GROOT, M., VAN DER KNAAP, J.A., PONSTEIN, A.S., SELA-BUURLAGE, M.B., BOL, J.F., CORNELISSEN, B.J.C., VAN DEN ELZEN, P.J.M., LINTHORST, J.M.A. new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exochitinases displays antifungal activity. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 5, p. 469-480, 1994.

PAK, J.H., CHUNG, E.S., SHIN, S.H., JEON, E.H., KIM, M.J., LEE, H.Y., JEUNG, J.U., HYUNG, N.I., LEE, H.L., CHUNG, Y.S. Enhanced fungal resistance in Arabidopsis expressing wild rice PR-3(OgChitIVa) encoding chitinase class IV. **Plant Biotechnology Reports**, v. 3, p. 147-155, 2009.

REGALADO, A.P., PINHEIRO, C., VIDAL, S., CHAVES, I., RICARDO, C.P.P., RODRIGUES-POUSADA, C. The *Lupinus albus* class-III chitinase gene, IF3, is constitutively expressed in vegetative organs and developing seeds. **Planta**, v. 210, p. 543-550, 2000.

RENKEMA, G.H., BOOT, R.G., MUIJSERS, A.O., KOOPMAN, W.E.D., AERTS, J.M.F.G. Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 2198-2202, 1995.

SAHAI, A.S., MANOCHA, M.S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 11, p. 317-338, 1993.

SELITRENNIKOFF CP Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2883-2894, 2001.

SELS J, MATHYS J, DE CONINCK BMA, CAMMUE BPA, DE BOLLE MFC Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 941-950, 2008.

SHAKHBAZAU, A.V., KARTEL', N.A. Chitinases in Bioengineering Research. **Russian Journal of Genetics**, v. 44, p. 881-889, 2008.

SINGH, A., KIRUBAKARAN, S.I., SAKTHIVEL, N. Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat. **Protein Expression and Purification**, v. 56, p. 100-109, 2007.

THEIS, T., STAHL, U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 437-455, 2004.

VALOIS, A.C.C. Importância dos transgênicos para a agricultura. **Cadernos de Ciência e Tecnologia, Brasília**, v. 18, p. 27-53, 2001.

VAN LOON, L.C., REP, M., PIETERSE, C.M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

WU, X., WANG, C., XIE, E., GAO, Y., FAN, Y., LIU, P., ZHAO, K. Molecular cloning and characterization of the promoter for the multiple stress-inducible gene *BjCH11* from *Brassica juncea*. **Planta**, v. 229, p. 1231-1242, 2009.

CAPÍTULO 2

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) é uma planta leguminosa anual, herbácea e produz frutos do tipo vagem. É comestível e dotada de alto conteúdo proteico, boa capacidade de fixar nitrogênio e é pouco exigente quanto à fertilidade do solo. As raízes podem atingir até dois metros de profundidade no solo, o que auxilia a planta a resistir à seca (ARAÚJO, 1988, BARRETO, 1999, FREIRE FILHO *et al.*, 1999).

A cultura desta leguminosa ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo. A maior parte da produção mundial ocorre na África onde são consumidas quase todas as partes da planta incluindo as folhas e o caule (POPELKA *et al.*, 2004). No Brasil é produzido predominantemente na região Nordeste, sendo as suas sementes utilizadas como base da dieta do povo desta região. Os seus grãos são uma fonte boa e barata de proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas, minerais e fibras e por isso representa uma cultura importante para a nutrição humana (ONYENEKWE *et al.*, 2000, PHILLIPS *et al.*, 2003, SINGH *et al.*, 2003, OBATOLU 2009). O feijão-caupi apresenta propriedades nutricionais superiores ao feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), além de ter digestibilidade melhor que os demais feijões, apresentando o maior teor de proteínas (24%) (EHLERS E HALL, 1997; SILVA E FREIRE FILHO, 1998).

Dados obtidos da FAO (*Food and Agriculture Organization*) de 2010 mostram que aproximadamente 5,5 milhões de toneladas de grãos de feijão-caupi seco são produzidos anualmente em uma área cobrindo cerca de 10,5 milhões de hectares em todo o mundo (<http://faostat.fao.org/> FAOSTAT 2010). Entretanto, esses números são subestimados porque não incluem dados do Brasil, Índia e alguns outros países que podem contribuir para elevar esses números (SINGH *et al.*, 2002). No Brasil, por exemplo, cerca de 480 mil toneladas de feijão-caupi são produzidas em uma área cobrindo aproximadamente 1,25 milhões de hectares (<http://faostat.fao.org/> FAOSTAT 2010).

Embora apresente boas características nutricionais e de adaptabilidade às condições climáticas do semi-árido, o feijão-caupi tem sua produção limitada devido a doenças e pragas que afetam essa cultura. A baixa produtividade também está relacionada às adversidades climáticas e às limitações do pequeno produtor (CARDOSO, 2000, POPELKA *et al.*, 2004).

1.1 Problemas relacionados à cultura do feijão-caupi e mecanismos de defesa

O feijão-caupi é altamente susceptível a muitas doenças virais, como o vírus do mosaico severo (*Cowpea severe mosaic virus*), o vírus do mosaico amarelo (*Cowpea yellow mosaic virus*) e o vírus do mosaico transmitido por afídeos (*Cowpea aphid borne mosaic virus*) e também é hospedeiro de uma grande variedade de insetos, notavelmente os sugadores de botões florais, os furadores de vagens (*Maruca vitrata*), os pulgões (*Aphis craccivora*) os besouros que se alimentam das folhas, os sugadores de vagens (*Clavigralla tomentosicollis*) e os insetos que ovopositam e se alimentam das sementes e vagens principalmente o manhoso (*Chalcodermus bimaculatus*) e o gorgulho (*Callosobruchus maculatus*) que têm reduzido consideravelmente a produção desta cultura (CARDOSO 2000, POPELKA *et al.*, 2004).

Níveis adequados de resistência a esses vírus e pestes não estão presentes no conjunto gênico das variedades mais cultivadas, mas estão disponíveis em espécies selvagens distantes, as quais apresentam barreiras para a transferência de genes por meio das técnicas de cruzamento tradicionais (PELLEGRINESCHI 1997a, 1997b; GOMATHINAYAGAM *et al.*, 1998). Além disso, a diversidade genética limitada em programas de melhoramento do feijão-caupi é de especial interesse porque esta espécie parece ter uma baixa diversidade genética inerente quando comparado com outras espécies cultivadas, devido à hipótese de um único evento de domesticação (FANG *et al.*, 2007). Consequentemente a transferência de genes de resistência a vírus e insetos pela engenharia genética poderia potencialmente ajudar os melhoristas vegetais a superar essas limitações.

Com o aumento progressivo da população mundial, surge a necessidade de se produzir cada vez mais alimentos em uma velocidade muito rápida. O aumento das áreas cultivadas constitui um agravante para o problema de como lidar com as pragas e agentes patogênicos que afetam principalmente os cultivares comercializados, causando perdas substanciais de produção e a deterioração da qualidade do produto. A aplicação de defensivos agrícolas é dispendiosa economicamente e causa prejuízos irreparáveis ao meio ambiente (SLUSARENKO *et al.*, 2000, POPELKA *et al.*, 2004).

Com o objetivo de reduzir essas perdas foram desenvolvidas estratégias baseadas no melhoramento tradicional combinado com a rotação de culturas e melhorias nas condições de cultivo. Apesar do sucesso no desenvolvimento de cultivares de feijão-caupi por meio de programas de melhoramento, os resultados em longo prazo foram bastante reduzidos pela seleção de populações de patógenos capazes de superar a resistência das plantas (ADESOYE *et al.*, 2008, SHAKHBAZAU E KARTEL 2008). Além disso, os pesquisadores foram

confrontados com a transferência de características indesejáveis em conjunto com os genes de resistência e com a depleção de fontes gênicas potenciais por meio dos longos ciclos de melhoramento convencional (PELLEGRINESCHI 1997a, 1997b, GOMATHINAYAGAM *et al.*, 1998).

O avanço nas tecnologias de engenharia genética e o entendimento da natureza molecular dos mecanismos de defesa vegetal forneceram meios para o desenvolvimento de novas estratégias para o controle de doenças. A maioria dessas estratégias biotecnológicas alternativas consiste da expressão constitutiva de algum ou vários genes combinados. Algumas das abordagens usam a resposta hipersensitiva, ou seja, a morte rápida dos tecidos localizados ao redor do ponto de infecção, o qual fornece resistência a danos na planta inteira (PELLEGRINESCHI 1997a, 1997b, MACHUKA *et al.*, 2002, SHAKHBAZAU E KARTEL 2008, ILORI E PELLEGRINESCHI 2011).

Quitinases de plantas já foram testadas quanto ao seu potencial como agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos (KARASUDA *et al.*, 2003). Existem relatos na literatura de quitinases de plantas leguminosas que se mostraram ativas contra o ataque de fungos em plantas. A expressão de uma quitinase de feijão-comum foi documentada no trabalho de Tohidfar *et al.* (2005) que relataram a transformação de plantas de algodão com um gene que codifica para a quitinase, sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S. Extratos obtidos a partir das plantas transgênicas apresentaram atividade inibitória contra o fungo *Verticillium dahliae*. Nos experimentos de Wang *et al.* (2008), foi demonstrado o potencial de uma quitinase obtida a partir de sementes da leguminosa *Phaseolus limensis* de ser ativa contra os fungos *Fusarium solani*, *Pythium aphanidermatum* e *Sclerotium rolfsii*.

Correia (2007) trabalhando com a quitinase de classe I de feijão-caupi (*VuChiI*) detectou a expressão constitutiva desta enzima em todas as partes da planta testadas através de ensaio de RT-PCR a partir do RNA total extraído de sementes e vagens em desenvolvimento, folhas, raízes, epicótilo e hipocótilo de plantas de feijão-caupi. A proteína recombinante foi purificada a partir de células de *E. coli* por cromatografia de afinidade e testada quanto a sua atividade contra uma matriz de quitina, teste que deu negativo o que segundo o autor pode ser devido a erros no processamento da proteína recombinante nas células de *E. coli*. Quando expressa na levedura *Pichia pastoris VuChiI* mostrou atividade contra o fungo *Penicillium herguei* (CASTRO, 2011).

Existem dados na literatura que indicam que o uso de quitinases pode ajudar a elevar a proteção de plantas de feijão-caupi contra patógenos de origem fúngica ou insetos. Gomes *et al.* (1996), isolaram uma quitinase e uma β -1,3-glucanase de sementes de feijão-caupi e

mostraram que estas enzimas tinham atividade contra os fungos causadores de antracnose *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum musae*. A quitinase ainda apresentou efeito negativo sobre o desenvolvimento do gorgulho do feijão-caupi (*Callosobruchus maculatus*) em um ensaio que utilizou sementes artificiais. Carvalho *et al.* (2001) mostraram em seu estudo que peptídeos isolados a partir de sementes de feijão-caupi exercem efeitos prejudiciais no desenvolvimento de diferentes fungos fitopatogênicos reforçando o potencial do uso de proteínas endógenas desta espécie como agente de biocontrole. Esses resultados sugerem que a semente de feijão-caupi contém proteínas de defesa que podem ser utilizadas como ferramentas biotecnológicas para transformar plantas de feijão-caupi e aumentar seu potencial agrônomo.

Em feijão-caupi já foi relatado o envolvimento de quitinases endógenas na inibição do crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* (NÓBREGA *et al.*, 2005). A purificação de uma proteína com características de quitinase a partir de exsudato de raiz foi obtida pela utilização de cromatografia de afinidade com quitina. As frações contendo quitinases foram identificadas por *Western blot* usando um anticorpo originado a partir de uma quitinase de sementes de *Adenanthera pavonina*. Oliveira *et al.* (2012) avaliaram a resistência de 10 cultivares de feijão-caupi ao nematoide das galhas *Meloidogyne incognita* e analisaram a cinética de várias enzimas no sistema radicular das cultivares inoculadas. A quitinase teve sua produção aumentada nas plantas do cultivar resistente CE-31, em comparação ao controle e ao cultivar susceptível CE-109 indicando que a quitinase deve desempenhar um papel na proteção das plantas de feijão-caupi contra o nematoide das galhas. Zhang *et al.* (2006) encontraram um resultado similar em duas cultivares contrastantes de feijão-caupi, quando inoculadas com o fungo *Fusarium oxysporum*, causador da murcha. As plantas infectadas apresentaram aumento da atividade quitinásica no cultivar resistente 'Fengchang No. 2' em comparação com o cultivar susceptível 'Zhijiang-28-2' e com o controle. Por outro lado Rose *et al.* (2006) relataram uma atividade inibitória de exsudatos de sementes de feijão-caupi sobre o crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Apesar da inibição, não foi detectada atividade quitinásica. Vieira *et al.* (2010) não conseguiram detectar atividade quitinásica em explantes de feijão-caupi inoculados com duas subespécies de *Fusarium oxysporum*.

O papel de quitinases no desenvolvimento também já foi relatado em feijão-caupi. Nogueira *et al.* (2007) estabeleceram o mapa proteômico de suspensões celulares embriogênicas de feijão-caupi e encontraram que as duas proteínas mais abundantes eram uma quitinase de classe I (PR-4) e uma ribonuclease (PR-10). A presença da quitinase nessas

culturas embriogênicas sugere que essa enzima possa desempenhar um papel importante durante a embriogênese somática. Em cenoura, por exemplo, um quitinase PR-4 é necessária para a embriogênese prosseguir além do estágio globular (VAN LOON *et al.*, 2006).

1.2 Transformação genética de feijão-caupi

Durante as três últimas décadas, diversos grupos de pesquisa tentaram desenvolver sistemas eficientes para a introdução de genes exógenos no genoma de feijão-caupi. Entretanto os protocolos publicados até hoje ainda não desenvolveram um sistema que seja simples de executar e que seja genótipo independente (ARAGÃO E CAMPOS 2007).

Apesar das várias tentativas para superar a barreira da totipotência e estabelecer protocolos de regeneração *de novo* e de transformação genética serem realizadas desde a década de oitenta, pouco avanço foi registrado até o presente. Com o desenvolvimento de novas estratégias, que não necessariamente dependem diretamente do uso de sistemas de regeneração *de novo*, foi possível obter plantas transgênicas de feijão-caupi por alguns grupos de pesquisa (MUTHUKUMAR *et al.*, 1996, IKEA *et al.*, 2003, POPELKA *et al.*, 2006, IVO *et al.*, 2008).

Garcia *et al.* (1986, 1987) começaram a investigar se o feijão-caupi era susceptível a infecção por *Agrobacterium tumefaciens* e demonstraram que genes exógenos podem ser introduzidos de maneira estável e expressos em células desta cultura. Apesar de terem obtido calos resistentes a canamicina, estes autores não conseguiram a regeneração em plantas transgênicas. Penza *et al.* (1991), usaram embriões maduros de feijão-caupi como alvo para a transformação genética por *Agrobacterium tumefaciens* e foram capazes de regenerar plantas putativamente transgênicas. Entretanto evidências genéticas da integração do transgene não foram apresentadas.

Os trabalhos de Garcia *et al.* (1986 e 1987) e uma série de outras tentativas de desenvolver sistemas de transformação e regeneração (PENZA *et al.*, 1991, 1992, AKELLA e LURQUIN, 1993) foram muito promissoras mas, demorou quase uma década até que as primeiras plantas transgênicas de feijão-caupi fossem regeneradas. Isto foi possível quando Muthukumar *et al.* (1996) co-cultivaram explantes cotiledonares com *A. tumefaciens* seguido pela transferência dos explantes para um meio seletivo, regenerando partes aéreas resistentes a higromicina que cresceram até a maturidade e produziram vagens. Apesar disso nenhuma das sementes foi capaz de germinar e não foi obtida nenhuma evidência da transmissão do transgene para a progênie.

Ikea *et al.* (2003) reportaram a produção de feijão-caupi transgênico obtido via bombardeamento de partículas. Este trabalho apresentou uma transmissão do transgene de uma geração para outra em feijão-caupi, embora as progênies geradas não obedecessem às leis mendelianas de herança. Popelka *et al.* (2006) obtiveram plantas transgênicas com uma frequência de transformação de 0,15%. As linhagens transgênicas transmitiram o transgene (gene *bar* para seleção com fosfinotricina) para a sua progênie segundo as leis de Mendel. Chaudhury *et al.* (2007) utilizaram nós cotiledonares como explantes para gerar plantas transgênicas férteis com uma eficiência de 0,76%. As plantas transgênicas foram selecionadas com canamicina e herdaram os transgenes seguindo os padrões Mendelianos na primeira geração. Apesar do sucesso relatado, esses sistemas de transformação são laboriosos, consomem muito tempo, parecem ser genótipo-dependente e apresentam uma baixa frequência de transformação.

Ivo *et al.* (2008) desenvolveram na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia um protocolo de transformação eficiente de feijão-caupi, independente da variedade e com uma frequência de transformantes mais elevada que a conseguida em trabalhos anteriores, seguindo um padrão de segregação mendeliana. O sistema consistiu em transformação de meristemas apicais, por biobalística, utilizando o gene repórter *gus* e um regime de seleção baseado no uso de *imazapyr*, uma molécula herbicida que é capaz de ser translocada sistemicamente e se concentrar na região do meristema apical da planta. Esse tipo de seleção foi possível graças a introdução do gene *ahas* mutante, que codifica para a sintase do acetolactato, no vetor utilizado para a transformação. A viabilidade dessa abordagem, bem como o uso de *imazapyr*, trouxe à tona o enorme potencial desse sistema na produção de feijão-caupi transgênico que expressa características de importância agrônômica. Além da frequência de transformação mais elevada (0,9%), o trabalho demonstrou a transferência eficiente de genes para as gerações T1 e T2 segundo expectativas das leis de Mendel. Esse trabalho representa um marco para a transformação genética de feijão-caupi principalmente pelo fato de ser genótipo independente e apresentar transmissão mendeliana do transgene para a progênie, além de ter sido desenvolvido totalmente aqui no Brasil, abrindo perspectivas para o estudo de genes em feijão-caupi.

Solleti *et al.* (2008a) desenvolveram um protocolo de regeneração e transformação estável de feijão-caupi expressando o gene do inibidor-1 de α -amilase (*α AI-1*) de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*), gerando plantas de feijão-caupi com resistência aos insetos *C. maculatus* e *C. chinensis*. O estabelecimento de um protocolo de transformação, mediado por *A. tumefaciens*, utilizando geneticina e suplementação de meio pós-seleção com benzil-

aminopurina por mais de três semanas assegurou uma frequência de regeneração de 1,64% (SOLLETI *et al.*, 2008b). Este trabalho representou um avanço importante no desenvolvimento de feijão-caupi transgênico e abriu caminho para tentativas com o intuito de melhorar os protocolos existentes e, em alguns casos, o desenvolvimento de novas estratégias de resistência a pragas e doenças da cultura (RAVEENDAR E IGNACIMUTHU, 2010).

Esta demonstração bem sucedida de resistência de feijão-caupi utilizando o gene do inibidor 1 de α -amilase foi seguida pelo relato de outra obtenção de resistência, desta vez contra *M. vitrata* em progênies T3. O trabalho consistiu na transformação de gemas nodais com um plasmídeo carregando o gene *CryIAb*, gene para uma toxina de *Bacillus thuringiensis*, usando *nptII* como marcador de seleção sob o controle do promotor CaMV35S do vírus do mosaico do couve-flor (ADESOYE *et al.*, 2008). Na tentativa de melhorar este protocolo de transformação, Adesoye *et al.* (2010), empregaram infiltração a vácuo em embriões na transformação de feijão-caupi e relataram uma frequência elevada de transformação em sementes da geração T1, variando entre 2,5 e 3,9%.

Recentemente Ilori e Pellegrineschi (2011) desenvolveram uma metodologia de transformação de pólen de gemas florais de feijão-caupi. As gemas florais receberam uma microinjeção de uma suspensão de células de *A. tumefaciens* transformadas portando o vetor recombinante ptjk 142 carregando um fusão quimérica dos genes *Uida* e *Bar* para expressão da β -glucuronidase e resistência ao herbicida bialaphos (phosphinothricin-alanyl-alanine) respectivamente. Esse sistema representa um meio promissor de obter plantas transgênicas de feijão-caupi, além de ser, segundo os autores, fácil e rápido.

Bakshi *et al.* (2012) desenvolveram um sistema de transformação de feijão-caupi utilizando o gene da isomerase de 6-fosfomanose como marcador de seleção. As células transformadas via *A. tumefaciens* apresentavam a capacidade de se desenvolver utilizando a manose do meio como fonte de carbono. A eficiência de transformação neste trabalho foi de 3,6%.

Com o estabelecimento de protocolos de transformação e regeneração de feijão-caupi transgênico, geram-se novos objetivos, como o emprego destas técnicas em conjunto com as abordagens tradicionais de cruzamento para a produção em larga escala de variedades elite expressando genes de importância agrônômica.

Apesar dos esforços, a manipulação genética de feijão-caupi ainda está longe de ser rotineira, necessitando que os sistemas de regeneração e transformação sejam melhorados (SOMERS *et al.*, 2003, ARAGÃO E CAMPOS 2007).

1.3 Silenciamento gênico

Modificações usando técnicas de engenharia genética podem facilitar o rápido desenvolvimento de novas variedades com características de interesse agrônomo e industrial. A principal estratégia empregada, que utiliza a transgenia, envolve o aumento da expressão através de construções gênicas específicas que são reguladas por promotores constitutivos. Para a redução dos níveis de produtos gênicos, dois métodos têm sido comumente utilizados: a interrupção (*Knockout*) e o silenciamento de genes. Na interrupção de genes, a sequência alvo é modificada para eliminar sua expressão ou função, enquanto que no silenciamento, a destruição do transcrito ou a inibição da transcrição são induzidas. Esta última via apresenta maior facilidade de manipulação genética e análise das plantas transgênicas, além de poder ser ativada de forma temporal e espacial por meio da utilização de promotores específicos (TANG E GALILI, 2004).

Das metodologias de silenciamento gênico induzido por RNA dupla fita (dsRNA), a interferência por RNA (*RNA interference*), é a mais eficiente (SMITH, 2000). O silenciamento gênico por meio de RNA é um fenômeno característico de organismos eucariotos e desempenha papéis importantes em diversos processos biológicos, incluindo a regulação do desenvolvimento (BAULCOMBE, 2004), defesa antiviral (WATERHOUSE *et al.*, 2001, ZERBINI *et al.*, 2005) e remodelamento da cromatina (LIPPMAN E MARTIENSSEN, 2004, QI E HANNON, 2005).

O sistema, mediado por moléculas de siRNA, tem sido aplicado para silenciar a expressão de genes-alvo (FIRE *et al.*, 1998, GHILDIYAL E ZAMORE, 2009). Os primeiros experimentos utilizando RNA interferente para silenciamento gênico demonstraram o elevado potencial desta abordagem em controle de pragas e outras ameaças ao feijão comum (GORDON E WATERHOUSE, 2007, BONFIM *et al.*, 2007).

A utilização de moléculas de siRNA cujas sequências poderiam desencadear sinais para silenciar genes essenciais em insetos, bactérias e vírus em feijão-caupi transgênico, parece ser atraente, visto que neste sistema não há expressão da proteína exógena, diminuindo o risco para a planta e para o consumidor. Na verdade, este tipo de estratégia tem sido aplicado em um número de culturas e entre os genes candidatos para serem silenciados, no caso de insetos alvo, estão ATPase vacuolar e tubulina de insetos (FIRE *et al.*, 1998, AGUIAR *et al.*, 2006, BAUM *et al.*, 2007, UPADHYAY *et al.*, 2011).

O fenômeno de silenciamento de RNA foi observado em plantas transgênicas por dois grupos independentes de pesquisadores (NAPOLI *et al.*, 1990, VAN DER KROL *et al.*,

1990). Estes pesquisadores tinham como objetivo criar petúnias transgênicas, cujas flores apresentassem uma coloração mais intensa. A estratégia escolhida consistia em superexpressar o gene que codifica a sintase de chalcona (CHS), uma enzima chave na biossíntese de antocianinas. Para isso foi introduzida uma cópia extra do gene *Chs* sob controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (*Cauliflower mosaic virus* - CaMV). Entretanto, ao contrário do esperado, as diferentes linhagens transgênicas obtidas possuíam padrões distintos de variegação floral, incluindo linhagens que apresentavam flores totalmente brancas, ou seja, sem pigmento. A análise molecular das linhagens transgênicas comprovou que a introdução da cópia extra, havia efetivamente bloqueado a biossíntese de antocianinas, inibindo, simultaneamente, a expressão do gene endógeno pré-existente e da cópia introduzida. A inibição da pigmentação das flores foi diretamente correlacionada com uma redução específica no acúmulo de mRNA do gene *Chs*. O fenômeno foi denominado co-supressão, pois a introdução de um transgene levou ao silenciamento simultâneo do próprio transgene e do gene endógeno homólogo (NAPOLI *et al.*, 1990, VAN DER KROL *et al.*, 1990).

No caso deste trabalho o objetivo foi estudar o papel no desenvolvimento de uma quitinase de classe I de feijão-caupi. A metodologia de silenciamento gênico foi utilizada para “nocautear” a expressão do gene em plantas de feijão-caupi com o intuito de estudar as variações fenotípicas das plantas e sua resposta de defesa. As plantas regeneradas foram testadas quanto à presença do transgene por PCR e alterações morfológicas foram observadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do silenciamento do gene da quitinase de classe I em plantas de feijão-caupi.

2.2 Objetivos específicos

- Clonar a sequência de silenciamento da quitinase de classe I amplificado a partir do cDNA de sementes de feijão-de-corda;
- Subclonar a sequência de silenciamento da quitinase de classe I em vetor de silenciamento;
- Transformar ápices caulinares de feijão-de-corda por meio do bombardeamento de micropartículas;
- Regenerar plantas transformadas de feijão-de-corda;
- Analisar as plantas transformadas utilizando técnicas moleculares de PCR e *Northern blot*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Sementes

As sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) cultivar BRS Novaera (FREIRE FILHO *et al.*, 2008) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Francisco José Lima Aragão, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Expressão de Genes.

3.1.2 Bactérias

A cepa TOP10F' de *Escherichia coli* foi utilizada nos experimentos de clonagem do gene da quitinase de classe I do feijão-caupi.

3.1.3 Enzimas

As enzimas de restrição *NotI*, *XhoI*, *XbaI*, *HindIII*, *KpnI*, *SacI*, *EcoRV* (10 U/ μ L) e seus respectivos tampões 10x: *Buffer Orange* (Tris-HCl (pH 7,5) 500 mM, MgCl₂ 100 mM, NaCl 1000 mM e BSA 1 mg/ml), *Buffer Red* (Tris-HCl (pH 8,5) 100 mM, MgCl₂ 100 mM, KCl 1000 mM e BSA 1 mg/ml), *Buffer Tango* (Tris-acetato (pH 7,9) 330 mM, Mg-acetato 100 mM, K-acetato 660 mM e BSA 1 mg/ml), *Buffer Red*, *Buffer KpnI* (Tris-HCl (pH 7,5) 100 mM, MgCl₂ 100 mM, Triton X-100 0,2% e BSA 1 mg/ml), *Buffer SacI* (Bis-Tris Propano-HCl (pH 6.5) 100 mM, MgCl₂ 100 mM e BSA 1 mg/ml) e *Buffer Red* foram obtidas da Fermentas International Inc. (Canadá). A T₄ DNA Ligase foi obtida da Promega, USA. Ribonuclease I "A" de pâncreas bovino e a *Taq* DNA polimerase (5000 U/ μ L) e seus tampões, foram adquiridos da Invitrogen Life Technologies (USA). A DNase I (136 U/ μ L) foi obtida da Gibco BRL-LifeTechnologies (USA).

3.1.4 Plasmídios

O vetor pGEM-T Easy (Promega, USA) foi utilizado como vetor de clonagem do fragmento de silenciamento do gene da quitinase de classe I de feijão-caupi. Os vetores,

pKANNIBAL (GenBank: AJ311873.1) e pAC321 para clonagem e bombardeamento foram cedidos gentilmente pelo Dr. Francisco José Lima Aragão pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Expressão de Genes.

3.1.5 Outros reagentes e materiais

Os oligonucleotídios iniciadores complementares ao cDNA de *VuChiI* foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies (USA). O kit de purificação de DNA GFX Gel Band Purification System foi adquirido da Amersham Biosciences (USA). O kit de extração de plasmídios em média escala (Midiprep), e em pequena escala (Wizard SV Minipreps) foram obtidos da Invitrogen™ (PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kit). Os componentes dos meios de cultura LB (Luria-Bertani), e meio de cultura MS (Murashige E Skoog, 1962) para regeneração de partes aéreas de feijão-de-corda foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. LLC (USA).

3.2 Métodos

3.2.1 Extração do DNA genômico de folhas de feijão-caupi

Para realizar os trabalhos de clonagem da sequência codificadora do gene da quitinase nos vetores de silenciamento e expressão extracelular, foi necessário fazer a extração de DNA genômico de folhas de feijão-caupi para servir como molde para a reação de PCR utilizando iniciadores específicos para a sequência da quitinase. O DNA genômico foi extraído de folhas de plantas de feijão-caupi conforme o protocolo desenvolvido no Laboratório de Expressão de Genes (LTG) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Foram coletadas 500 mg de folhas jovens e imediatamente acondicionadas em nitrogênio líquido. O material foi então macerado em cadinho com o auxílio de pistilo até obter um pó fino. O pó foi transferido para um tubo de centrifuga graduado (15 mL) contendo 5 mL de tampão CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) - Tris-HCl 100mM (pH 8,0), EDTA 20 mM, CTAB 2%, adicionado de 0,3% de β -mercaptoetanol (v/v) e 50 mg de PVP (p/v). O material foi homogeneizado por inversão do tubo e incubado por 60 minutos a 60 °C. Após o aquecimento o tubo contendo a amostra foi incubado a temperatura ambiente por seis minutos. Após esse período 6 mL de clorofórmio: octanol (24:1) foi adicionado à amostra e homogeneizado por inversão até obter uma emulsão. Os tubos foram então centrifugados a 3.000 rpm por 20 minutos a temperatura

ambiente em Centrífuga Eppendorf 5810R. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de centrífuga graduado (15 mL), e a adição do clorofórmio: octanol foi repetida. Ao sobrenadante foi adicionado solução de NaCl 5M correspondente à metade do volume da fase aquosa. A solução foi misturada por inversão e adicionada de duas vezes o volume da fase aquosa de etanol 95% (resfriado previamente a -20°C). A solução foi homogeneizada por inversão e acondicionada a -20°C por dez minutos. A solução foi centrifugada por seis minutos a 3.000 rpm o que resultou na formação de uma película densa no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi lavado com etanol 70% (resfriado a 4°C). O precipitado foi colocado para secar na bancada e depois dissolvido em 300 µL de tampão TE (Tris-EDTA, pH 8,0). A solução foi adicionada de 3 µL de RNase A (10 mg/mL) e incubada a 37 °C durante 60 minutos e então adicionada de 3 µL de proteinase K (1 mg/mL) e incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Foram adicionados 150 µL de clorofórmio e 150 µL de fenol em cada tubo. A solução foi agitada em *vortex* e centrifugada a 14.000 rpm por dez minutos. A fase aquosa foi então transferida para outro tubo. A amostra foi adicionada de um volume correspondente a 1/10 do seu volume de acetato de sódio 2M e duas vezes o volume de etanol absoluto. A solução foi misturada por inversão do tubo e colocada para precipitar por 60 minutos em ultrafreezer -80°C. A solução foi centrifugada a 14.500 rpm por dez minutos e o *pellet* formado foi lavado com etanol 70%. Após a lavagem o etanol foi descartado e o precipitado foi suspenso em 100 µL de tampão TE.

3.2.2 Desenho dos Iniciadores

Iniciadores específicos para o gene da quitinase de classe I de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), denominada neste trabalho como *VuChiI*, foram desenhados com base na seqüência depositada no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) de número de acesso AF307511 . Os iniciadores foram desenhados com o objetivo de amplificar um segmento do gene de 498 pb (denominado neste trabalho de *VuChiIS*) para clonagem no vetor de silenciamento pKANNIBAL. Os iniciadores senso *QuiXhoXba* (5'-**CCGCTCGAGTCTAGAACTACTGCGGCAAG**-3'), Tm: 64,8 °C foram desenhados com a inserção de sítio de restrição para as endonucleases *XhoI* (negrito) e *XbaI* (negrito e sublinhado) enquanto os iniciadores anti-senso *QuiHindKpn* (5'-**TTGGTACCAAGCTTAGACGACGGGTCG**-3'), Tm: 64,8 °C foram desenhados com a adição de sítios para *KpnI* (negrito) e *HindIII* (negrito e sublinhado).

3.2.3 Amplificação do fragmento gênico de *VuChiIS*

O inserto referente à *VuChiIS* foi amplificado por PCR em uma reação de 25 μL contendo: 1,0 μL do DNA molde, 2,5 μL do tampão de reação (Tris-HCl 100 mM, pH 9,0, MgCl_2 15 mM e KCl 500 mM), 5,0 μL da solução de dNTP's (1,0 mM), 2,5 μL de cada iniciador (cada um na concentração de 5,0 μM), 1,0 μL de *Taq* DNA polimerase (*Go Taq 5U/* μL) e 10,5 μL de água ultra pura estéril. Para as reações controle, não foi feita adição do DNA molde, sendo o volume da reação completado com água. O DNA molde utilizado foi o cDNA de *VuChiI* obtido a partir da transcrição reversa do RNA total extraído de folhas de plantas de feijão-caupi no trabalho realizado por Correia (2007).

Para a amplificação dos fragmentos foram adotados os seguintes parâmetros: uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 3 minutos, anelamento a 60 °C por 15 segundos e uma etapa de extensão a 72 °C por 2 minutos. Esse ciclo foi repetido 33 vezes.

O produto da reação de amplificação do fragmento gênico de *VuChiIS* foi aplicado em gel de agarose 0,8% em tampão TBE (Tris 4 mM pH 8,0, Ácido Bórico 1mM, EDTA 0,5 M) contendo brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g/mL}$, submetido a uma corrente constante de 100 mA por cerca de 30 minutos e visualizado com o auxílio de um transluminador ultravioleta.

3.2.4 Purificação do produto de PCR

Os produtos da reação foram purificados a partir do gel de agarose com auxílio do Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Life Sciences). Foi adicionado à amostra 500 μL de tampão de captura e a mistura foi agitada vigorosamente adquirindo uma coloração amarela. A mistura foi adicionada a uma coluna GFX MicroSpinTM montada em um tubo de coleta. A amostra foi centrifugada por 60 segundos a 16.000 x g. O volume no tubo de coleta foi descartado e a coluna com o DNA aderido foi montada em outro tubo de coleta. Foi adicionado à coluna 500 μL de tampão de lavagem e centrifugado a 16.000 x g por 60 segundos. O volume no tubo de coleta foi descartado junto com o tubo e a coluna foi montada em um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL autoclavado. Foi adicionado 20 μL de tampão de eluição e a coluna foi deixada na bancada a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida a coluna foi centrifugada por 5 minutos a 16.000 x g. O processo de eluição foi repetido e o volume que ficou retido no tubo de microcentrifuga contendo o DNA de interesse foi armazenado a -20°C.

3.2.5 Ligação em pGEM-T Easy e eletroporação em *E. coli*

Os produtos de PCR purificados foram utilizados em uma reação de ligação com o vetor pGEM-T Easy (Figura 1). A reação consistiu na adição de 5 μL do tampão 2x *Rapid Ligation* (Tris-HCl 60 mM-pH 7,8, MgCl_2 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM, polietilenoglicol 10%), 1 μL de pGEM-T Easy (50 ng/ μL), 1 μL de T4 DNA ligase (3U/ μL) e 5 μL do produto da PCR. A reação foi incubada a 4 °C por 16 h no termociclador PTC-200 (MJ Research). Os produtos da reação de ligação foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* por meio de eletroporação.

Para os experimentos de clonagem deste trabalho foi utilizada a cepa de *E. coli* TOP10F' (Invitrogen, USA). A preparação das células eletrocompetentes foi feita de acordo com o protocolo cedido pelo prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro da UNESP/Jaboticabal com algumas adaptações e consistiu inicialmente do inóculo de 100 mL de uma cultura estoque em glicerol de *E. coli* em placas de Petri com cerca de 25 mL de meio LB ágar (contendo estreptomicina 30 mg/L). As placas foram incubadas a 37 °C por cerca de 16 h. Com o auxílio de um ponteira estéril, uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio LB caldo (contendo estreptomicina 30 mg/L) em frascos erlenmeyers de 50 mL. Os frascos contendo o pré-inóculo foram incubados a 37 °C sob agitação constante a 250 rpm, por um período de aproximadamente 16 horas. A partir dessas culturas foram inoculados 5 mL em 500 mL de meio 2xYT (Invitrogen, USA) sob condições estéreis. A cultura foi novamente incubada a 37 °C sob agitação de 250 rpm até que a população de células no meio atingisse OD₆₀₀ entre 0,4 e 0,6 e então incubada em banho de gelo por 30 minutos. Ao final do período de incubação, a cultura foi transferida para tubos de centrifuga de 30 mL, e centrifugada a 10.000 x g, 4 °C por 20 minutos (rotor SS34, centrífuga Sorvall RC5B plus) para coleta das células. Após a centrifugação o precipitado foi suspenso em 10 mL de glicerol 10% estéril resfriado a -20 °C e homogeneizado. Essa lavagem com o glicerol 10% foi repetida duas vezes, seguida de centrifugação para a recuperação do precipitado celular. Por fim as células foram suspensas em 500 μL de meio GYT (glicerol 10%, extrato de levedura 0,125%, triptona 0,25%, pH 7,0). Alíquotas de 40 μl das células eletrocompetentes foram distribuídas em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL, devidamente identificadas, e armazenadas a -80 °C até o momento da eletroporação.

Para a eletroporação, foram adicionados 2 μL de DNA (1 a 10 ng) a 40 μL do estoque de células competentes de *E. coli*. A suspensão foi homogeneizada e incubada em gelo por um minuto. Em seguida a mistura foi adicionada à cubetas de eletroporação com espaço interno

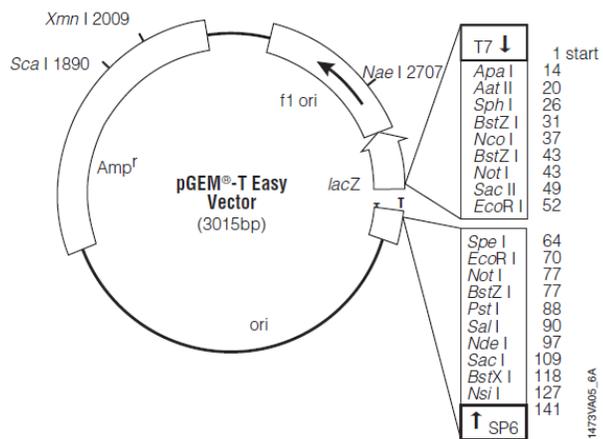


Figura 1: Mapa circular do vetor pGEM-T Easy (Promega)

de 2,0 mm (Eppendorf) previamente resfriada em gelo e no tratamento controle, não foi feita a adição da reação de ligação, sendo o volume da reação completado com água ultra-pura. O procedimento foi realizado em um eletroporador Eppendorf modelo 2510 ajustado às seguintes condições: resistência de 200 Ω ; capacitância de 25 μF . A voltagem foi ajustada conforme a distância entre os eletrodos da cubeta: 2,5 kV (para cubetas com distância entre os eletrodos de 0,2 cm) ou 1,5 a 1,8 kV (para cubetas com distância entre os eletrodos de 0,1 cm) e foi aplicado apenas um pulso para cada transformação.

Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de meio SOC (1 mL de SOB [1litro: 20 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 0,58 g de cloreto de sódio, 0,2 g de cloreto de potássio, pH 7,5 ajustado com KOH 5N], 40 μL de glicose 20%, 40 μL de MgCl_2 1M) recém preparado e as células foram suspensas cuidadosamente por pipetagem gentil. A suspensão foi transferida para um tubo de centrífuga de 15 mL e incubada a 37°C, durante 1 hora.

Após a incubação foram cultivados 150 μL da suspensão em meio LB ágar suplementado com os antibióticos estreptomicina 30 mg/L e carbenicilina 100 mg/L; com X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil- beta-D-galactopiranosídeo) 80 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo) 0,5 mM e as placas foram incubadas a 37°C durante 18 horas até o aparecimento das colônias. O vetor pGEM-T Easy possui o gene para β -lactamase, que confere resistência à ampicilina, e possibilita a seleção de colônias transformadas com o plasmídeo e gene codificante para a β -galactosidase que confere a habilidade de metabolizar a substância cromogênica *5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside* (X-Gal), produzindo um pigmento azul. Como o fragmento de DNA a ser clonado no pGEM-T Easy irá interromper a seqüência codificadora da β -galactosidase, as bactérias com o plasmídeo recombinante formarão colônias brancas, enquanto que as não recombinantes formarão colônias azuis, o que permite a seleção dos clones transformados. As colônias brancas recombinantes foram identificadas e inoculadas em meio LB líquido para extração do DNA plasmidial, pelo método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.2.6 Extração de Plasmídios

Os plasmídios foram purificados de acordo com o método da lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). De cada placa de Petri foram selecionadas 11 colônias brancas putativamente transformadas e 1 colônia azul de *E. coli* Top10F'. As colônias foram inoculadas em 5 mL meio LB suplementado com estreptomicina 30 mg/L e carbenicilina 100

mg/L e cultivadas a 37 °C por 16 horas. Uma alíquota de 3 mL foi coletada de cada tubo e submetida à centrifugação a 12.000 rpm, por 5 minutos (Centrífuga MiniSpin Eppendorf). Após a centrifugação, as células foram coletadas e homogeneizadas em 200 µL de solução de Tris-HCl 25 mM-pH 8,0, EDTA 10 mM, glucose 50 mM. Em seguida fez-se a adição de 200 µL da solução de lise, constituída de SDS 10% e NaOH 4,0 M. Após 5 minutos foi adicionado à mistura 200 µL de uma solução de neutralização (acetato de potássio 2,8 M).

Os tubos foram incubados em gelo por aproximadamente 5 minutos e em seguida foram centrifugados a 12.000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado em tubos novos e a este foi adicionado 2/3 do volume de isopropanol para a precipitação do DNA. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos e em seguida centrifugadas a 12000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. Após a etapa de lavagem, o DNA extraído foi suspenso em 50 µL de água ultra-pura, acrescida de 2,0 µL de RNase A (1,0 mg/mL). A presença dos plasmídeos na solução foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio 0,5 µg/mL. As amostras contendo o DNA plasmidial foram quantificadas em espectrofotômetro, medindo-se a absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm para o cálculo da concentração e confirmação da pureza. Depois de verificada a qualidade dos plasmídeos extraídos foram preparados estoques em glicerol dos clones transformados e estes estocados em ultrafreezer -80 °C.

Como uma forma alternativa de purificação, para as etapas que requeriam uma amostra de DNA mais puro como o sequenciamento, foi conduzida a purificação de plasmídios com o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, USA). Com o auxílio de uma ponteira estéril, foi feito um inóculo a partir de uma colônia isolada em 5 mL de meio LB caldo (contendo carbenicilina 100 mg/L e estreptomicina 30 mg/L). Os inóculos foram incubados a 37 °C por 16 horas a 250 rpm. Após o crescimento das culturas, as células foram coletadas por centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos a 25 °C (centrífuga mini spin Eppendorf) em microtubos de 1,5 mL. A partir das células sedimentadas, os plasmídios foram extraídos com o auxílio do kit. O precipitado foi suspenso em 250 µL de solução de ressuspensão celular. Foram adicionados 250 µL de solução de lise celular em cada amostra e o tubo foi invertido quatro vezes para homogeneizar a amostra. Foram adicionados 10 µL de solução de protease alcalina, o tubo foi novamente invertido quatro vezes e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 350 µL de solução de neutralização e o tubo foi invertido quatro vezes. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi

transferido para a coluna de purificação do kit montada em um tubo de coleta. O aparato foi centrifugado a 13.000 rpm por um minuto a temperatura ambiente. O líquido no tubo de coleta foi descartado e a coluna foi reinsertada no tubo de coleta. Foram adicionados 750 µL de solução de lavagem e a coluna montada no tubo de coleta foi centrifugada a 13.000 rpm por 1 minuto. O líquido no tubo de coleta foi descartado e a lavagem foi repetida com 250 µL de solução de lavagem e a centrifugação durou dois minutos. A coluna foi transferida para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL cuidadosamente e foram adicionados 50 µL de água livre de nucleases à coluna. A coluna montada no tubo foi centrifugada por 14.000 rpm por 5 minutos. O procedimento foi repetido e a coluna foi descartada. A solução de DNA no tubo de microcentrifuga foi estocada a -20 °C.

3.2.7 Sequenciamento dos clones transformados

A partir dos plasmídios pGEM-T Easy transformados com o fragmento de silenciamento da quitinase de feijão-caupi de classe I, os diferentes clones obtidos foram sequenciados. A reação de sequenciamento foi preparada com o auxílio do kit *DYEnamic ET Dye Terminator kit* (GE Healthcare, USA) para o sequenciador MegaBACE1000, de acordo com o descrito no manual do fabricante. Na reação foram utilizados iniciadores específicos para a região M13 presente no plasmídio pGEM-T Easy.

Após o sequenciamento em MegaBACE1000 (GE Healthcare, USA), as diferentes seqüências obtidas de todos os clones foram analisadas com o auxílio do pacote Phred/Phrap/Consed (EWING *et al.*, 1998, GORDON *et al.*, 1998) para a obtenção das seqüências consenso dos clones. As seqüências dos diferentes clones foram alinhadas com o auxílio do programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994) e a ocorrência de possíveis mutações foi analisada.

3.2.8 Construção dos vetores de silenciamento e bombardeamento

Os métodos de clonagem padrão (SAMBROOK *et al.*, 1989) foram utilizados para fazer obtenção dos vetores recombinantes. O plasmídio de silenciamento pKANNIBAL (6063 pb) derivado do pHANNIBAL (WESLEY *et al.*, 2001) foi gentilmente cedido pelo Dr. Francisco J. L. Aragão (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia). A seqüência anotada do vetor pKANNIBAL está depositada no banco de dados EMBL e apresenta o número de acesso AJ311873. Esse vetor contém um promotor CaMV35S, a região de clonagem para a

sequencia senso, o íntron *pdk* (*pyruvate orthophosphate dikinase*), a região de clonagem para a sequencia antisenso e o terminador *ocs* (*octopine synthase*), de modo que ao ser inserido na célula o cassete de expressão recombinante deste plasmídeo ao ser transcrito codifica para um RNA que se dobra sobre si mesmo formando uma estrutura de grampo que pode ser reconhecida pela maquinaria celular de silenciamento gênico. O marcador de seleção deste vetor é o gene *nptII*, cujo produto confere resistência à canamicina para a bactéria hospedeira.

Os plasmídios pGEM-T Easy clonados com o fragmento de silenciamento do gene da quitinase de classe I do feijão-caupi (pGEM-T::*VuChiIS*) e pKANNIBAL íntegro foram digeridos com as enzimas *XbaI* e *HindIII* (Fermentas). Foram usados cerca de 1.000 ng dos plasmídios na digestão. Após a reação, os produtos da digestão foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 0,6%. As bandas digeridas do fragmento de silenciamento do gene da quitinase e do pKANNIBAL foram purificadas com o auxílio do kit *GFX gel band purification system* (Invitrogen, USA). Após a quantificação dos produtos purificados do gel de agarose, foi conduzida a reação de ligação do fragmento de silenciamento do gene da quitinase no vetor pKANNIBAL com a enzima T4 DNA ligase (Promega,USA), nas razões 3:1, 5:1 e 8:1, obedecendo a fórmula: $[\text{vetor (ng)} \times \text{tamanho do inserto (pb)}] / \text{tamanho do vetor (pb)} \times \text{razão} = \text{inserto (ng)}$. A ligação foi incubada a 4 °C por 14 horas. Após a ligação, os produtos foram eletroporados a 2.500 V em células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10F' (Eletroporador 2510 Eppendorf, USA). Logo após o impulso elétrico foi adicionado às células eletroporadas 1 mL de meio SOC pré-aquecido a 37 °C. As células foram incubadas a 37 °C por 1 hora a 200 rpm. Em seguida foram plaqueadas, com o auxílio de uma alça de Drigalsky, 100 µL da solução contendo as células eletroporadas com os produtos da ligação, em placas de Petri contendo meio LB Agar acrescido de carbenicilina 100 mg/L e estreptomicina 30 mg/L. Após a incubação a 37 °C por 16 horas, colônias foram visualizadas. Foram selecionadas colônias ao acaso para a purificação dos plasmídios. A transformação foi confirmada através de PCR e digestão do vetor recombinante com as enzimas *XbaI* e *HindIII*. O mesmo procedimento foi conduzido mais uma vez para subclonagem de pGEM-T Easy clonado com o fragmento de silenciamento desta vez digerido com *XhoI* e *KpnI* em pKANNIBAL. Para tanto foram conduzidos dois passos de subclonagem para inserção do fragmento no sentido senso e anti-senso nos braços do vetor de silenciamento. A primeira subclonagem foi conduzida utilizando as enzimas de restrição *XbaI* e *HindIII* e a segunda subclonagem foi realizada com as enzimas *XhoI* e *KpnI* (Figura 2).

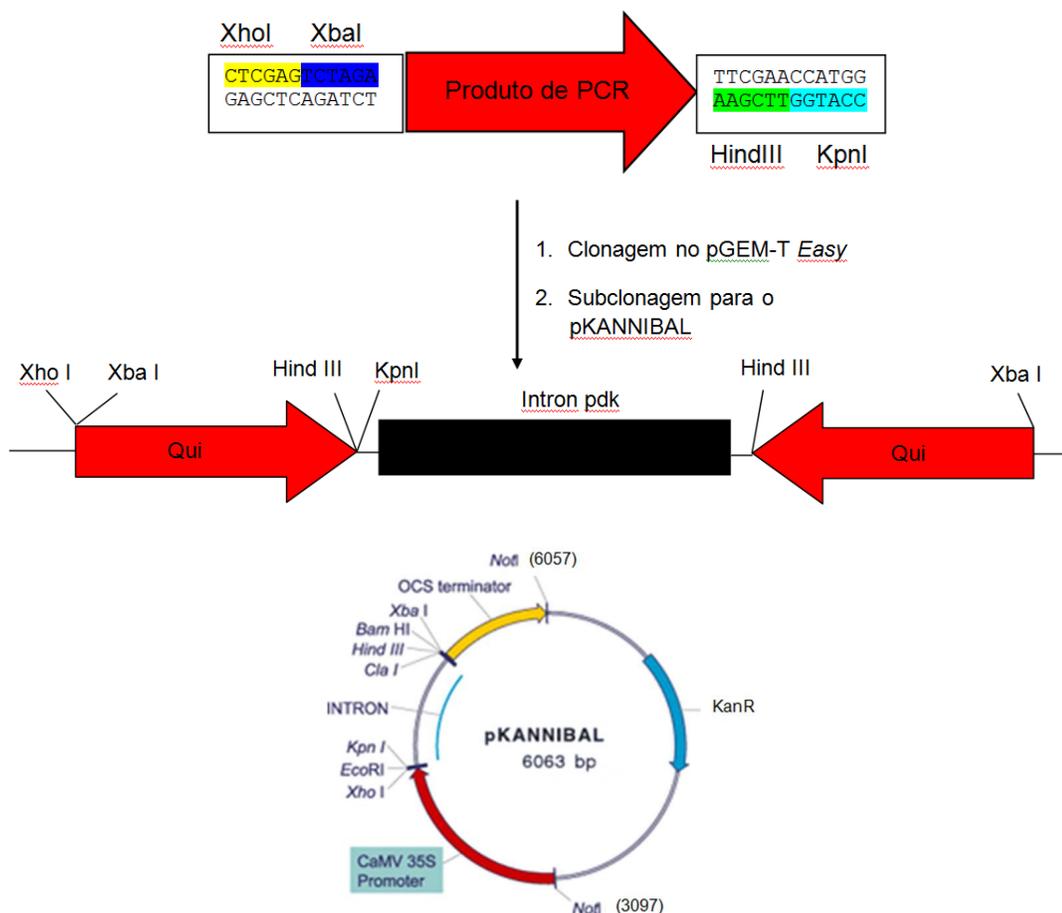


Figura 2: Esquema de construção do cassete de silenciamento e mapa circular do vetor pKANNIBAL. O fragmento de PCR foi amplificado com os iniciadores QuiXhoXba e QuiHindKpn que adicionaram quatro sítios de restrição ao fragmento. O vetor pKANNIBAL possibilita a clonagem deste mesmo fragmento em sentidos opostos devido a organização dos sítios de restrição para clonagem no sentido senso e anti-senso. Ao ser digerido do pGEM T-Easy com XhoI e KpnI o fragmento foi clonado no sentido senso, e em seguida ao ser digerido com HindIII e XbaI o fragmento foi clonado no sentido anti-senso completando assim o esquema de clonagem que resulta em um grampo de RNA ao ser transcrito na célula

A construção feita no pKANNIBAL, foi subclonada no vetor de bombardeamento pAC321 (Figura 3) como fragmento da endonuclease *NotI* e então introduzida em *E.coli* Top10F⁷ por eletroporação. O vetor pAC321 (ARAGÃO *et al.*, 2000), contém o cassete de expressão do gene *ahas* mutado de *A. thaliana*, incluindo promotor, peptídeo sinal, sequência codificante e terminador para seleção das plantas regenerados com o herbicida *imazapyr* (ARAGÃO *et al.*, 2000, RECH *et al.*, 2008). O vetor também contém um gene de resistência à ampicilina ou carbenicilina, para facilitar o processo de clonagem em *Escherichia coli*.

3.2.9 Preparação do vetor de bombardeamento pAC321::VuChiIS

Após a confirmação do plasmídeo de bombardeamento por digestão foi conduzida uma preparação em larga escala (Maxiprep) do vetor recombinante para ser utilizada nos experimentos de bombardeamento.

A maxiprep foi conduzida de acordo com o protocolo cedido pelo pesquisador Dr. Francisco José Lima Aragão descrito a seguir. Do estoque em glicerol de pAC321::VuChiIS foi feita uma cultura em meio LB ágar contendo estreptomicina 30 mg/L e carbenicilina 100 mg/L. Uma colônia isolada foi inoculada em 3 mL de meio LB acrescido dos antibióticos supracitados. A suspensão foi incubada em agitador orbital a 37 °C por 18 horas. Uma alíquota de 500 µL foi inoculada em 500 mL de meio LB acrescido de carbenicilina 100 mg/L e estreptomicina 30 mg/L e incubada em agitador orbital a 37 °C por 18 horas. A suspensão bacteriana foi distribuída em frascos de centrifuga graduados de 50 mL equilibrados e centrifugados em Centrifuga Eppendorf 5810R por dez minutos a 5.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 25 mL de solução L (Tris-HCl pH 8,0, 20 mM, EDTA 10 mM, NaCl 0,15 M, RNase A 100ug/mL). A suspensão obtida foi transferida para tubos de centrifuga de vidro (Corex), equilibrada e centrifugada por 10 minutos a 5.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 6,25 mL de solução I (Tris-HCl 25 mM-pH 8,0, EDTA 10 mM, Glucose 50 mM). A suspensão foi agitada em *vortex* até que todo o precipitado fosse homogeneizado. Em seguida foram adicionados 6,25 mL da solução I contendo 25 mg de lisozima e incubado em gelo por 25 minutos agitando cuidadosamente. Após a incubação foram adicionados 25 mL da solução II (NaOH 200 mM e SDS 1%) e incubada em gelo por dez minutos. Após o período de incubação em gelo foram adicionados 18,75 mL da solução III (Acetato de potássio 5M, pH 4,8, Ácido acético 2 M) e a suspensão foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Os tubos foram equilibrados e centrifugados por 60 minutos a 10.000 rpm a 4 °C.

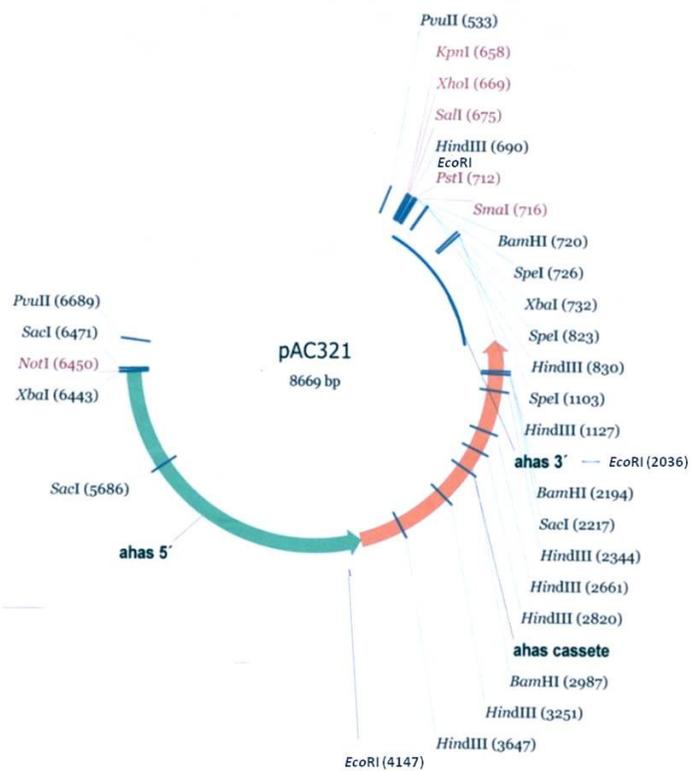


Figura 3: Mapa circular do vetor pAC321 (ARAGÃO *et al.*, 2000, RECH *et al.*, 2008)

O sobrenadante foi recuperado e transferido para tubos de centrifuga de vidro (Corex) limpos. Foram adicionados igual volume (do sobrenadante) de isopropanol, homogeneizado e incubado a 25 °C por dez minutos. Os tubos foram equilibrados e centrifugados por 30 minutos a 10.000 rpm a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado deixado secar a temperatura ambiente. O precipitado foi dissolvido em 1 mL de TE (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM), transferido para dois tubos de microcentrifuga de 1,5 mL e tratado com RNase A (20 µg/mL) por 30 minutos a 37 °C. Em seguida foram adicionados 20 µL de NaCl 5M e 150 µL de SDS 10% e os tubos foram agitados em *vortex*. Após a agitação foram adicionados 500 µL de “clorofane” (50 ml de fenol, 48 ml de clorofórmio, 2 ml de álcool isoamílico), a solução foi agitada e centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e adicionado de 500 µL de “clorofil” (96 ml de clorofórmio, 4 mL de álcool isoamílico), a solução foi agitada em *vortex* e centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 40 µL de NaCl 5M e o mesmo volume da solução de isopropanol e a solução foi agitada por inversão dos tubos e incubada a 25 °C por 30 minutos para esperar o DNA precipitar. Após a precipitação os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado 2 vezes com 1 mL de etanol 70% e centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm.

Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco e dissolvido em 100 µL de solução Tris-HCl 20 mM-pH 8,0, EDTA 0,01 mM.

3.2.10 Transformação genética e regeneração de feijão-caupi

Sementes de feijão-caupi cultivar BRS Novaera (FREIRE FILHO *et al.*, 2008) tiveram suas superfícies limpas por imersão em etanol 70% por 1 minuto seguido por imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos e lavagem por três vezes com água destilada estéril. Em seguida as sementes foram embebidas em água destilada por 18 a 20 horas. O eixo embrionário foi excisado das sementes e o meristema apical foi exposto pela remoção das folhas primárias e dos primórdios foliares com o auxílio de uma lupa. Os eixos embrionários foram posicionados no meio de bombardeamento (Sais MS-Murashige e Skoog 1962 , Sacarose 3%, fitagel 0,8%, pH 5,7) com a região do meristema apical posicionada para cima. Foram utilizadas placas de Petri com 5 cm de diâmetro e contendo 12 mL de meio de bombardeamento.

O bombardeamento foi conduzido como previamente descrito (IVO *et al.*, 2008) com o plasmídeo pAC321, o qual contém o gene mutante *ahas* de *Arabidopsis thaliana* (ARAGÃO

et al., 2000, RECH *et al.*, 2008) para seleção das plantas modificadas com o herbicida *imazapyr* e o cassete de silenciamento do gene de uma quitinase de classe I de feijão-caupi sob o controle do promotor CaMV35S.

Após o bombardeamento, os eixos embrionários foram transferidos para meio de seleção e indução de partes aéreas (meio MS basal suplementado com 5 mg/L de BAP, 3% de sacarose, 200 nM de *imazapyr* e 0,6% de Agar, pH 5,7) em frascos “*baby-food*” contendo 15 mL de meio de cultura, cultivados a 26 °C em fotoperíodo de 16 horas ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Assim que as partes aéreas derivadas dos eixos embrionários atingiram um tamanho de 2 a 3 cm de comprimento, uma secção de 1 mm de comprimento foi removida de cada folha e o DNA genômico extraído de discos foliares como previamente descrito no tópico 3.2.1 deste capítulo. O DNA foi utilizado para análise para a expressão do cassete de silenciamento da quitinase por PCR. Cada reação de PCR foi conduzida em aliquotas de 25 μL contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 160 μM de cada dNTP, 200 nM de cada iniciador, 2 U de *Taq* polimerase (Invitrogen) e 20 a 30 ng de DNA genômico. Os iniciadores CAMV35SF (5'-CCACTATCCTTCGCAAGAC-3') e QuiHindKpn (5'-TTGGTACCAAGCTTAGACGACGGGGTCG-3') foram utilizados para amplificar uma seqüência de 920 pb. A mistura foi desnaturada por 5 minutos a 95 °C em um termociclador BioRad e amplificada por 35 ciclos (95 °C por um minuto, 55 °C por um minuto, 72 °C por um minuto) com um ciclo final de sete minutos a 72 °C. A mistura de reação foi então pipetada em um gel de agarose 1% e visualizada em luz UV após a amostra ser corada em uma solução de brometo de etídio.

As plantas que tiveram a transformação com o fragmento de silenciamento de *VuChiI* confirmadas foram transferidas para meio MS suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar e 3 g/L de carvão ativo para enraizamento. As plantas enraizadas foram transferidas individualmente para potes plásticos contendo 0,2 dm³ de uma mistura autoclavada de solo fertilizado: vermiculita (1:1), cobertos com um saco plástico transparente selado com uma liga de borracha e mantidos em casa de vegetação. Após uma semana, a liga de borracha foi removida. Após mais uma semana o saco plástico também foi removido. Logo que as plantas aclimatadas atingiram aproximadamente 10 cm de comprimento elas foram transferidas para vasos contendo 5 dm³ de solo fertilizado e mantidas em casa de vegetação para produzir sementes.

Depois do bombardeamento os eixos embrionários foram transferidos para o meio de seleção e indução de partes aéreas (Sais MS suplementado com 5 mg/L de BAP (6-Benzilaminopurina), 3% de sacarose, 200 nM de *imazapyr* e 0,6% de ágar Sigma, pH 5,7) em

frascos contendo 15 mL do meio de cultura e cultivados por dois dias a 26 °C, na ausência de luz e então transferidas para um fotoperíodo de 16 horas. Quando as partes aéreas obtidas atingiram de 2 a 3 centímetros de comprimento um pequeno segmento da folha de 1 mm² foi removido para análise da expressão do fragmento de silenciamento do gene da quitinase de classe I.

3.2.11 Triagem das plantas transgênicas por PCR

O DNA foi extraído de discos foliares das plantas transformadas de acordo com o protocolo citado no primeiro tópico da metodologia. Cada reação de PCR foi conduzida em aliquotas de 25 µL contendo Tris-HCl 10mM-pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 160 µM, iniciadores 200 nM, Taq polimerase 2 U (Invitrogen) e 20 a 30 ng de DNA genômico. Os iniciadores AHASP124 (5'-ACTAGAGATTCCAGCGTCAC-3' no promotor do gene mutante *ahas*) e AHAS500C (5'-GTGGCTATACAGATACCTGG-3' na sequência codificante do gene mutante *ahas*) foram utilizados para amplificar uma sequência de 685 pb. Os primers CAMV35SF (5'-CCACTATCCTTCGCAAGAC-3') e QuiHindKpn (5'-TTGGTACCAAGCTTAGACGACGGGGTCG-3') foram utilizados para amplificar uma sequência de 920 pb. A mistura foi desnaturada por 5 minutos a 95 °C em um termociclador (*MyCycler Thermal Cycler* BioRad) e amplificada por 35 ciclos (95 °C por um minuto, 55 °C por um minuto, 72 °C por um minuto) com um ciclo final de sete minutos a 72 °C. A mistura de reação foi então pipetada em um gel de agarose 1% e visualizada em luz UV após a amostra ser corada em uma solução de brometo de etídio.

As plantas com expressão do fragmento de silenciamento do gene da quitinase de classe I foram transferidas para meio MS suplementado com 3% de sacarose, 3g/L de carvão ativado e 0,6% de ágar para enraizamento.

3.2.12 Análise por Northern blot

O RNA total foi isolado a partir de folhas por extração com o reagente TRIzol (Invitrogen) das plantas do controle negativo e das plantas transformadas com o vetor de silenciamento. Folhas jovens foram maceradas em nitrogênio líquido em um cadinho com o auxílio de um pistilo. Uma alíquota de 100 mg da amostra foi transferida para tubos de centrifuga graduados de 14 mL contendo 1 mL de TRIzol. A amostra foi homogeneizada e incubada a 15 °C por cinco minutos. Após esse período a amostra foi submetida a

centrifugação a 12.000 x g por dez minutos a 4 °C. Foram adicionados 0,2 µL de clorofórmio e a suspensão foi agitada por 15 segundos, seguido de incubação a 15 °C por 3 minutos. Os tubos foram centrifugados a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação a fase sobrenadante foi coletada e transferida para novo tubo e então submetida à precipitação com 500 µL de isopropanol gelado por dez minutos a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 12.000 x g por dez minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado de 750 µL de Etanol. Em seguida a amostra foi centrifugada a 7.500 x g por cinco minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi homogeneizado em 30 µL água ultra-pura. O *Northern blot* foi conduzido como descrito por Sambrook e Russel (2001). O RNA total (50 µg) foi separado em PAGE 20% com Uréia 7M e Tris-borato-EDTA (TBE) 1x. A corrida foi realizada em aparato STURDIER SE400 (GE) a 210 V, 20 mA por quatro horas. Após a corrida eletroforética o gel foi corado com TBE 1x contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL), e fotografado em transluminador ultravioleta. A revelação do gel mostrou a presença de tRNAs e 5S rRNA.

As amostras de RNA no gel foram transferidos para uma membrana Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, U.K.) em um trans-blot semy-dry (Biorad) a 22 V, 250 mA, por 24 horas. Em seguida a membrana foi fixada no UV Stratalinker 2400 (Stratagene) utilizando a função *auto-crosslink* do equipamento. A membrana fixada foi submetida à hibridização com uma sonda radioativa de DNA correspondente ao fragmento de PCR amplificado utilizando o par de iniciadores *QuiXhoXba* e *QuiHindKpn* (específico para o fragmento de silenciamento do gene da quitinase *VuChiIS*). A sonda foi marcada com ³²P dCTP utilizando um *kit Random Primer DNA Labeling* (Amersham Pharmacia Biotech) de acordo com as instruções do fabricante. As lavagens de hibridização e pós-hibridização foram conduzidas como descrito por Yoo *et al.* (2004). Quatro oligômeros (com 18, 24, 39 e 44 pares de bases) foram usados como marcadores de massa molecular. Após a hibridização a membrana foi autoradiografada em uma chapa e visualizada no *scanner* FLA 3000 (Fujifilm).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construção do vetor de bombardeamento

O DNA de dez clones escolhidos aleatoriamente de pGEM-T Easy::VuChiIS foi purificado com o kit *Wizard Plus SV* (Promega) e completamente sequenciado. O alinhamento das sequências obtidas com a sequência do clone utilizado como molde nas reações de PCR mostrou que dois clones (denominados VuChiIS 3 e VuChiIS 6) apresentavam completa identidade com a sequência original (usada como molde na PCR). O clone 3 foi então escolhido para a continuidade do trabalho (Figura 4).

O fragmento de silenciamento foi recuperado do vetor pGEM-T Easy::VuChiIS por digestão com *XbaI* e *HindIII* e clonado no vetor pKANNIBAL. O DNA extraído de dez clones selecionados ao acaso foi submetido a reação de digestão com *XbaI* e *HindIII*. O resultado evidenciou que todos os clones submetidos à reação de digestão apresentavam o inserto na orientação senso (Figura 5). O resultado também foi confirmado por reação de PCR (dados não apresentados).

Um dos clones obtidos na primeira reação de clonagem em pKANNIBAL foi escolhido para o segundo passo da construção do vetor que consistia na inserção do fragmento na direção oposta no outro sítio de clonagem de pKANNIBAL (ver Figura 1 na metodologia). Para realizar o segundo passo de clonagem o fragmento de silenciamento de pGEM-T Easy::VuChiIS foi recuperado desta vez por digestão com *XhoI* e *KpnI* para ser clonado no vetor de silenciamento na orientação anti-senso. O DNA de dez clones escolhidos ao acaso foi utilizado em uma reação de digestão com *XhoI* e *KpnI*. O resultado da digestão evidencia que todos os clones submetidos à reação de digestão apresentaram o inserto (Figura 6). O resultado também foi confirmado por reação de PCR (dados não apresentados). As amostras de DNA dos clones portando o vetor recombinante pKANNIBAL::VuChiIS foram também submetidas a reação de digestão com *XbaI*, com o intuito de detectar um fragmento de aproximadamente 1.822 pb. Essa sequência de DNA é a responsável por desencadear o mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) mediado por RNA levando a formação da estrutura em forma de grampo (*intron hairpin RNA*) nos ribossomos das células vegetais e é composta por um fragmento de silenciamento da quitinase na orientação senso,

```

Clone_R7      CAGTGTGGAAGCCAAGCGGGGGTGCCTGTGTCCAGAGGGTCTCTGTGCAGTCAGTTC 60
Clone_K6      -----
Clone_K3      -----

Clone_R7      GGGTGGTGC GGCTCCACCGACGACTACTGCGGCAAGGGTTGCCAGAGCCAGTGC GGGGGA 120
Clone_K6      -----ACTACTGCGGCAAGGGTTGCCAGAGCCAGTGC GGGGGA 38
Clone_K3      -----ACTACTGCGGCAAGGGTTGCCAGAGCCAGTGC GGGGGA 38
*****

Clone_R7      CAGCCGGCTCCGTCTGATCTCAGCGCTCTGATACCCAGGGCCACCTTCGACCAGATGCTC 180
Clone_K6      CAGCCGGCTCCGTCTGATCTCAGCGCTCTGATACCCAGGGCCACCTTCGACCAGATGCTC 98
Clone_K3      CAGCCGGCTCCGTCTGATCTCAGCGCTCTGATACCCAGGGCCACCTTCGACCAGATGCTC 98
*****

Clone_R7      AAACATCGCAACGACGGAGCCTGCCAGCCAGAGGCTTCTACACCTACGATGCCTTCATC 240
Clone_K6      AAACATCGCAACGACGGAGCCTGCCAGCCAGAGGCTTCTACACCTACGATGCCTTCATC 158
Clone_K3      AAACATCGCAACGACGGAGCCTGCCAGCCAGAGGCTTCTACACCTACGATGCCTTCATC 158
*****

Clone_R7      GCCGCCGCCAGGGCTTCCCCAGCTTCGGCAACACCCGGAGACACAGCCACTCGAAAGAGA 300
Clone_K6      GCCGCCGCCAGGGCTTCCCCAGCTTCGGCAACACCCGGAGACACAGCCACTCGAAAGAGA 218
Clone_K3      GCCGCCGCCAGGGCTTCCCCAGCTTCGGCAACACCCGGAGACACAGCCACTCGAAAGAGA 218
*****

Clone_R7      GAGATCGCGGCTTCTTGGGGCAAACGTCTCACGAAACAACCGGGGGATGGCCCTCTGCA 360
Clone_K6      GAGATCGCGGCTTCTTGGGGCAAACGTCTCACGAAACAACCGGGGGATGGCCCTCTGCA 278
Clone_K3      GAGATCGCGGCTTCTTGGGGCAAACGTCTCACGAAACAACCGGGGGATGGCCCTCTGCA 278
*****

Clone_R7      CCGGACGGACCATAACGCATGGGGTTACTGCTTCGTGAGAGAGCAGAACCCAAGCGCCTAC 420
Clone_K6      CCGGACGGACCATAACGCATGGGGTTACTGCTTCGTGAGAGAGCAGAACCCAAGCGCCTAC 338
Clone_K3      CCGGACGGACCATAACGCATGGGGTTACTGCTTCGTGAGAGAGCAGAACCCAAGCGCCTAC 338
*****

Clone_R7      TGCTCCCAACCCCGCAGTTCCCTGCGCTTCTGGCCAGCAATACTATGGCAGGGGTCGG 480
Clone_K6      TGCTCCCAACCCCGCAGTTCCCTGCGCTTCTGGCCAGCAATACTATGGCAGGGGTCGG 398
Clone_K3      TGCTCCCAACCCCGCAGTTCCCTGCGCTTCTGGCCAGCAATACTATGGCAGGGGTCGG 398
*****

Clone_R7      ATCCAGATATCCTGGAAC TACAAC TACGGTCAGTGC GGAATGCAATTGGAGTGGATTG 540
Clone_K6      ATCCAGATATCCTGGAAC TACAAC TACGGTCAGTGC GGAATGCAATTGGAGTGGATTG 458
Clone_K3      ATCCAGATATCCTGGAAC TACAAC TACGGTCAGTGC GGAATGCAATTGGAGTGGATTG 458
*****

Clone_R7      ATCAACAACCTGATCTCGTCGCCACCGACCCCGTCGTCTCCTCAAGTCCGCGCATCTGG 600
Clone_K6      ATCAACAACCTGATCTCGTCGCCACCGACCCCGTCGTCT----- 498
Clone_K3      ATCAACAACCTGATCTCGTCGCCACCGACCCCGTCGTCT----- 498
*****

Clone_R7      TTCTGGATGACCCCGCAGTCCCCAAGCCTTCTCTCCACGACGTCATCACCTCTCAGTGG 660
Clone_K6      -----
Clone_K3      -----

Clone_R7      ACTCCCTCCGCGCCGATGTGCGCGCCGGGAAGCTTCCAGGCTACGGCACTGTGACGAAC 720
Clone_K6      -----
Clone_K3      -----

Clone_R7      ATCATCAACGGAGGCTGGAGTGC GGCAGAGGACAGGATAGCAGGGTGGAGGACCGCATC 780
Clone_K6      -----
Clone_K3      -----

Clone_R7      GGGTCTTCAAGCGATACTGTGATCTGTTTGGAGTTGGTTATGGCAACAACCTTGACTGC 840
Clone_K6      -----
Clone_K3      -----

Clone_R7      TACTCTCAGGCCCATTTGGAAATCCCTGCTTAATCTCCATCCCATCGTCTGA 894
Clone_K6      -----
Clone_K3      -----

```

Figura 4: Alinhamento das seqüências dos clones de silenciamento de *VuChiI* denominados K3 (*VuChiIS 3*) e K6 (*VuChiIS 6*) (excluindo-se as seqüências extras, adicionadas aos iniciadores) com a seqüência do clone R7 (*VuChiI*), usado como molde nas reações de PCR. As seqüências apresentam 100% de similaridade, não sendo detectada mutações nos clones

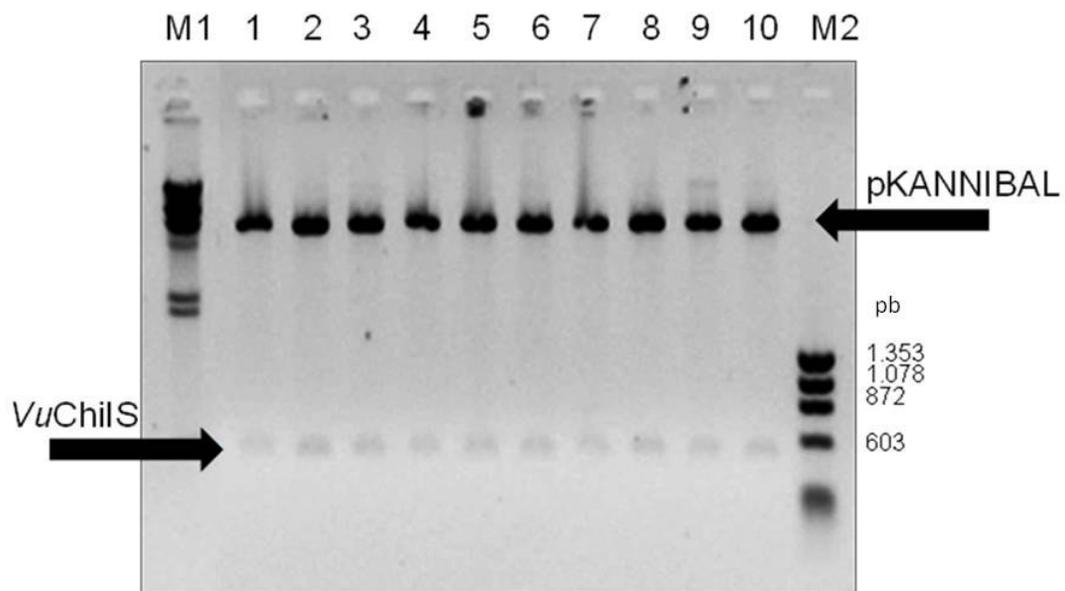


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de digestão de pKANNIBAL::VuChiIS (1ª subclonagem) com as enzimas *Xba*I e *Hind*III. M1: Marcador DNA λ digerido com *Hind*III (125 ng); M2: DNA ϕ X174 digerido com *Hae*III (125 ng); Poços 1-10: DNA plasmidial dos clones, digerido com *Xba*I e *Hind*III

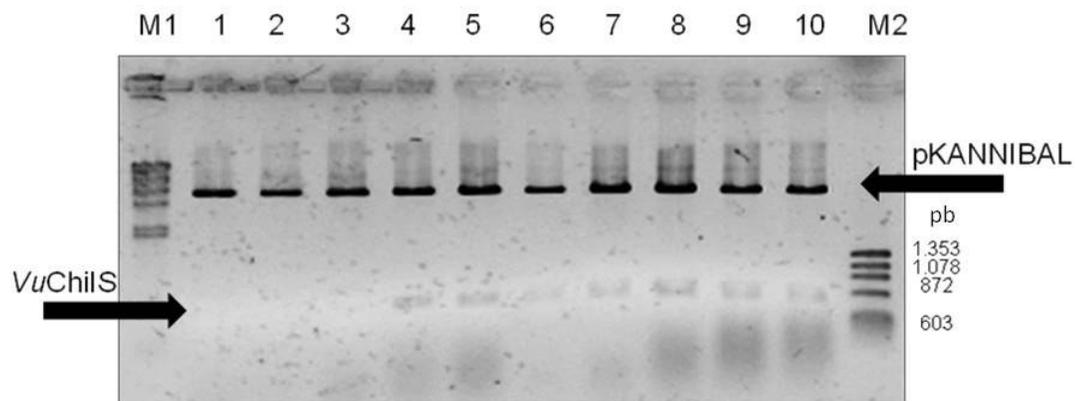


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de digestão de pKANNIBALVuChiIS (2ª subclonagem) com as enzimas *XhoI* e *KpnI*. M1: DNA λ digerido com *HindIII* (125 ng); M2: DNA ϕ X174 digerido com *HaeIII* (125 ng); Poços 1-10: DNA plasmidial dos clones, digerido com *XhoI* e *KpnI*

um intron *pdk* (*pyruvate orthophosphate dikinase*), e outro fragmento de silenciamento da quitinase na orientação antisenso (ver Figura 2). O uso de um intron separando os dois fragmentos de DNA complementares aumenta muito a eficiência do processo de silenciamento em comparação com construções que utilizem apenas as sequências autocomplementares, construções de co-supressão e construções antisenso (WESLEY *et al.*, 2001). Todos os clones testados apresentaram o fragmento de 1.822 pb (Figura 7). Um dos clones portando o vetor recombinante pKANNIBAL::*VuChiIS* foi utilizado no processo de clonagem do cassete de silenciamento no vetor de bombardeamento pAC321.

Os vetores pAC321 e pKANNIBAL::*VuChiI* foram submetidos à reação de digestão com *NotI* para linearizar o vetor de bombardeamento (pAC321) e para retirar completamente o cassete de expressão do vetor de silenciamento (pKANNIBAL::*VuChiI*). O produto da reação de digestão contendo o cassete de silenciamento foi clonado no vetor pAC321. O processo de clonagem resultou na produção de apenas cinco clones. O cassete de silenciamento apresenta um tamanho de 3956 pb e o vetor pAC321, 8669 pb. Os cinco clones do vetor de bombardeamento pAC321::*VuChiIS* recombinante foram digeridos com *NotI* para confirmar a integração da construção de silenciamento de *VuChiI* em pAC321 e apenas o clone 4 foi confirmado portando o cassete de expressão para o silenciamento de *VuChiI* (Figura 8).

Após a confirmação da transformação, foi conduzida uma preparação em larga escala (Maxiprep) do vetor recombinante pAC321::*VuChiIS* para ser utilizada nos experimentos de bombardeamento que utilizam amostras do vetor concentradas para garantir a eficiência da transformação. A amostra obtida foi submetida à reação de digestão com a enzima de restrição *XbaI*, para a verificação de possíveis mutações nesse sítio e a detecção do fragmento de silenciamento de 1822 pb no vetor final e do gene *ahas* com o promotor e terminador de 5711 pb. O resultado da digestão mostrou as bandas esperadas de tamanhos 5711, 3776, 1822 e 1352 pb (Figura 9).

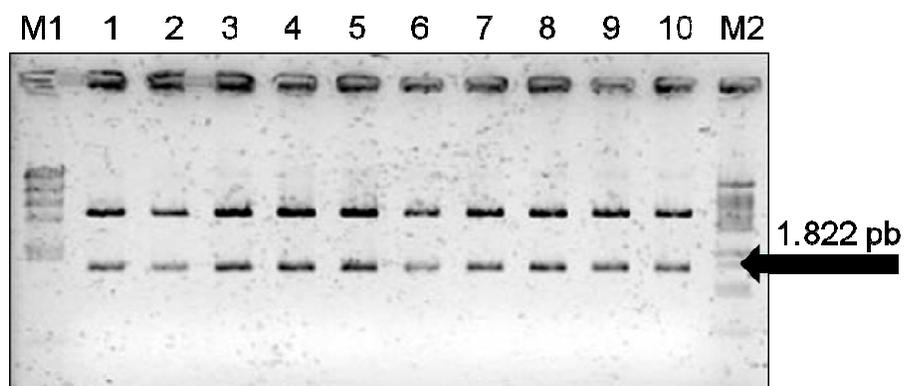


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de digestão de pKANNIBAL::*VuChiIS* (2ª subclonagem) com a enzima *XbaI*. M1: DNA λ digerido com *HindIII* (125 ng); M2: DNA λ digerido com *BstEII* (125 ng); Poços 1-10: DNA plasmidial dos clones, digerido com *XbaI*

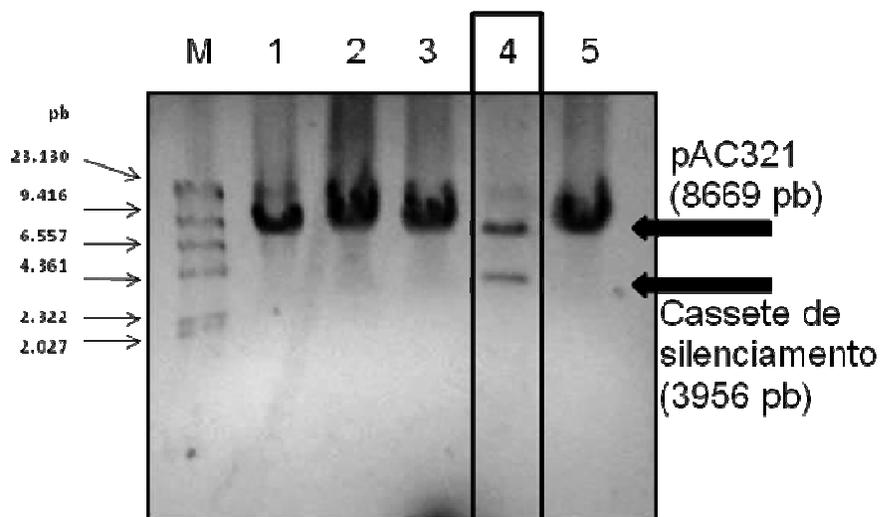


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de digestão de pAC321::*VuChiIS* com a enzima *Not I*. M: DNA λ digerido com *HindIII* (125 ng); Poços 1-5: DNA plasmidial dos clones, digerido com *Not I*. As bandas formadas no poço 4 correspondem ao vetor pAC321 linearizado (8669 pb) e ao cassete de silenciamento (3956 pb)

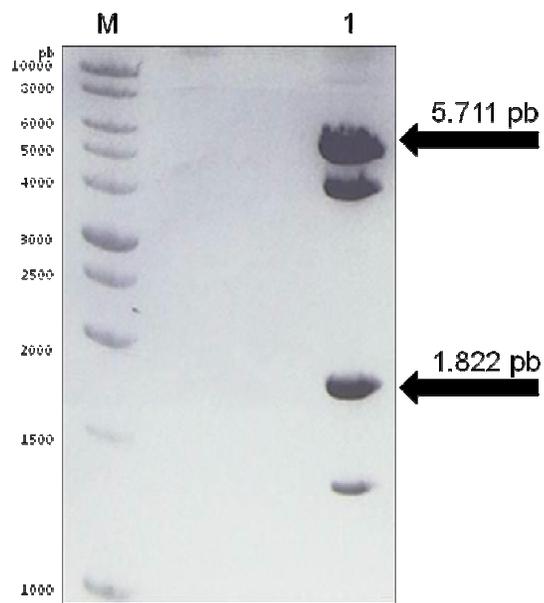


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de digestão do clone 4 de pAC321::VuChiIS com a endonuclease *Xba*I. M: DNA 1 Kb *Ladder* (125 ng); Poço 1: DNA plasmidial de pAC321::VuChiIS, digerido com *Xba*I

4.2 Bombardeamento e regeneração *in vitro*

Foram bombardeados 1.092 meristemas apicais de eixos embrionários extraídos de sementes de feijão-caupi com o vetor pAC321*VuChiIS*. Os experimentos de bombardeamento produziram 86 plantas regeneradas em meio seletivo, e todas essas plantas tiveram seu DNA genômico extraído e utilizado como molde em reações de PCR utilizando iniciadores específicos para quitinase e para o gene *ahas* que confere resistência a imazapyr. Por se tratar de DNA genômico extraído de plantas de feijão-caupi o uso da combinação de iniciadores *QuiXhoXba* e *QuiHindKpn* foi evitado, já que poderia acontecer a amplificação de quitinases endógenas do feijão-caupi, invalidando o controle negativo da reação. A segunda reação de PCR a que as plantas foram submetidas foi conduzida com o objetivo de verificar a presença do gene *ahas*. A reação foi conduzida utilizando os iniciadores AHASP124 e AHAS500C. Apenas cinco plantas, clones 3, 5, 61, 62 e 64 (Figuras 11a e 12a), tiveram a confirmação da integração do transgene *VuChiIS* por PCR e apenas quatro plantas, clones 3, 5, 61 e 64 (Figuras 11b e 12b) apresentaram amplificação do gene *ahas*. As plantas que tiveram a inserção dos transgenes confirmadas por reação de PCR (Figuras 11, 12) foram aclimatadas e em seguida transferidas para vasos com o substrato composto de um mistura autoclavada de solo fertilizado: vermiculita (1:1).

Foi observada uma alta frequência de escape, aproximadamente 85% do total de plantas regeneradas. Uma das plantas transgênicas (clone 62) apresentou integração apenas do fragmento de silenciamento da quitinase, não exibindo amplificação do gene *ahas* por PCR com iniciadores específicos para amplificar um fragmento de 685 pb na sequência do gene (Figura 12b) o que pode ter acontecido devido à fragmentação do vetor durante o processo de bombardeamento ou apenas um problema durante a reação de amplificação já que a planta foi regenerada em meio seletivo contendo *imazapyr*. Yamamoto *et al.* (2000) em seu trabalho com plantas de parreira expressando uma quitinase de classe I de arroz também detectaram a introdução de apenas um dos genes presente no vetor de transformação, só que neste caso o gene detectado foi do marcador de seleção *nptII*.



Figura 10: Plântula de feijão-caupi transformada geneticamente via bombardeamento de micropartículas e regenerada em meio de seleção MS adicionado de sacarose 3%, Agar 0,7%, BAP 10 mg/L e *imazapyr* 200 nM. Nesse estágio as plântulas tiveram uma secção de suas folhas retirada e o DNA extraído para testes de confirmação por PCR. Barra = 1 cm

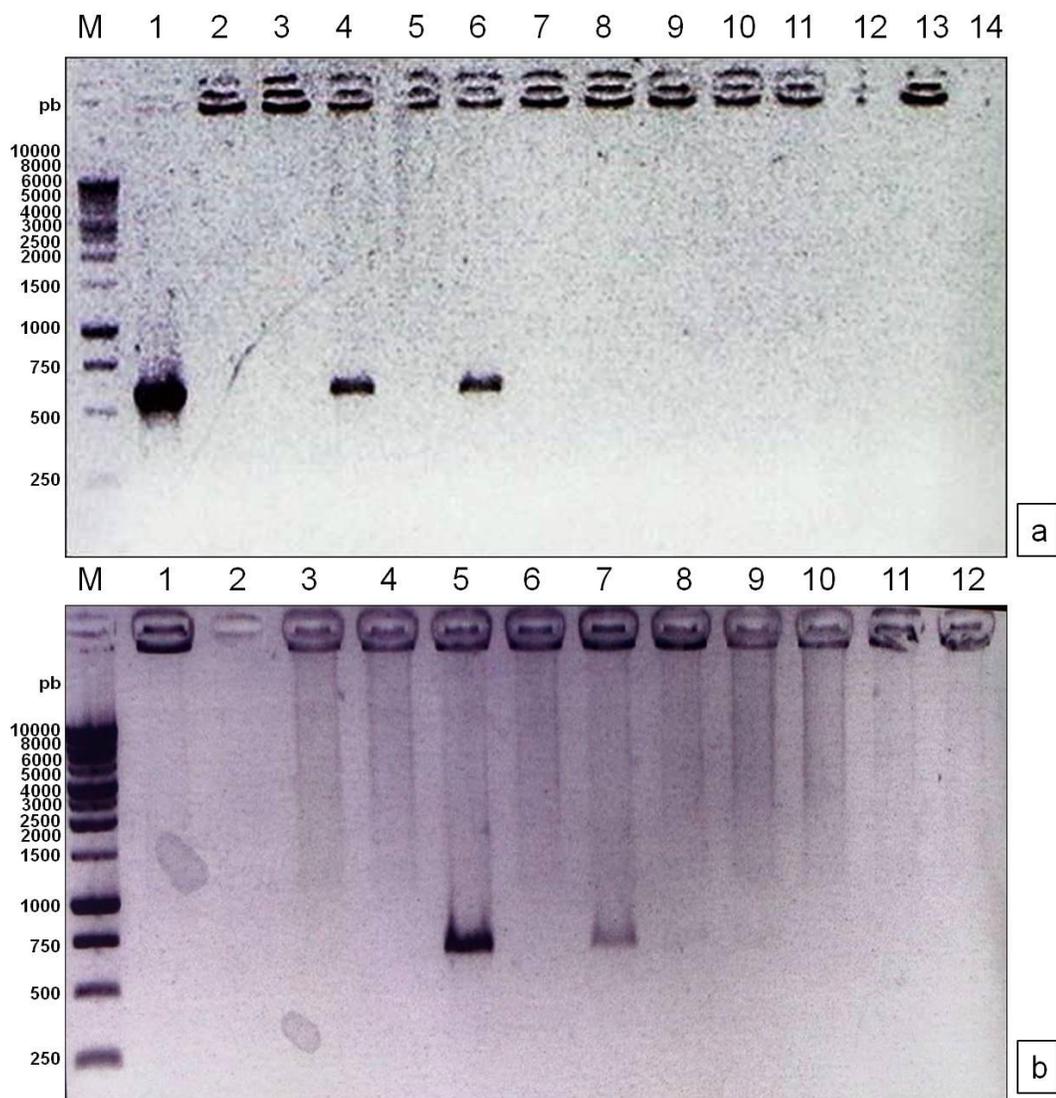


Figura 11: a) Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de amplificação do DNA genômico extraído das plantas de feijão-caupi regeneradas em meio seletivo utilizando os iniciadores CAMV35SF e *QuiHindKpn*. M: DNA 1 Kb *Ladder* (125 ng); Poço 1: controle positivo (vetor pAC321::*VuChiIS*); Poços 2 a 14: Reação de amplificação do DNA genômico extraído das plantas clones 1 a 10. Plantas 3 e 5 nos poços 4 e 6 apresentaram amplificação do fragmento de silenciamento. b) Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de amplificação do DNA genômico extraído das plantas de feijão-caupi regeneradas em meio seletivo utilizando os iniciadores AHASP124 e AHAS500C. M: DNA 1 Kb *Ladder* (125 ng); Poços 1 a 10: Reação de amplificação do DNA genômico extraído das plantas clones 1 a 10. Plantas 3 e 5 nos poços 5 e 7 apresentaram amplificação de um fragmento do gene mutante *ahas* de 685 pb

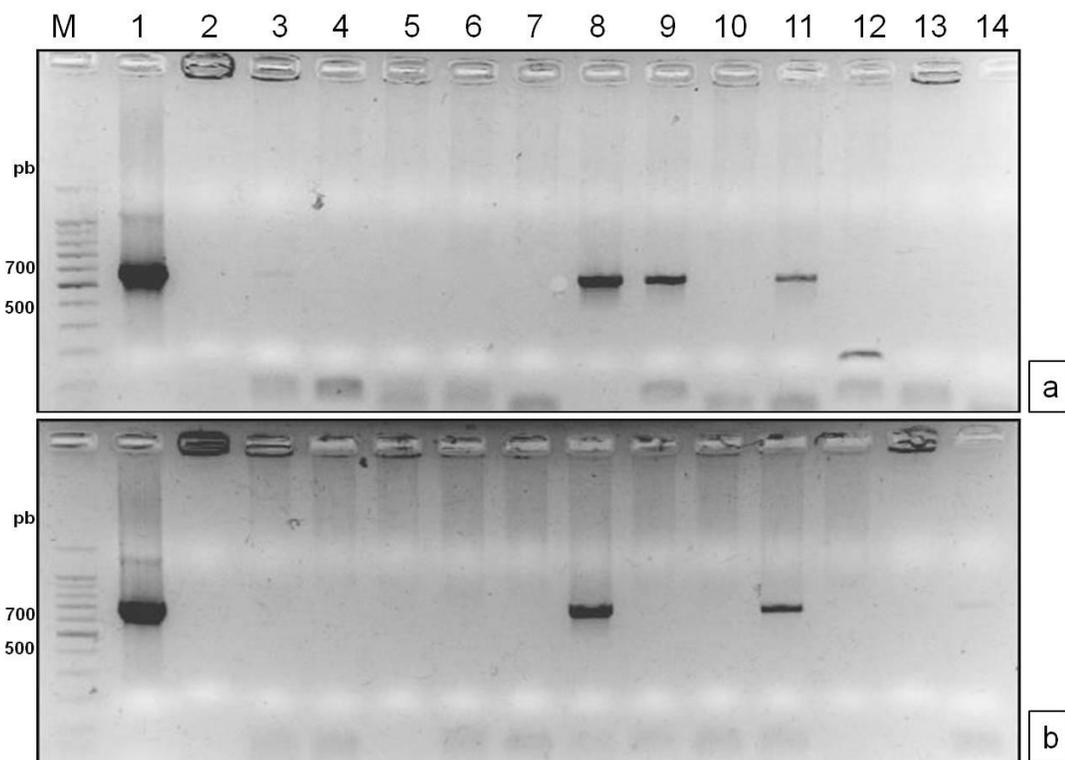


Figura 12: a) Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de amplificação do DNA genômico extraído das plantas de feijão-caupi regeneradas em meio seletivo utilizando os iniciadores CAMV35SF e QuiHindKpn. M: DNA 1 Kb *Ladder* (125 ng); Poço 1: controle positivo (vetor pAC321::VuChiS); Poços 2 a 12: Reação de amplificação do DNA genômico extraído das plantas clones 55 a 65. Plantas 61, 62 e 64 nos poços 8, 9 e 11 apresentaram amplificação do fragmento de silenciamento. b) Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de amplificação do DNA genômico extraído das plantas de feijão-caupi regeneradas em meio seletivo utilizando os iniciadores AHASP124 e AHAS500C. M: DNA 1 Kb *Ladder* (125 ng); Poço 1: controle positivo (vetor pAC321::VuChiS); Poços 2 a 12: Reação de amplificação do DNA genômico extraído das plantas clones 55 a 65. Plantas 61 e 64 nos poços 8 e 11 apresentaram amplificação de um fragmento do gene mutante *ahas* de 685 pb

Durante o processo de aclimação apenas duas destas plantas sobreviveram se transformando em plantas adultas (Figura 13). As plantas transformadas e do controle positivo começaram a florar em aproximadamente 45 dias, o que é normal para esse cultivar que é relatado na literatura atingir floração plena em 41 dias (FREIRE FILHO *et al.*, 2008). As vagens provenientes das flores nas plantas putativamente transgênicas não se desenvolveram normalmente, sofrendo senescência antes de atingir a maturidade e nunca atingindo mais do que dois centímetros de comprimento (Figura 13 h). As plantas transformadas também começaram a apresentar multibrotamento nas suas bases. Além disso, essas plantas transformadas apresentaram um tempo de vida de mais de um ano o que não é normal para plantas de feijão-caupi. Segundo Freire Filho *et al.* (2008), o ciclo de vida típico deste cultivar de feijão-caupi é de 65 a 70 dias. Por volta do décimo mês após a aclimação uma das plantas (clone 5) produziu uma vagem que se desenvolveu normalmente originando seis sementes, a outra planta (clone 3) senesceu sem deixar descendência. Das seis sementes produzidas pela vagem da planta do clone 5 apenas uma germinou dando origem a uma planta quando cultivadas em substrato composto de um mistura autoclavada de solo fertilizado: vermiculita (1:1). O fato de algumas sementes não germinarem além da dificuldade de se obter vagens das linhagens parentais pode ser um indício de que o gene da quitinase de classe I de feijão-caupi possa ter algum papel no desenvolvimento embrionário. Nogueira *et al.* (2007), indicou um possível papel de *VuChiI* na embriogênese somática em cultura de células embriogênicas de feijão-caupi. Correia (2007) detectou a expressão de *VuChiI* em sementes de feijão-caupi durante o desenvolvimento. Um exemplo clássico é o de uma endoquitinase acídica de 32-kDa de cenoura capaz de promover a transição do estágio de globular para o de torpedo de embriões mutantes termosensíveis em uma temperatura não permissiva (DE JONG *et al.*, 1992, 1993).

A modificação genética de plantas, bem como fatores de estresse podem induzir variações epigenéticas. Essas variações não são bem compreendidas até o momento, mas sabe-se que podem ser causadas por efeitos pleiotrópicos do DNA integrado no genoma vegetal, a influência do local de integração e a arquitetura do transgene sobre o nível de expressão e estabilidade e o efeito de estresses causados pela cultura de tecidos. Estudos empregando técnicas analíticas e organismos modelo sequenciados estão sendo conduzidos com o intuito de esclarecer esse tipo de efeitos inesperados (FILIPECKI E MALEPSZY, 2006).

A frequência de transformação (0,46%) foi abaixo do esperado se comparada ao relatado para este protocolo de transformação de feijão-caupi, que é de 0,9% (IVO *et al.*,

2008), o que levaria a supor que o gene da quitinase de classe I de feijão-caupi pode conferir alguma característica indesejada as plantas que leva a sua morte antes da regeneração. No entanto a presença de plantas positivas para este transgene mantém a questão em aberto.

O gene *ahas* (codificando para a sintase do acetolactato) foi isolado de *Arabidopsis thaliana* e contém uma mutação na posição 653 pb, sendo um agente seletivo de células meristemáticas transgênicas (ARAGÃO *et al.*, 2000, IVO *et al.*, 2008, RECH *et al.*, 2008). A introdução deste gene em células vegetais confere tolerância ao herbicida *imazapyr*. A escolha da dose letal do herbicida de seleção (à qual os explantes não transformados são susceptíveis) é muito importante para que “escapes” sejam evitados no processo de regeneração dos transformantes. Por isso, o experimento realizado de transformação com o gene *ahas* mutante de plantas de feijão-caupi testando-se diferentes doses de *imazapyr* às quais os explantes eram susceptíveis foi muito útil, para que após a transformação não ocorresse a regeneração de explante de grupos controles e nem se utilize uma concentração elevada de *imazapyr* que poderia impedir o crescimento inclusive dos explantes transformados em meio seletivo (BALDONI, 2010, CITADIN, 2011). A escolha deste herbicida para seleção das plantas transformadas também foi acertada, pois o *imazapyr* se concentra no meristema apical da planta, justamente o explante transformado e submetido ao processo de regeneração neste trabalho.

O RNA total extraído das plantas transformadas 3 e 5 foi submetido a análise de *Northern blot* para detectar a presença de siRNAs. A hibridização apresentou bandas correspondentes a presença de siRNAs com tamanhos entre 39 e 44 pb conforme confirmados pelos oligômeros utilizados como marcadores (Figura 14). A presença dos siRNAs reforça o fato de que as plantas foram transformadas e a construção de silenciamento está funcional, porém não se pode afirmar com certeza que o gene de *VuChiI* foi silenciado.

As seis sementes da geração R1 do clone 5 foram semeadas em substrato composto de uma mistura de vermiculita e areia 1:1 autoclavada. Apenas uma semente da geração R1 germinou e o DNA genômico foi extraído de amostra foliar da planta, e submetido a uma reação de PCR. A reação de PCR resultou na amplificação da sequência correspondente ao cassete de silenciamento, entretanto a reação do branco também amplificou, tornando o resultado duvidoso. Estudos iniciais confirmam que a maioria dos genes exógenos introduzidos pelo processo de biobalística são normalmente transmitidos para a progênie (HINCHEE *et al.*, 1988, CHRISTOU *et al.*, 1989, MCCABE E MARTINELL 1993, ARAGÃO *et al.*, 2000, IVO *et al.*, 2008).

Para uma planta transgênica ser gerada, na maioria das vezes é necessária a realização de vários eventos de transformação até que um ou outro seja satisfatório (KIM E KRISHNAN, 2004, BONFIM *et al.*, 2007, SOLLETI *et al.*, 2008a). O promotor *PvChi4* de uma quitinase classe IV de feijão-caupi se mostrou ativo quando as plantas transformadas com uma construção quimérica desse promotor com o gene GUS foram submetidas ao choque térmico e a irradiação UV, além disso foi provado também que o promotor é modulado durante o desenvolvimento embrionário da planta (LIMA *et al.* 2002).

O feijão-caupi é uma planta diploide com 22 cromossomos (EHLERS E HALL, 1997) que totalizam aproximadamente 620 megabases de comprimento de genoma nuclear, o que o coloca como um dos menores genomas dentre as leguminosas e plantas vasculares em geral (CHEN *et al.*, 2007). Por ser um genoma relativamente pequeno, isso pode conferir menor plasticidade ao feijão-caupi e aumentar as chances de que plantas geneticamente transformadas apresentem diferentes tipos de mutações, em eventos de mutagênese insercional (FILIPECKI E MALEPSZY, 2006).

A formação profusa de ramificações nas plantas transformadas (Figura 13 d e g) pode ser um efeito do silenciamento da quitinase no desenvolvimento de plantas de feijão-caupi. Plantas transgênicas de tabaco que tiveram expressão de *CHRK1* (um receptor semelhante a uma quitinase de tabaco) suprimida exibiram anormalidades pleiotrópicas do desenvolvimento, incluindo a formação de calos no ápice de plântulas em processo de germinação além de alterações severas do desenvolvimento (profusa formação de partes aéreas, vitrificação). No nível celular ocorreu a proliferação celular ectópica, redução da especificidade celular e desenvolvimento aberrante dos cloroplastos. As linhagens transgênicas continham um nível de citocinina elevado em três vezes em comparação com as plantas selvagens e exibiram respostas típicas a citocininas como a supressão do estiolamento no escuro (LEE *et al.*, 2003). Esses relatos sugerem que as quitinases podem estar envolvidas no desenvolvimento da planta e na regulação da homeostasia da citocinina. Alguns autores já relataram que além da função relacionada a mecanismos de defesa, essas enzimas podem desempenhar diversos outros papéis, como a regulação de processos de crescimento e desenvolvimento em plantas (DE JONG *et al.*, 1992, 1993, KASPRZEWSKA, 2003, BOWMAN E FREE, 2006, DAHIYA *et al.*, 2006). Em plantas sadias, algumas quitinases vacuolares e apoplásticas são sintetizadas constitutivamente (GIJZEN *et al.*, 2001).

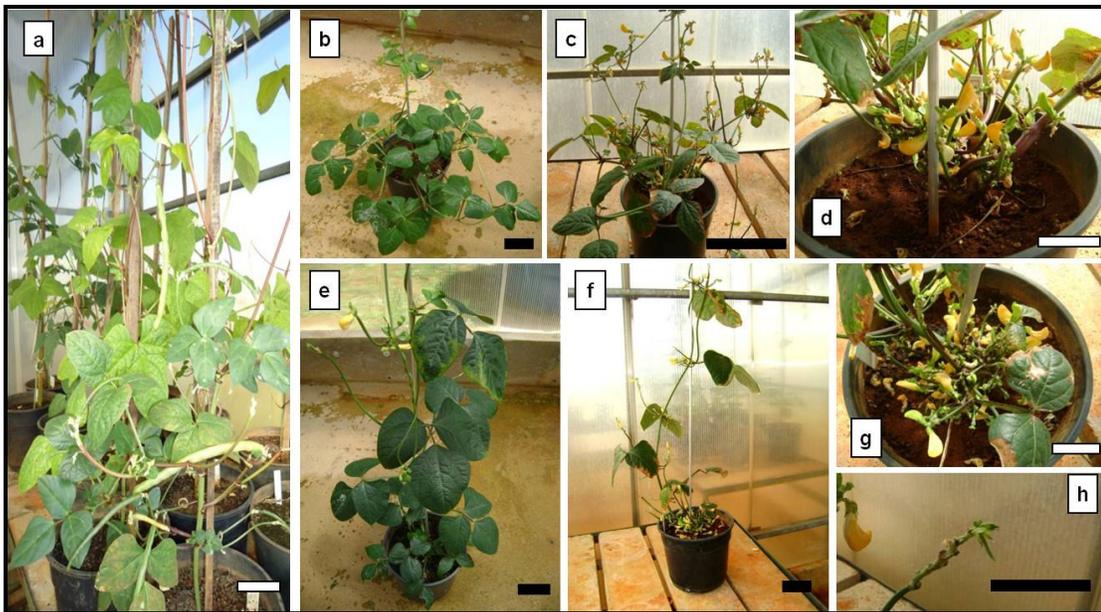


Figura 13: Plantas de feijão-caupi em casa de vegetação, a - Plantas controle negativo, b - Planta transformada 45 dias após aclimação (clone 3), c - Planta transformada (clone 3) 270 dias após aclimação em casa de vegetação, d - detalhe das multibrotações na base da planta do clone 3, e - Planta transformada (Clone 5) 45 dias após a aclimação, f - Planta transformada (clone 5) 270 dias após a aclimação, g - detalhe das multibrotações na planta do clone 5, g - detalhe da vagem em formação, atigiam no máximo 2 cm antes de cair. Barras: a, b, c, e, f = 10 cm, d, g, h = 5 cm

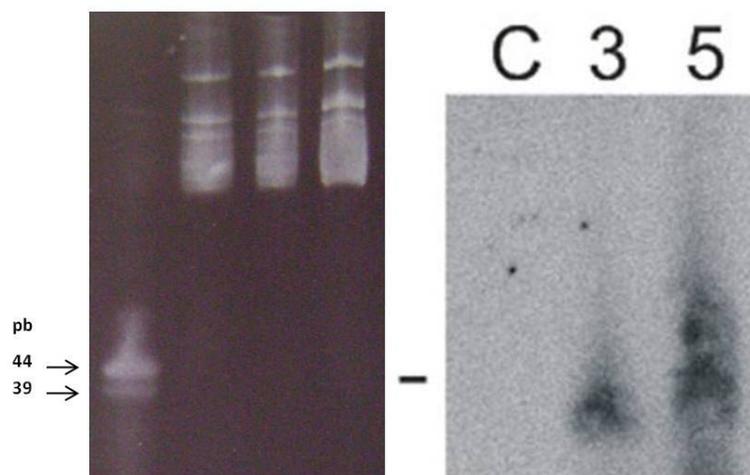


Figura 14: Análise de *Northern blot*. O RNA total foi extraído das plantas do controle negativo (C) e das plantas transformadas 3 e 5. Os RNAs foram aplicados em gel de acrilamida e submetidos a corrida eletroforética. Após a transferência para a membrana de nitrocelulose e hibridização com sonda radioativa foram revelados siRNAs com tamanhos entre 39 e 44 pares de bases nas plantas dos clones 3 e 5. Não foi detectada hibridização no controle negativo (C)

As quitinases de classe I são expressas constitutivamente nos tecidos florais e raízes de diversas plantas. Esta expressão é aumentada de acordo com a idade da planta, sendo observada uma atividade quitinolítica maior para tecidos mais maduros do que em tecidos mais jovens (KASPRZEWSKA, 2003, DAHIYA *et al.*, 2006, FERREIRA *et al.*, 2007). Neste trabalho foi observado que após aproximadamente 12 meses em casa de vegetação (Figura 13 d e g mostram plantas com 270 dias) é que as anormalidades fenotípicas se tornaram mais evidentes.

A identificação e o estudo dessas proteínas que estão associadas com mecanismos de defesa em feijão-caupi são importantes para o estabelecimento de técnicas apropriadas para sua manipulação e utilização em técnicas de melhoramento clássico ou para as técnicas modernas de manipulação genética. Estudos posteriores incluirão o uso desses mecanismos para o desenvolvimento de abordagens que permitam o controle de patógenos de origem fúngica nessa cultura.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram produzidas plantas transformadas de feijão-caupi com uma construção para silenciamento da quitinase *VuChiI*. A transformação das plantas foi confirmada por PCR. As plantas transformadas apresentaram alterações fenotípicas do desenvolvimento além de ciclo de vida longo em comparação com as plantas do controle. A presença de siRNAs para *VuChiI* foram detectadas por análises de *Northern blot*.

REFERÊNCIAS

- ADESOYE, A., MACHUKA, J., TOGUN, A. *CRY IAB* transgenic cowpea obtained by nodal electroporation. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 3200-3210, 2008.
- ADESOYE, A., MACHUKA, J., TOGUN A. Transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.Walp.) by *Agrobacterium* infiltration. **Applied Bioscience**, v. 30, p. 1845-1860, 2010.
- AGUIAR, J.M., FRANCO, O.L., RIGDEN, D.J., BLOCH, C. JR., MONTEIRO, A.C.S., FLORES, V.M.Q., JACINTO, T., XAVIER-FILHO, J., OLIVEIRA, A.E., GROSSI-DE-SÁ, M.F., FERNANDES, K.V. Molecular modeling and inhibitory activity of cowpea cystatin against bean bruchid Pests. **Proteins**, v. 63, p. 662-670, 2006.
- AKELLA, V., LURQUIN, P.F. Expression in cowpea seedlings of chimeric transgenes after electroporation into seed-derived embryos. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 110-117, 1993.
- ARAGÃO, F.J.L., CAMPOS, F.A.P. Common bean and cowpea. In: Pua EC, Davey MR, eds. **Biotechnology in agriculture and forestry**, Transgenic crops IV. Berlin: Springer, p. 263-276, 2007.
- ARAGÃO, F.J.L., SAROKIN, L., VIANNA, G.R., RECH, E.L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merril] plants at a high frequency. **Theor Appl Genet**, v. 101 p. 1-6, 2000.
- ARAÚJO JPP org. O Caupi no Brasil. **IITA/EMBRAPA**, 722p, 1988.
- BAKSHI, S., SAHA, B., ROY, N.K., MISHRA, S., PANDA, S.K., SAHOO, L. Successful recovery of transgenic cowpea (*Vigna unguiculata*) using the 6-phosphomannose isomerase gene as the selectable marker. **Plant cell reports**, Original paper, 2012.
- BALDONI, A.B. Acúmulo de ricina em sementes de mamona e silenciamento do gene em plantas geneticamente modificadas (Tese de Doutorado em Biologia Molecular), **Departamento de Biologia Celular, UnB**, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2010.
- BARRETO, P.D. Recursos genéticos e programa de melhoramento de feijão-de-corda no Ceará: Avanços e perspectivas. In: **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro** (QUEIRÓS, M.A., GOEDERT, C.O., RAMOS, S.R., Editores.), EMBRAPA, CPATSA, Petrolina, 1999.
- BAULCOMBE, D. RNA silencing in plants. **Nature**, v. 431, p. 356-363, 2004.
- BAUM, J.A., BOGAERT, T., CLINTON, W., HECK, G.R., FELDMANN, P., ILAGAN, O., JOHNSON, S., PLAETINCK, G., MUNYIKWA, T., PLEAU, M., VAUGHN, T., ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1322-1326, 2007.

BONFIM, K., FARIA, J.C., NOGUEIRA, E., MENDES, E., ARAGÃO, F.J. RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Mol Plant Microbe Interact**, v. 20, p. 717-726, 2007.

BOWMAN, S.M., FREE, S.J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays** v. 28, p. 799-808, 2006.

CARDOSO, M.J. A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil. **Embrapa Meio-Norte. Circular Técnica**, 28. Teresina, 264p, 2000.

CARVALHO, A.O., MACHADO, O.L.T., CUNHA, M., SANTOS, I.S., GOMES, V.M. 2001 Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, 39: 137-146.

CASTRO, P.G. Produção em *Pichia pastoris* de uma quitinase de feijão-de-corda com atividade antifúngica. (Tese de Doutorado em Bioquímica). **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2011.

CHAUDHURY, D., MADANPOTRA, S., JAIWAL, R., SAINI, R., KUMAR, A.P., JAIWAL, P.K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated high frequency genetic transformation of an Indian cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivar and transmission of transgenes into progeny. **Plant Science**, v. 172, p. 692-700, 2007.

CHEN, X., LAUDEMAN, T.W., RUSHTON, P.J., SPRAGGINS, T.A., TIMKO, M.P. CGKB: an annotation knowledge base for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) methylation filtered genomic genespace sequences. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 129-138, 2007.

CHRISTOU, P., SWAIN, W.F., YANG, N.-S., MCCABE, D.E. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 86, p. 7500-7504, 1989.

CITADIN, C.T. Expressão de genes de características agronômicas em feijão-caupi. (Tese de Doutorado em Biologia Molecular), **Departamento de Biologia Celular, UnB**, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2011.

CORREIA, T.O. Quitinase de classe I de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*): estudo preliminar da expressão do gene, clonagem, expressão e purificação em *Escherichia coli* BL21(λ)DE3 e determinação da estrutura através da modelagem por homologia. (Dissertação de Mestrado em Bioquímica), **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC** Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2007.

DAHIYA, N., TEWARI, R., HOONDA, G.S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 71, p. 773-782, 2006.

DE JONG, A.J., CORDEWENER, J., LO SCHIAVO, F., TERZI, M., VANDEKERCKHOVE, J., VAN KAMMEN, A., DE VRIES, S.C. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. **Plant Cell**, v. 4, p. 425-433, 1992.

DE JONG, A.J., HELDSTRA, R., SPAINK, H.P., HARTOG, M.V., MEIJER, E.A., HENDRIKS, T., LO SCHIAVO, F., TERZI, M., BISSELING, T., VAN KAMMEN, A., DE

- VRIES, S.C. *Rhizobium* lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. **Plant Cell** v. 5, p. 615-620, 1993.
- EHLERS, J.D., HALL, A.E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Field Crops Research**, v. 53, p. 187-204, 1997.
- EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M., GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.
- FANG, J., CHAO, C.T., ROBERTS, P.A., EHLERS, J.D. Genetic diversity of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] in four West African and USA breeding programs as determined by AFLP analysis. **Genet Resour Crop Evol**, v. 54, p. 1197-1209, 2007.
- FILIPECKI, M., MALEPSZY, S. Unintended consequences of plant transformation: molecular insight. **Journal of Applied Genetics**, v. 47, p. 277-286, 2006.
- FERREIRA, R.B., MONTEIRO, S., FREITAS, R., SANTOS, C.N., CHEN, Z., BATISTA, L.M., DUARTE, J., BORGES, A., TEIXEIRA, A.R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p. 677-700, 2007.
- FIRE, A., XU, S.Q., MONTGOMERY, M.K., KOSTAS, S.A., DRIVER, S.E., MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.
- FREIRE FILHO, F.R., CRAVO, M.S., VILARINHO, A.A., CAVALCANTE, E.S., FERNANDES, J.B., SAGRILLO, E., RIBEIRO, V.Q., ROCHA, M.M., SOUZA, F.F., LOPES A.M., GONÇALVES, J.R.P., CARVALHO, H.W.L., RAPOSO, J.A.A., SAMPAIO, L.S. BRS Novaera: Cultivar de Feijão-Caupi de Porte Semi-Ereto. Comunicado Técnico 215, **Embrapa Amazônia Oriental, ISSN 1517-2244**, Belém, PA, Setembro, 2008.
- FREIRE FILHO, F.R., RIBEIRO, V.Q., BARRETO, P.D., SANTOS, C.A.F. Melhoramento genético do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região nordeste. In: Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro (QUEIRÓS, M.A., GOEDERT, C.O. E RAMOS, S.R.R., Editores.). EMBRAPA, CPATSA, Petrolina, 1999.
- GARCIA, J.A., HILLE, J., GOLDBACH, R. Transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) cells with an antibiotic-resistance gene using a Ti-plasmid-derived vector. **Plant Science**, v. 44, p. 37-46, 1986.
- GARCIA, J.A., HILLE, J., VOS, P., GOLDBACH, R. Transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) with a full-length DNA copy of cowpea mosaic virus M-RNA. **Plant Science**, v. 48, p. 89-98, 1987.
- GHILDIYAL, M.E., ZAMORE, P.D. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nat Rev Genet**, v. 10, p. 94-108, 2009.
- GIJZEN, M., KUFLU, K., QUTOB, D., CHEMYS, T. A class I chitinase from soybean seed coat. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 2283-2289, 2001.

GOMATHINAYAGAM, P., GANESH RAM, S., RATHNASWAMY, R., RAMASWAMY, N.M. Interspecific hybridization between *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *V. vexillata* (L.) A. Rich through in vitro embryo culture. **Euphytica**, v. 102, p. 203-209, 1998.

GOMES, V.M., OLIVEIRA, A.E.A., XAVIER-FILHO, J. A chitinase and a β -1,3-glucanase isolated from the seeds of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) inhibit the growth of fungi and insect pests of the seed. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 72, p. 86-90, 1996.

GORDON, D., ABAJIAN, C., GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202, 1998.

GORDON, K.H., WATERHOUSE, P.M. RNAi for insect-proof plants. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1231-1232, 2007.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

HINCHEE, M.A.W., CONNOR, D.V., NEWELL, C.A., MCDONNELL, R.E., SATO, S.J., FISCHHOFF, D.A., RE, D.B., FRALEY, R.T., HORSCH, R.B. Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium-mediated DNA transfer. **Bio/Technology**, v. 6, p. 915-922, 1988.

IKEA, J., INGELBRECHT, I., UWAIFO, A., THOTTAPPILLY, G. Stable gene transformation in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) using particle gun method. **Afr J Biotechnol**, v. 2, p. 211-218, 2003.

ILORI, C.O., PELLEGRINESCHI, A. Transgene expression in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) through Agrobacterium transformation of pollen in flower buds. **Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 11821-11828, 2011.

IVO, N.L. NASCIMENTO, C.P., VIEIRA, L.S., CAMPOS, F.A.P., ARAGÃO, F.J.L. Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 1475-1483, 2008.

KARASUDA, S., TANAKA, S., KAJIHARA, H., YAMAMOTO, Y., KOGA, D. Plant chitinase as a possible biocontrol agent for use instead of chemical fungicides. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 67, p. 221-224, 2003.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases - regulation and function. **Cellular e Molecular Biology Letters**, v. 8, p. 809-824, 2003.

KIM, W.-S., KRISHNAN, H.B. Expression of an 11 kDa methionine-rich delta-zein in transgenic soybean results in the formation of two types of novel protein bodies in transitional cells situated between the vascular tissue and storage parenchyma cells. **Plant Biotech Journal**, v. 2, p. 199-210, 2004.

LEE, J.H., TAKEI, K., SAKAKIBARA, H., CHO, H.S., KIM, D.M., KIM, Y.S., MIN, S.R., KIM, W.T., SOHN, D.Y., LIM, Y.P., PAI, H.-S. CHRK1, a chitinase-related receptor-like

kinase, plays a role in plant development and cytokinin homeostasis in tobacco. **Plant molecular biology**, v. 53, p. 877-890, 2003.

LIMA, V.M., MAGIOLI, C., GERHARDT, L.B.A., TARRÉ, E., MENEZES, R.M.G., SACHETTO-MARTINS, G., MARGIS-PINHEIRO, M. Bean class IV chitinase promoter is modulated during plant development and under abiotic stress. **Physiologia Plantarum**, 116: 512-521, 2002.

LIPPMAN, Z., MARTIENSSEN, R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. **Nature**, v. 431, p. 364-370, 2004.

MACHUKA, J., ADESOYE, A., OBEMBE, O.O. In: FATOKUN, C.A., TARAWALI, S.A., SINGH, B.B., KORMAWA, P.M., TAMO, M. (editores) **Challenges and Opportunities for Enhancing Sustainable Cowpea Production**. Intl Inst Tropical Agric, Ibadan, Nigeria, 185-196, 2002.

MCCABE, D.E., MARTINELL, B.J. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. **Bio/technology**, v. 11, p. 596-598, 1993.

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

MUTHUKUMAR, B., MARIAMMA, M., VELUTHAMBI, K., GNANAM, A. Genetic transformation of cotyledon explants of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 980-985, 1996.

NAPOLI, C., LEMIEUX, C., JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible cosuppression of homologous genes in *trans*. **Plant Cell**, v. 2, p. 279-289, 1990.

NÓBREGA, F.M., SANTOS, I.S., CUNHA, M.D., CARVALHO, A.O., GOMES, V.M. Antimicrobial proteins from cowpea root exudates: inhibitory activity against *Fusarium oxysporum* and purification of a chitinase-like protein. **Plant and Soil**, v. 272, p. 223-232, 2005.

NOGUEIRA, F.C.S., GONÇALVES, E.F., JEREISSATI, E.S., SANTOS, M., COSTA, J.H., OLIVEIRA-NETO, O.B., SOARES, A.A., DOMONT, G.B., CAMPOS, F.A.P. Proteome analysis of embryogenic cell suspensions of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant cell reports**, v. 26, p. 1333-1343, 2007.

OBATOLU, V.A. Growth pattern of infants fed with a mixture of extruded malted maize and cowpea. **Nutrition**, v. 19, p. 174-178, 2009.

OLIVEIRA, J.T.A., ANDRADE, N.C., MARTINS-MIRANDA, A.S., SOARES, A.A., GONDIM, D.M.F., ARAUJO-FILHO, J.H., FREIRE-FILHO, F.R., VASCONCELOS, I.M. Differential expression of antioxidant enzymes and PR-proteins in compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 51, p.145-152, 2012.

ONYENEKWE, P.C., NJOKU, G.C., AMEH, D.A. Effect of cowpea (*Vigna unguiculata*) processing methods on flatus causing oligosaccharides. **Nutritional Research**, v. 20, p. 349-358, 2000.

PELLEGRINESCHI, A. In vitro plant regeneration via organogenesis of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 89-95, 1997a.

PELLEGRINESCHI, A., FATOKUN, C.A., THOTTAPPILLY, G., ADEPOJU, A.A. Cowpea embryo rescue. 1. Influence of culture media composition on plant recovery from isolated immature embryos. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 133-138, 1997b.

PENZA, R., LURQUIN, P.F., FILIPPONE, E. Gene transfer by cocultivation of mature embryos with *Agrobacterium tumefaciens*: application to cowpea (*Vigna unguiculata* Walp). **Journal of Plant Physiology**, v. 138, p. 39-43, 1991.

PENZA, R., AKELLA, V., LURQUIN, P.F. Transient expression and histological localization of a gus chimeric gene after direct transfer to mature cowpea embryos. **Biotechniques**, v. 13, p. 576-580, 1992.

PHILLIPS, R.D., MCWATTERS, K.H., CHINNAN, M.S., HUNG, Y.-C., BEUCHAT, L.R., SEFA-DEDEH, S., SAKYI-DAWSON, E., NGODDY, P., NNANYELUGO, D., ENWERE, J., KOMEY, N.S., LIU, K., MENSA-WILMOT, Y., NNANNA, I.A., OKEKE, C., PRINYAWIWATKUL, W., SAALIA, F.K. Utilization of cowpeas for human food. **Field Crops**, v. 82, p. 193-221, 2003.

PEPELKA, J.C., GOLLASCH, S., MOORE, A., MOLVIG, L., HIGGINS, T.J.V. Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 304-312, 2006.

PEPELKA, J.C., TERRY, N., HIGGINS, T.J.V. Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries? **Plant Science**, v. 167, p. 195-206, 2004.

QI, Y., HANNON, G.J. Uncovering RNAi mechanisms in plants: Biochemistry enters the foray. **FEBS letters**, v. 579, p. 5899-5903, 2005.

RAVEENDAR, S., IGNACIMUTHU, S. Improved *Agrobacterium* mediated transformation in cowpea *Vigna unguiculata* L. Walp. **Asian J Plant Sci**, v. 9, p. 256-263, 2010.

RECH, E.L., VIANNA, G.R., ARAGÃO, F.J.L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nature protocols**, v. 3, p. 410-418, 2008.

ROSE, T.L., CONCEIÇÃO, A.D.S., XAVIER-FILHO, J., OKOROKOV, L.A., FERNANDES, K.V.S., MARTY, F., MARTY-MAZARS, D., CARVALHO, A.O., GOMES, V.M. Defense Proteins from *Vigna unguiculata* Seed Exudates: Characterization and Inhibitory Activity Against *Fusarium Oxysporum*. **Plant and Soil**, v. 286, p. 181-191, 2006.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2^o edição. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. Rapid isolation of yeast DNA. In: Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning, a laboratory manual (editores). **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, p. 631-632, 2001.

SHAKHBAZAU, A.V., KARTEL', N.A. Chitinases in Bioengineering Research. **Russian Journal of Genetics**, v. 44, p. 881-889, 2008.

SILVA, S.M.S., FREIRE FILHO, F.R. Proteínas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.): Caracterização e aplicação nutricional. **Embrapa Documentos** v. 44, p. 5-20, 1998.

SINGH, B.B., AJEIGBE, H.A., TARAWALI, S.A., FERNANDEZ-RIVERA, S., ABUBAKAR, M. Improving the production and utilization of cowpea as food and fodder. **Field Crops Research**, v. 84, p. 169-177, 2003.

SINGH, B.B., EHLERS, J.D., SHARMA, B., FREIRE FILHO, F.R. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C.A., TARAWALI, S.A., SINGH, B.B., KORMAWA, P.M., TAMO, M. (editores) Challenges and Opportunities for Enhancing Sustainable Cowpea Production. **Intl Inst Tropical Agric**, Ibadan, Nigéria, p. 22-40, 2002.

SLUSARENKO, A.J., FRASER, R.S.S., VAN LOON, L.C. Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, 2000.

SMITH, N.A., SINGH, S.P., WANG, M.-B., STOUTJESDIJK, P.A., GREEN, A.G., WATERHOUSE, P.M. Gene expression: Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. **Nature**, v. 407, p. 319-320, 2000.

SOLLETI, S.K., BAKSHI, S., PURKAYASTHA, J., PANDA, S.K., SAHOO, L. Transgenic cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds expressing a bean α -amylase inhibitor 1 confers resistance to storage pests, bruchid beetles. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 1841-1850, 2008a.

SOLLETI, S.K., BAKSHI, S., SAHOO, L. Additional virulence genes in conjunction with efficient selection scheme, and compatible culture regime enhance recovery of stable transgenic plants in cowpea via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **J Biotech**, v. 135, p. 97-104, 2008b.

SOMERS, D.A., SAMAC, D.A., OLHOFT, P.M. Recent advances in legume transformation. **Plant Physiol**, v. 131, p. 892-899, 2003.

TANG, G., GALILI, G. Using RNAi to improve plant nutritional value: from mechanism to application. **Trends Biotechnology**, v. 22, p. 463-469, 2004.

TOHIDFAR, M., MOHAMMADI, M., GHAREYAZIE, B. Agrobacterium-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a heterologous bean chitinase gene. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 83, p. 83-96, 2005.

UPADHYAY, S.K., CHANDRASHEKAR, K., THAKUR, N., VERMA, P.C., BORGIO, J.F., SINGH, P.K., AND TULI, R. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. **J Biosci**, v. 36, p. 153-161, 2011.

VAN DER KROL, A.R., MUR, L.A., BELD, M., MOL, J.N.M., STUITJE, A.R. Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. **Plant Cell**, v.2, p. 291-299, 1990.

VAN LOON, L.C., REP, M., PIETERSE, C.M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

VIEIRA, F.A., CARVALHO, A.O., VITORIA, A.P., RETAMAL, C.A., GOMES, V.M. Differential expression of defence-related proteins in *Vigna unguiculata* (L. Walp.) seedlings after infection with *Fusarium oxysporum*. **Crop Protection**, v. 29, p. 440-447, 2010.

WANG, S.Y., ZHOU, J.J., SHAO, B., LU, Y.J., RAO, P.F. A Thermostable Chitinase with Chitin-Binding Activity from *Phaseolus limensis*. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 452-457, 2008.

WATERHOUSE, P.M., WANG, M.B., LOUGH, T. Gene silencing as an adaptative defense against viruses. **Nature**, v. 411, p. 834-842, 2001.

WESLEY, S.V., HELIWELL, C.A., SMITH, N.A., WANG, M., ROUSE, D.T., LIU, Q., GOODING, P.S., SINGH, S.P., ABBOTT, D., STOUTJESDIJK, P.A., ROBINSON, S.P., GLEAVE, A.P., GREEN, A.G., WATERHOUSE, P.M. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. **The Plant Journal** 27: 581-590, 2001.

YAMAMOTO, T., IKETANI, H., IEKI, H., NISHIZAWA, Y., NOTSUKA, K., HIBI, T., HAYASHI, T., MATSUTA, N. Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. **Plant Cell Reports** v. 19, p. 639-646, 2000.

YOO, B-C, KRAGLER, F., VARKONYI-GASIC, E., HAYWOOD, V., ARCHER-EVANS, S., LEE, Y.M., LOUGH, T.J., LUCAS, W.J. A Systemic Small RNA Signaling System in Plants. **The Plant Cell**, v. 16, p. 1979-2000, 2004.

ZERBINI, F.M., ALFENAS, P.F., ANDRADE, E.C. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus. **RAPP**, v. 13, p. 191-244, 2005.

ZHANG, Y., ZHANG, X., WEN, F., WANG, X. Enzymatic and histopathological changes during resistance of cowpea to *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. **Candian Journal of Plant Pathology**, v. 28, p. 501-508, 2006.

CAPÍTULO 3

1 INTRODUÇÃO

O tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), espécie pertencente à família Solanaceae, possui um histórico bem estabelecido como planta modelo para a transformação genética vegetal. Esta espécie é usada como um sistema experimental para estudos de fenômenos básicos em plantas (HELGESON, 1979) devido a facilidade de manuseio, simplicidade de controlar a polinização, alta taxa de regeneração *in vitro*, genoma relativamente pequeno, tecnologia de transferência e expressão gênica bem estudada, alto rendimento de biomassa (mais de 100.000 kg por hectare), potencial de produção rápida em larga-escala devido ao ciclo curto e grande produção de sementes (BRASILEIRO *et al.*, 1998, DUNG *et al.*, 2006, ROMMENS, 2006).

Os sistemas de regeneração e transformação genética estão muito mais avançados em tabaco comparado com outras plantas importantes economicamente ou até com outras plantas modelo. Esta planta também é usada para a produção de metabólitos secundários em cultura de células o que o torna uma ferramenta biotecnológica para a produção de produtos naturais ao invés de usar microrganismos industriais (SOMMER *et al.*, 1998). São, também, modelos ideais para o estudo de interações planta-patógeno, de respostas ambientais, regulação do crescimento e senescência. É a planta mais comumente usada para experimentos de transformação e expressão de genes das mais variadas fontes (JUBE E BORTHAKUR, 2007).

1.1 Transformação de plantas de tabaco com genes de quitinases

A transformação genética de plantas de tabaco com genes de quitinases tem sido realizada em muitos trabalhos, empregando genes de origem diversa. Algumas vantagens das quitinases na proteção de plantas contra patógenos incluem seu potencial fungicida, o fato de possuírem um alvo específico, minimizando efeitos nocivos à planta hospedeira e seu caráter atóxico a humanos e vertebrados superiores, além de conferirem resistência a um amplo espectro de patógenos (WANG *et al.*, 1999, PATIL *et al.*, 2000).

A utilização de quitinases de diferentes fontes para transformar plantas está bem documentada na literatura. Broglie *et al.* (1991) produziram plantas de tabaco expressando o gene de uma quitinase de classe I de feijão-comum. As plantas transgênicas apresentaram capacidade de sobreviver em solo infestado com o fungo *Rhizoctonia solani* e apresentaram um retardamento no desenvolvimento dos sintomas da doença. Zhu *et al.* (1994)

transformaram plantas de tabaco para expressar os genes de uma quitinase de arroz e uma glucanase de alfafa. As plantas transformadas com ambos os transgenes apresentaram resistência ao patógeno *Cercospora nicotianae* aumentada em comparação com as plantas que apresentavam apenas um dos transgenes. Jach *et al.* (1995) expressaram três proteínas de defesa em plantas de tabaco, uma quitinase de classe II de cevada, uma β -1,3-glucanase e uma proteína inativadora de ribossomo. Os ensaios de infecção fúngica mostraram que a expressão de cada gene, isoladamente, conferiu resistência ao patógeno *Rhizoctonia solani* e a expressão combinada dos genes apresentou um efeito sinérgico positivo sobre a proteção das plantas. Xiao *et al.* (2007) mostraram que plantas de *Nicotiana benthamiana* expressando uma quitinase de melão apresentaram um aumento na resistência contra o ataque dos fungos *Phytophthora nicotianae* e *Verticillium*, respectivamente.

Além de quitinases de origem vegetal, quitinases de origem microbiana tem sido usadas para transformar plantas. Muitos microrganismos têm sido alvo da busca de genes de interesse para a transformação genética de plantas (LORITO *et al.*, 1998, DANA *et al.*, 2006). As quitinases de bactérias estão envolvidas principalmente em processos de nutrição e parasitismo, com a degradação da quitina e disponibilização de carbono e nitrogênio para as células (PATIL *et al.*, 2000). Alguns dos genes codificadores destas quitinases possuem atividade antifúngica descrita em plantas transgênicas.

Ntui *et al.* (2011) transformaram plantas de tabaco com o gene de uma quitinase de *Streptomyces griseus* e com uma defensina de wasabi. As plantas transgênicas apresentando expressão de ambos os genes ou de apenas um deles foram desafiadas com o fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *nicotianae*. As plantas apresentando ambos os transgenes exibiram uma proteção aumentada ao fungo em comparação com as plantas que expressavam apenas um dos transgenes. O extrato foliar das plantas transgênicas também foi capaz de inibir o crescimento micelial *in vitro* do fungo e causou anormalidades nas hifas. Fernandes (2010) utilizou a sequência codificadora de uma quitinase de *Chromobacterium violaceum* para transformar plantas de tabaco. Foram obtidas plantas transformadas confirmadas por PCR com os iniciadores específicos.

Em fungos, essas enzimas estão relacionadas à nutrição e a processos de desenvolvimento e morfogênese, pois a quitina está entre os principais componentes das paredes celulares dos fungos. A interrupção de um gene codificador para quitinase em *Aspergillus nidulans* diminuiu a frequência de germinação dos esporos e o crescimento das hifas. Entretanto não foi observada diferença na atividade quitinolítica ou na morfologia de

hifas e conidióforos, o que indica que a função dessa enzima pode ser substituída por outras quitinases endógenas.

Terakawa *et al.* (1997) geraram plantas com suscetibilidade reduzida aos patógenos *Sclerotinia sclerotium* e *Botrytis cinerea* com a introdução de um gene codificador de uma quitinase do fungo *Rhizopus oligosporus* em plantas de tabaco. Resultados semelhantes foram descritos por Lorito *et al.* (1998) que analisaram o potencial antifúngico de dois genes codificadores de endoquitinases de *T. harzianum* nas solanáceas batata e tabaco, tendo verificado grande eficiência das enzimas em ambos os sistemas. Em comparação às plantas controle, as plantas transformadas com estes genes separadamente demonstraram sintomas menos severos das doenças associadas aos patógenos. Kern *et al.* (2010) relataram a expressão de uma endoquitinase do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em plantas de tabaco. As plantas da geração R1 apresentaram resistência ao patógeno *Rhizoctonia solani*.

Além de conferir a vantagem adaptativa da resistência a doenças causadas por fungos, genes de quitinases também podem conferir um caráter tóxico a insetos, o que reduziria a predação das plantas por esses animais (WANG *et al.*, 1999). A expressão de quitinases de insetos em plantas transgênicas de tabaco tem se mostrado letal a larvas, atingindo índices de 100% de mortalidade em besouros da espécie *Oryzaephilus mercator* quando alimentados com uma dieta contendo uma quitinase de *Manduca sexta* (WANG *et al.*, 1999). Em outro trabalho, plantas de tabaco expressando uma quitinase de *M. sexta* foram testadas com respeito a uma possível inibição do crescimento das larvas e redução da área foliar danificada por insetos herbívoros. Em experimentos com *Heliothis virescens*, houve efeitos significativos de retardo do desenvolvimento das larvas e diminuição da área foliar danificada (DING *et al.*, 1998). Di Maro *et al.* (2010) demonstraram o potencial de plantas de tabaco, quando transformadas com uma quitinase do vírus *multicapsid nucleopolyhedrovirus* de *Autographa californica* (AcMNPV ChiA), de serem resistentes contra o fungo *Alternaria alternata*, sendo capazes de inibir a germinação dos esporos e o crescimento. Também foi mostrado que a quitinase recombinante purificada foi responsável pelo aumento da permeabilidade da membrana peritrófica de larvas de duas espécies de Lepidoptera.

A introdução de genes de quitinases do fungo *Trichoderma harzianum* em plantas de tabaco sob o controle de um promotor constitutivo levou a um aumento na resistência da planta contra estresses bióticos e abióticos (DANA *et al.*, 2006) fornecendo evidências diretas que a expressão constitutiva de quitinases em plantas transgênicas, além da defesa contra

fungos, desempenham um papel contra diferentes tipos de estresse sejam eles bióticos ou abióticos.

Além da importância das plantas de tabaco como hospedeira de genes de quitinases heterólogas, a própria planta é fonte destas enzimas, a exemplo dos diversos trabalhos que relatam a atividade de quitinases de plantas, contra uma grande variedade de fungos. Plantas de amendoim (ROHINI E RAO, 2001) e de cenoura (PUNJA E RAHARJO, 1996), por exemplo, expressando uma quitinase de classe I de tabaco apresentaram resistência contra *Cercospora arachidicola* e *Botrytis cinerea*, respectivamente.

Deste modo, a introdução de genes de quitinases em plantas mostra-se uma estratégia eficiente para o combate de sintomas e doenças provocadas por tais microrganismos, aumentando a produtividade, reduzindo os custos associados à produção e contribuindo para uma redução nos índices de poluição ambiental vinculada ao uso de fungicidas (Valois 2001).

1.2 Expressão extracelular de proteínas de defesa

O apoplasto de plantas compreende a matriz da parede celular e os espaços intercelulares e é um compartimento dinâmico envolvido em muitos processos durante o crescimento normal e sob condições de estresse, incluindo manutenção da forma de tecidos, desenvolvimento, nutrição, sinalização, desintoxicação e defesa (WITZEL *et al.*, 2011). Apresenta um papel fundamental na nutrição celular, pois as células importam íons e metabólitos do apoplasto, e no desenvolvimento vegetal por determinar a capacidade e a taxa de alongamento da parede celular. Tem também um papel importante nos mecanismos de defesa, respondendo a estresses bióticos e abióticos, como os poluentes do ar, toxicidade causada por metais pesados, seca, salinidade e extremos de temperatura (DANI *et al.*, 2005).

As células respondem a estas condições deletérias por mecanismos complexos induzidos pela alteração do equilíbrio, esses meios incluem alterações na síntese de enzimas e outras proteínas extracelulares. As proteínas presentes no apoplasto vegetal refletem sua ampla diversidade funcional. Estudos sobre a dinâmica das mudanças na composição de proteínas do apoplasto revelaram novos dados sobre como as plantas respondem a estresses bióticos e abióticos (DANI *et al.*, 2005).

Entre as proteínas que foram relatadas terem a sua expressão aumentada em resposta a estresses bióticos e abióticos estão as quitinases. O acúmulo destas enzimas já foi revelado em mapa proteômico do fluido apoplástico de plantas de tabaco submetidas ao estresse salino por Dani *et al.*, 2005. Foram detectadas duas isoformas de uma quitinase de classe II de pI

acídico. As quitinases deste tipo são conhecidas por acumular no espaço extracelular. A função desta quitinase nas folhas é de defesa, mas nesse caso constitui um exemplo de aumento da expressão causada por estresse abiótico. Burzynski *et al.* (2000), identificaram seis isoformas de quitinases em plantas saudáveis de *Lupinus albus* (L.). A localização extracelular de algumas isoformas de quitinases foi confirmada por detecção da sua atividade em fluidos intercelulares extraídos de tecidos de *L. albus*. O excesso de manganês é um fator de estresse que foi relatado por Fecht-Christoffers *et al.* (2003) causar o acúmulo de quitinases de classe III e IV no fluido do espaço apoplástico de tecidos de feijão-caupi. O papel dessas quitinases não foi estabelecido, mas acredita-se que tenha um papel na proteção celular. Zhang *et al.* (2010) relataram um novo papel das quitinases como proteínas anticongelantes em *Chinmonanthus praecox communis* (L.). A proteína de 33 kDa além da proteção contra o congelamento apresentava atividade inibitória sobre a germinação de esporos e crescimento dos fungos *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Magnaporthe grisea* e *Verticillium dahliae*.

A detecção de quitinases no espaço apoplástico em resposta ao ataque de bactérias em tabaco foi relatado por Szabó *et al.* (2012). A detecção foi realizada duas horas após a indução da resposta basal por proteínas de *Pseudomonas avenae*. A acumulação de quitinases extracelulares também foi detectada em resposta a patógenos de origem fúngica e viral. Profotová *et al.* (2007), relataram a acumulação sistêmica de quitinases acídicas e básicas em plantas de *Brassica napus* em resposta ao vírus do mosaico amarelo de nabo (*Turnip yellow mosaic virus*-TYMV) e ao fungo *Leptosphaeria maculans*. Esses relatos mostram que as quitinases desempenham papéis fundamentais sobre as mais variadas condições de estresse. A utilização de quitinases em sistemas heterólogos tem sido utilizada para obter plantas com resistência elevada a patógenos principalmente de origem fúngica. Fiocchetti *et al.* (2008), transformaram plantas de tabaco com duas proteínas PR-4 (A família PR-4 inclui genes de quitinases) de trigo. Os genes foram expressos constitutivamente em tabaco conferindo resistência a *Phytophthora nicotianae*. Em plantas transgênicas expressando constitutivamente quitinases, a localização subcelular da proteína codificada pelo transgene é fundamental para a resistência contra fungos patogênicos. A secreção para o apoplasto é o mais efetivo. Essas PR-4 de trigo apresentavam secreção apoplástica e um pI básico representando um caso raro de proteínas básicas secretadas no apoplasto (FIOCCHETTI *et al.*, 2008). Nielsen *et al.* (1993) utilizaram uma quitinase de classe III de beterraba, para transformar plantas de tabaco. As plantas transformadas apresentaram acúmulo da proteína no espaço extracelular. Apesar de esta quitinase estar envolvida na proteção de plantas de

beterraba durante a infecção por *Cercospora beticola*, não foi detectada resistência aumentada das plantas de tabaco transformadas e desafiadas com *C. nicotianae*.

O apoplasto por representar a primeira linha de defesa das plantas pode ser explorado para a expressão de proteínas de defesa, como as quitinases. O tabaco pela sua grande produção de biomassa e consequente produção de proteínas que chega a ser quatro vezes maior por acre em comparação à soja (TENG E WANG 2011) e deste modo representa um modelo ideal para a abordagem utilizada neste trabalho.

No caso deste capítulo III, o objetivo foi estudar o papel na defesa de uma quitinase de classe I de feijão-caupi através de expressão desta enzima no espaço extracelular. As plantas transformadas por co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens* portando o vetor pCAMBIA1305.2::VuChiI, foram testadas quanto à presença do transgene por PCR. Foram obtidas três linhagens cujo extrato protéico total apresentou atividade contra quitina coloidal. Análises de segregação mostraram que transgene foi passado para a progênie segundo expectativas Mendelianas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da superexpressão do gene da quitinase de classe I de feijão-caupi no espaço extracelular dos tecidos de plantas de tabaco transformadas via *A. tumefaciens*.

2.2 Objetivos específicos

- Clonar a sequência da quitinase de classe I amplificado a partir do cDNA de sementes de feijão-de-corda;
- Subclonar a sequência da quitinase de classe I em vetor de expressão extracelular;
- Transformar discos foliares de tabaco por cocultivo com *A. tumefaciens*;
- Regenerar plantas transgênicas de tabaco;
- Analisar as plantas transformadas utilizando técnica de PCR,
- Realizar ensaios de atividade quitinolítica com extrato total contra quitina coloidal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Plantas

Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. *Xanthi*) cultivadas *in vitro* foram usadas nos experimentos de transformação genética.

3.1.2 Bactérias

Escherichia coli Top 10 F' foi usada nos experimentos de clonagem dos insertos *VuChiI* para expressão em plantas de tabaco e *Agrobacterium tumefaciens* estirpe ElectroMAX LBA4404 (Invitrogen, Life Technologies, USA) para os experimentos de transformação das plantas de tabaco.

3.1.3 Enzimas

As enzimas de restrição *Bgl*III (10 U/ μ L), *Bst*EII (10 U/ μ L) e a DNA ligase T4, acompanhadas dos seus respectivos tampões de reação 10x, foram obtidos da Fermentas. *Go Taq* DNA polimerase (500 U/mL) acompanhada do tampão de reação, foi adquirida da Promega.

3.1.4 Plasmídeos

O vetor pGEM-T Easy (Promega)::*VuChiI* foi utilizado como DNA molde nas reações de PCR para experimentos de clonagem. O plasmídeo pCAMBIA 1305.2 (11.921 pb), AF354046.1- CAMBIA Molecular Technologies (Canberra, AU), foi usado como vetor de clonagem do inserto de *VuChiI* em células de *Escherichia coli* e para transformar células de *A. tumefaciens* estirpe LBA4404.

3.1.5 Reagentes e outros materiais

Oligonucleotídeos iniciadores complementares ao gene *VuChiI* foram sintetizados pela Prodimol Biotecnologia. Os kits de purificação de DNA (GFX DNA) foram adquiridos da Amersham Biosciences. Meios de cultura utilizados foram: para *E. coli* (2xYT, LB), *A. tumefaciens* (YM) e meio para cultivo *in vitro* de plantas (meio MS, Sigma).

3.2 Métodos

3.2.1 Extração do DNA genômico de folhas de feijão-caupi

O DNA de folhas de plantas de feijão-caupi foi extraído conforme descrito no capítulo 1 deste trabalho e usado como molde para amplificação da sequência da quitinase *VuChiI* com iniciadores específicos.

3.2.2 Desenho dos Iniciadores

Iniciadores específicos para o gene da quitinase *VuChiI*, foram desenhados com base na sequência depositada no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) de número de acesso AF307511. Os iniciadores foram projetados com sítios de restrição apropriados de modo que a proteína recombinante fosse expressa fundida ao peptídeo sinal de uma proteína rica em glicina (GRP) cuja sequência está presente no vetor binário pCAMBIA 1305.2. No vetor, esse peptídeo serviria para secreção *in planta* do gene repórter *GUS* que é retirado durante o processo de clonagem por digestão com as endonucleases *BgIII* e *BstEII*. Os iniciadores foram desenhados com o objetivo de amplificar a sequência parcial do gene de 894 bp para clonagem no vetor de expressão apoplástica pCAMBIA 1305.2. Os iniciadores senso *QuiBgIII* (5'-AGAGATCTGAGGCAGTGTGGAAGCCAAGCG-3'), T_m: 66,2 °C, foram desenhados com a inserção de sítio de restrição para a endonucleases *BgIII* (negrito) enquanto os iniciadores anti-senso *QuiBstEII* (5'-GGGTAACCTCAGACGATGGGATGGAGATTAA-3'), T_m: 62,0 °C, foram desenhados com a adição de sítio para *BstEII* (negrito).

3.2.3 Amplificação do fragmento gênico de *VuChiI*

O inserto referente à quitinase foi amplificado por PCR em uma reação de 25 µL contendo: 1,0 µL do DNA molde, 2,5 µL do tampão de reação (Tris-HCl 100 mM-pH 9,0,

MgCl₂ 15 mM e KCl 500 mM), 5,0 µL da solução de dNTP's (1,0 mM), 2,5 µL de cada iniciador (cada um na concentração 5,0 µM), 1,0 µL de *Taq* DNA polimerase (*Go Taq*) e 10,5 µL de água ultra pura estéril. Para as reações controle, não foi feita adição do DNA molde, sendo o volume da reação completado com água.

Para a amplificação dos fragmentos foram adotados os seguintes parâmetros: uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 3 min, anelamento a 60 °C por 15 segundos e uma etapa de extensão a 72 °C por 2 min. Esse ciclo foi repetido 30 vezes.

No final da reação de amplificação, uma alíquota de 5 µL de cada reação foi retirada, misturada com 2 µL tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30% em tampão Tris-EDTA pH 8,0) e aplicada num gel de agarose 1,0% em tampão TBE (Tris 4 mM-pH 8,0, Ácido bórico 1mM, EDTA 0,5 M) contendo brometo de etídio 0,5 µg/mL e submetidas a uma corrente constante de 100 mA por cerca de 30 minutos e visualizadas com o auxílio de um transluminador ultravioleta para a confirmação da amplificação.

3.2.4 Purificação do produto de PCR

Os produtos confirmados foram purificados a partir do gel de agarose com auxílio do Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Life Sciences). Foi adicionado à amostra 500 µL de tampão de captura e a mistura foi agitada vigorosamente adquirindo uma coloração amarela. A mistura foi adicionada a uma coluna GFX MicroSpinTM montada em um tubo de coleta. A amostra foi centrifugada por 60 segundos a 16.000 x g. O volume no tubo de coleta foi descartado e a coluna com o DNA aderido foi montada em outro tubo de coleta. Foi adicionado à coluna 500 µL de tampão de lavagem e centrifugado a 16.000 x g por 60 segundos. O volume no tubo de coleta foi descartado junto com o tubo e a coluna foi montada em um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL autoclavado. Foi adicionado 20 µL de tampão de eluição tipo 4 e a coluna foi deixada na bancada a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida a coluna foi centrifugada por 5 minutos a 16.000 x g. O processo de eluição foi repetido e o volume que ficou retido no tubo de microcentrifuga contendo o DNA de interesse foi armazenado a -20°C.

3.2.5 Ligação em pGEM-T Easy e eletroporação em *E. coli*

Os produtos de PCR purificados foram utilizados em uma reação de ligação com o vetor pGEM-T Easy (Promega). A reação consistiu na adição de 5 µL do tampão 2x *Rapid*

Ligation (Tris-HCl 60 mM-pH 7,8, MgCl₂ 20mM, DTT 20mM, ATP 2mM, polietilenoglicol 10%), 1 µL de pGEM-T Easy (50 ng/µL), 1µL de T4 DNA ligase (3 U/µL) e 5 µL do produto da PCR. A reação foi incubada a 4 °C por 16h no termociclador PTC-200 (MJ Research). Os produtos da reação de ligação foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E.coli* Top 10 F' por meio de eletroporação. As células eletrocompetentes Top 10 F' foram preparadas conforme protocolo descrito no capítulo II deste trabalho.

Para a eletroporação, foram adicionados 2 µL de DNA (1 a 10 ng) a 40 µL do estoque de células competentes de *E. coli*. A suspensão foi homogeneizada e incubada em gelo durante aproximadamente 1 minuto. Em seguida a mistura foi adicionada à cubetas de eletroporação com espaço interno de 2,0 mm (Eppendorf) previamente resfriada em gelo e no tratamento controle, não foi feita a adição da reação de ligação, sendo o volume da reação completado com água ultra pura. O procedimento foi realizado em um eletroporador Eppendorf modelo 2510 ajustado às seguintes condições: resistência de 200 Ω; capacitância de 25 µF. A voltagem foi ajustada conforme a distância entre os eletrodos da cuveta: 2,5 kV (para cuvetas com distância entre os eletrodos de 0,2 cm) ou 1,5 a 1,8 kV (para cuvetas com distância entre os eletrodos de 0,1 cm) e foi aplicado apenas um pulso para cada transformação.

Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de meio SOC (1 mL de SOB [1litro: 20 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 0,58 g de cloreto de sódio, 0,2 g de cloreto de potássio, pH 7,5 ajustado com KOH 5N], 40 µL de glicose 20%, 40 µL de MgCl₂ 1M) recém preparado e as células foram suspensas cuidadosamente por pipetagem. A suspensão foi transferida para um tubo de centrífuga de 15 mL e incubada a 37 °C, durante 1 hora.

Após a incubação foram cultivados 150 µL da suspensão em meio LB ágar suplementado com os antibióticos estreptomicina 30 mg/L e carbenicilina 100 mg/L; com X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil- beta-D-galactopiranosídeo) 80 µL/mL e IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) 0,5 mM e as placas foram incubadas a 37 °C durante 18 horas até o aparecimento das colônias.

3.2.6 Extração do DNA plasmidial

As colônias brancas foram selecionadas e inoculadas em 5 mL meio LB suplementado com estreptomicina 30 mg/L e carbenicilina 100 mg/L e cultivadas a 37 °C por 16 H. Uma alíquota de 3,0 mL foi coletada de cada tubo e submetida à centrifugação a 12.000 rpm, por 5 minutos (MiniSpin - Eppendorf).

Após a centrifugação, as células foram coletadas e ressuspensas em 200 μ L da solução de Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM e glucose 50 mM. Em seguida fez-se a adição de 200 μ L da solução de lise, constituída de SDS 10% e NaOH 4,0 M. Após 5 minutos foi adicionado à amostra 200 μ L de uma solução de neutralização (acetato de potássio 2,8 M).

Os tubos foram mantidos no gelo por aproximadamente 5 minutos e em seguida foram centrifugados a 12.000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado em tubos novos e a este foi adicionado 2/3 do volume de isopropanol para a precipitação do DNA. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos e em seguida centrifugadas a 12.000 rpm, por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. Após a etapa de lavagem, o DNA extraído foi diluído em 50 μ L de água ultra pura altoclavada, acrescida de 2,0 μ L de RNase A (1,0 mg/mL). As amostras contendo o DNA plasmidial foram quantificadas em espectrofotômetro, medindo-se a absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm para o cálculo da concentração e confirmação da pureza e uma alíquota foi aplicada em um gel de agarose 1% para corrida de eletroforese.

3.2.7 Sequenciamento dos clones produzidos

Após a clonagem e confirmação por PCR, os insertos foram sequenciados para a certificação de ausência de mutações, com o uso de iniciadores universais (M13). As reações foram realizadas com o Kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing, de acordo com as especificações do fabricante, e os produtos analisados em sequenciador automático de DNA MegaBACE 1000 (GE Healthcare, USA).

Após o sequenciamento em MegaBACE1000, os clones foram analisadas com o auxílio do pacote Phred/Phrap/Consed (EWING *et al.*, 1998, GORDON *et al.*, 1998) para a obtenção das sequências consenso e foram alinhadas com o auxílio do programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994) e a ocorrência de possíveis mutações foi analisada.

Após a confirmação pelo sequenciamento, o inserto clonado com os sítios para as enzimas *Bgl*III e *Bst*EII foi transferido para o vetor pCAMBIA 1305.2.

3.2.8 Clonagem do inserto no vetor de expressão extracelular

Para a expressão da sequência codificadora de *VuChiI* clonada e produção da proteína recombinante com peptídeo sinal de endereçamento para o espaço extracelular, os insertos

previamente clonados, foram subclonados para o vetor de binário pCAMBIA1305.2 (Figura 1). Para realizar a subclonagem, os insertos foram recuperados por dupla digestão de pGEM-T Easy::*VuChiI* com as enzimas *Bgl*III e *Bst*EII e após eletroforese em gel de agarose, o fragmento foi purificado com o kit GFX (GE) e ligado ao vetor pCAMBIA 1305.2 também digerido com *Bgl*III e *Bst*EII, usando a T4 DNA ligase. Ambas as reações de digestão foram preparadas em um volume de 10 µL, contendo 1 µL de DNA, 0,1 µL (1U) de *Bgl*III, 0,1 µL (1U) de *Bst*EII, 1 µL do tampão O (Tris-HCl 50 mM-pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM e BSA 0,1 mg/ml) e 7,8 µL de água ultra pura. A reação foi incubada à 37 °C em termociclador PTC-200 por 2 horas.

A construção do vetor pCAMBIA 1305.2 com o inserto *VuChiI*, está sob controle do promotor CaMV35S e sua expressão é direcionada para o espaço apoplástico, já que o vetor contém, na região do T-DNA, um peptídeo de sinalização da proteína rica em glicina do arroz (GRP).

O produto da reação de ligação no vetor de expressão foi usado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10 F' por meio de eletroporação. As suspensões foram cultivadas em placas de meio de cultura LB ágar, suplementado com estreptomicina (30 mg/L) e canamicina (50 mg/L). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 18 horas e os clones selecionados submetidos ao processo de extração de plasmídeo pelo método da lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Os plasmídeos extraídos de *E. coli*, após confirmação da presença dos insertos por PCR ou digestão, foram introduzidos em células eletrocompetentes de *A. tumefaciens* LBA4404 por eletroporação. A seleção dos transformantes foi conduzida em meio YM contendo os antibióticos canamicina 50 mg/L e higromicina 50 mg/L.

3.2.9 Transformação de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. *Xanthi*) via agroinfecção

As plantas de tabaco foram transformadas pelo método de agroinfecção (HORSCH *et al.*, 1985). Os explantes foliares das plantas de tabaco foram expostos a uma suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com o vetor pCAMBIA1305.2::*VuChiI*. Como controle, explantes de tabaco foram co-cultivados com *A. tumefaciens* contendo o vetor íntegro. Explantes não transformados também foram usados como controle.

Os explantes foram expostos à suspensão bacteriana ou ao meio de cultura por uma hora. Esse procedimento ocorreu na ausência de luz, sob agitação constante (40 rpm) e a uma temperatura de 30 °C. Ao final do período de incubação, os explantes pertencentes a cada

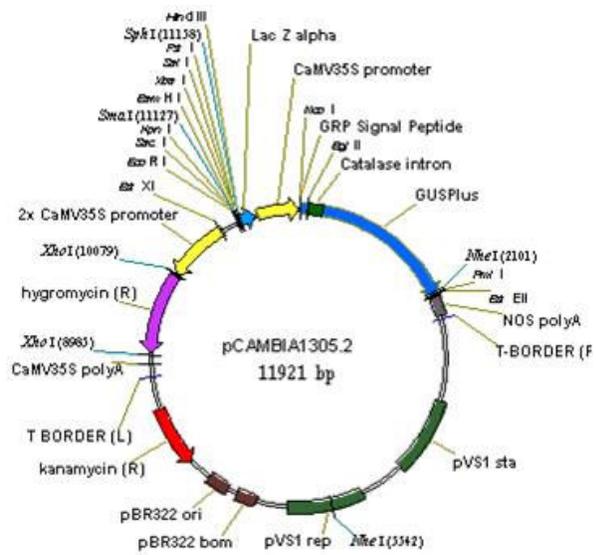


Figura 1: Mapa circular do vetor binário pCAMBIA 1305.2 (CAMBIA Vectors)

tratamento foram, separadamente, secos em papel de filtro estéril e então transferidos para placas de Petri (90 mm) contendo meio MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) acrescido de sacarose 3,0%, e agar 0,7%. Em cada placa foram adicionados dez explantes com a face adaxial voltada para o meio de cultura. As placas contendo os explantes foram mantidas por 48 horas a uma temperatura de 30 °C na ausência de luz. Após o período de co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio MS contendo os antibióticos apropriados (cefotaxima 500 mg/L e higromicina 50 mg/L) e BAP (6-benzilaminopurina) 1 mg/L . Os brotos adventícios formados foram enraizados em meio MS desprovido de reguladores de crescimento. As plantas enraizadas foram transferidas para o solo e mantidas em câmara de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 28 ± 3 °C.

3.2.10 Análise dos transformantes primários por PCR

As plantas regeneradas em meio seletivo tiveram seu DNA extraído pelo mesmo método já descrito no capítulo 1 deste trabalho. O DNA foi quantificado e usado como molde em uma reação de PCR seguindo as mesmas condições já descritas no tópico de amplificação de *VuChiI*. Somente as plantas que apresentaram amplificação do transgene foram submetidas ao processo de aclimatação.

3.2.11 Obtenção das gerações de plantas de tabaco contendo o inserto VuChiI

A seleção de linhagens de plantas de tabaco foi conduzida com base no protocolo proposto por Fisher e Guiltinan (1995). Os transformantes primários foram mantidos em casa de vegetação sob condição de dias longos e alta intensidade luminosa. As flores dos transformantes primários foram envolvidas com tecido de trama fina para permitir a autopolinização. As cápsulas foram coletadas e secas antes da maturação normal na planta. Sementes da geração R1 foram semeadas e selecionadas em meio contendo MS basal acrescido de sacarose 3%, ágar 0,7% e higromicina 50 mg/L.

3.2.12 Extração de proteínas dos tecidos vegetais

Foram selecionados um grama de folha para 3 ml de tampão acetato de sódio 50 mM. O tecido foi macerado em banho de gelo por um tempo padronizado de 10 minutos. O material macerado foi colocado em tubo de centrífuga graduado de 15 mL centrifugado em

centrífuga Eppendorf modelo 5810R, por 15 minutos a 10.000 g a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e colocado para diálise por 48 horas em uma membrana fina de 12 kDa. A diálise foi realizada com tampão de extração acetato de sódio, as amostras foram mantidas sobre agitação em agitador magnético e o tampão substituído a cada período de 4 horas. Após a diálise, as amostras foram centrifugadas novamente e o sobrenadante foi descartado. Após a centrifugação as amostras foram incubadas em banho de gelo e dosadas em seguida.

3.2.13 Atividade quitinásica

Após obtenção do extrato protéico das plantas transformadas, uma alíquota de 250µL da amostra foi adicionada a 250 µL de quitina coloidal em três repetições. Para o controle da reação (branco), foi adicionado apenas 250 µL da amostra. Os tubos contendo as amostras foram incubados por 1 hora a 37°C no homogeneizador ap22 Phoenix, seguido de 8 minutos de fervura a 45 °C e 6 minutos de resfriamento em gelo. Após o resfriamento, adicionou-se 250µL da quitina coloidal a amostra controle (branco). Os tubos foram centrifugados em centrífuga Eppendorf modelo 5810R a 13.000 rpm, temperatura ambiente, durante 15 minutos. Foram retirados 300µL do sobrenadante e transferidos para novos tubos. A estes, adicionou-se 10µL de glucuronidase em cada tubo. As amostras foram novamente incubadas a 37 °C, por 1 hora, seguida de 5 minutos de fervura a 45 °C e 5 minutos de resfriamento em gelo. Ao total de 110 µL adicionou-se 310 µL de tampão acetato de sódio e 100 µL de tetraborato de potássio 0,6 M. Repetiu-se o procedimento de fervura por exatos 5 minutos a 95 °C, seguido de banho de gelo. Adicionou-se um ml de DMAB em cada tubo, seguido de banho-maria por 20 minutos. A leitura das amostras foi feita por espectrofotometria a 585nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construção do vetor recombinante binário pCAMBIA 1305.2::VuChiI

Para a construção do vetor pCAMBIA 1305.2::VuChiI, inicialmente foi realizada uma reação de amplificação da sequência de VuChiI (894 pb), previamente clonada por Correia (2007) utilizando os iniciadores QuiBglIII QuiBstEII. O produto da reação de amplificação foi ligado em pGEM-T Easy e então eletroporado em células de *E. coli* Top10 F' produzindo vários clones. Dez clones foram selecionados e o seu DNA foi extraído e utilizado como molde em uma reação de PCR. O resultado da reação mostrou que os dez clones testados apresentavam a amplificação de VuChiI com a formação de banda com peso molecular correspondendo ao tamanho do fragmento esperado (894 pb) (Figura 2).

Após a PCR o DNA dos clones foi digerido com BglIII e BstEII, como uma forma adicional para confirmar a inserção de VuChiI no vetor de clonagem pGEM-T Easy. Esse ensaio corroborou com os dados obtidos no experimento da PCR, pois mostrou a presença no gel de eletroforese de fragmentos de 3015 pb, correspondente ao pGEM-T Easy, e de 894 pb, correspondente à sequência codificadora de VuChiI (Figura 3). Após a digestão o DNA extraído de um dos clones confirmados foi completamente sequenciado. O alinhamento da sequência obtida com a sequência do clone utilizado como molde na reação de amplificação do gene mostrou que o clone S1 alinhou-se com a sequência original com substituição de uma guanina por uma adenina na posição 38 e de uma adenina por uma timina na posição 477 (Figura 4). O alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo clone S1 com o clone molde mostrou que ocorreu a substituição de um ácido glutâmico por uma glicina causada pela mutação na posição 38. A mutação na posição 477 foi silenciosa não apresentando efeito sobre a sequência de aminoácidos da proteína (Figura 5). De acordo com os estudos de modelagem realizados por Correia (2007) este resíduo de aminoácido está localizado em uma região de 'loop' ou alça. Esta alteração provavelmente não ocasionará grandes prejuízos à molécula, uma vez que os resíduos de aminoácidos responsáveis pela ligação do domínio heveínico à quitina são, nas sequências analisadas, Ser18, Phe20 e Trp22 (SUETAKE *et al.*, 2000). O domínio heveínico é essencial para a habilidade de rVuChiI ligar-se ao polímero de quitina e, dessa forma, aumentar a eficiência da hidrólise de substratos solúveis e insolúveis pelo domínio catalítico. Segundo Ohnuma *et al.* (2004) o resíduo de triptofano (Trp22) deste domínio tem a principal contribuição para esta função.

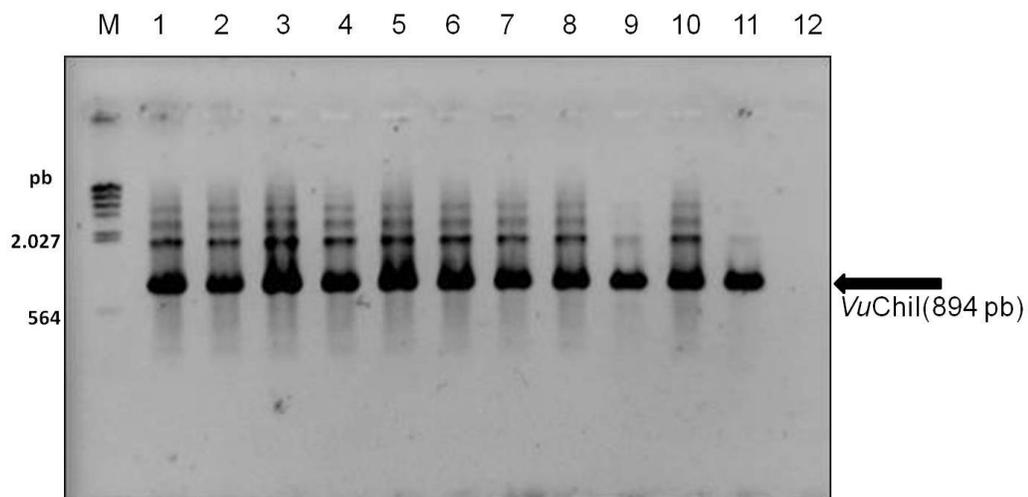


Figura 2: Reação de amplificação de *VuChiI* (894 pb, destacada no retângulo) em pGEM T-Easy com os primers *QuiBgIII* e *QuiBstEII*. Marcador: DNA λ digerido com *HindIII* (200 ng). Poços 1 a 10: colônias brancas putativamente transformadas, Poço 11: controle positivo, Poço 12: Branco

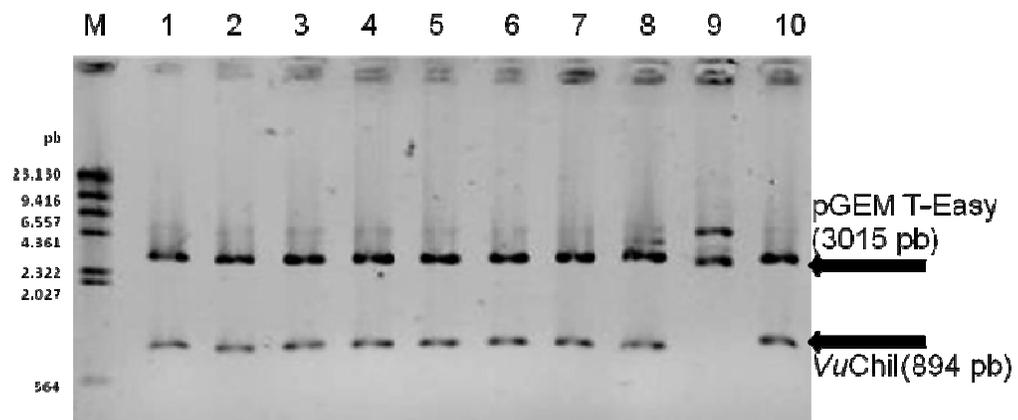


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 0,8% da digestão dos clones de pGEM-T Easy::VuChil com *Bgl*II e *Bst*EII. Marcador λ DNA-*Hind*III digest, Poços 1 a 10: Clones 1 a 10. Clones confirmados: 1 a 8 e 10

```

Clone_s1      CAGTGTGGAAGCCAAGCGGGGGTGCCTGTGTCCAGGGGTCTCTGTTGCAGTCAGTTC 60
Clone_R7      CAGTGTGGAAGCCAAGCGGGGGTGCCTGTGTCCAGAGGGTCTCTGTTGCAGTCAGTTC 60
*****
Clone_s1      GGGTGGTGC GGCTCCACCGACGACTACTGCGGCAAGGGTTGCCAGAGCCAGTGC GGGGGA 120
Clone_R7      GGGTGGTGC GGCTCCACCGACGACTACTGCGGCAAGGGTTGCCAGAGCCAGTGC GGGGGA 120
*****
Clone_s1      CAGCCGGCTCCGTCTGATCTCAGCGCTCTGATAACCCAGGGCCACCTTCGACCAGATGCTC 180
Clone_R7      CAGCCGGCTCCGTCTGATCTCAGCGCTCTGATAACCCAGGGCCACCTTCGACCAGATGCTC 180
*****
Clone_s1      AAACATCGCAACGACGGAGCCTGCCAGCCAGAGGCTTCTACACCTACGATGCCTTCATC 240
Clone_R7      AAACATCGCAACGACGGAGCCTGCCAGCCAGAGGCTTCTACACCTACGATGCCTTCATC 240
*****
Clone_s1      GCGCCGCCAGGGCTTTC C C C CAGCTTCGGCAACACCGGAGACACAGCCACTCGAAAGAGA 300
Clone_R7      GCGCCGCCAGGGCTTTC C C C CAGCTTCGGCAACACCGGAGACACAGCCACTCGAAAGAGA 300
*****
Clone_s1      GAGATCGCGCCTTCTTGGGGCAAACGCTTCACGAAACAACCGGGGGATGGCCCTCTGCA 360
Clone_R7      GAGATCGCGCCTTCTTGGGGCAAACGCTTCACGAAACAACCGGGGGATGGCCCTCTGCA 360
*****
Clone_s1      CCGGACGGACCATAACGCATGGGGTTACTGCTTCGTGAGAGAGCAGAACCCAAGCGCCTAC 420
Clone_R7      CCGGACGGACCATAACGCATGGGGTTACTGCTTCGTGAGAGAGCAGAACCCAAGCGCCTAC 420
*****
Clone_s1      TGCTCCCCAACCCCCAGTTC C C C T G C G T T C T G G C C A G C A A T A C T A T G C A G G G A C C G 480
Clone_R7      TGCTCCCCAACCCCCAGTTC C C C T G C G T T C T G G C C A G C A A T A C T A T G C A G G G A C C G 480
*****
Clone_s1      ATCCAGATATCCTGGAAC T A C A A C T A C G G T C A G T C G G A A A T G C A A T T G G A G T G G A T T T G 540
Clone_R7      ATCCAGATATCCTGGAAC T A C A A C T A C G G T C A G T C G G A A A T G C A A T T G G A G T G G A T T T G 540
*****
Clone_s1      ATCAACAACCC T G A T C T C G T C G C C A C C G A C C C C G T C T C C T T C A A G T C C G C C A T C T G G 600
Clone_R7      ATCAACAACCC T G A T C T C G T C G C C A C C G A C C C C G T C T C C T T C A A G T C C G C C A T C T G G 600
*****
Clone_s1      TTCTGGATGACCCCGCAGTCCCCCAAGCCTTCCTCCACGACGTCATCACCTCTCAGTGC 660
Clone_R7      TTCTGGATGACCCCGCAGTCCCCCAAGCCTTCCTCCACGACGTCATCACCTCTCAGTGC 660
*****
Clone_s1      ACTCCCTCCGCCGCCGATGTGCGCCGGGAAGCTTCCAGGCTACGGCACTGTGACGAAC 720
Clone_R7      ACTCCCTCCGCCGCCGATGTGCGCCGGGAAGCTTCCAGGCTACGGCACTGTGACGAAC 720
*****
Clone_s1      ATCATCAACGGAGGCCTGGAGTGC G G C A G A G G A C A G G A T A G C A G G T G G A G A C C G C A T C 780
Clone_R7      ATCATCAACGGAGGCCTGGAGTGC G G C A G A G G A C A G G A T A G C A G G T G G A G A C C G C A T C 780
*****
Clone_s1      GGTTCTTCAAGCGATACTGTGATCTGTTGGAGTTGGTTATGGCAACAACCTTGACTGC 840
Clone_R7      GGTTCTTCAAGCGATACTGTGATCTGTTGGAGTTGGTTATGGCAACAACCTTGACTGC 840
*****
Clone_s1      TACTCTCAGGCCCCATTTGGA A A T T C C C T G C T T A A T C T C C A T C C C A T C G T C T G A 894
Clone_R7      TACTCTCAGGCCCCATTTGGA A A T T C C C T G C T T A A T C T C C A T C C C A T C G T C T G A 894
*****

```

Figura 4: Alinhamento da sequência do clone S1 (excluindo-se as sequências extras, adicionadas aos iniciadores) com a sequência do clone R7 (*VuChiI*), usado como molde nas reações de PCR. Ocorreu a substituição de uma guanina por uma adenina na posição 38 e de uma adenina por uma timina na posição 477

```

Clone_R7  -QCGSQAGGALCPEGLCCSQFGWCGSTDDYCGKGCQSQCGGQPAPSDLSALIPRATFDQM 59
Clone_S1  MQCGSQAGGALCPGGLCCSQFGWCGSTDDYCGKGCQSQCGGQPAPSDLSALIPRATFDQM 60
*****

Clone_R7  LKHRNDGACPARGFYTYDAFIAAARAFPSFGNTGDTATRKREIAAFLGQTSHETTGGWPS 119
Clone_S1  LKHRNDGACPARGFYTYDAFIAAARAFPSFGNTGDTATRKREIAAFLGQTSHETTGGWPS 120
*****

Clone_R7  APDGPYAWGYCFVREQNPSAYCSPTFPQPCASGQYYGRGFIQISWNYNYGQCGNAIGVD 179
Clone_S1  APDGPYAWGYCFVREQNPSAYCSPTFPQPCASGQYYGRGFIQISWNYNYGQCGNAIGVD 180
*****

Clone_R7  LINNPDLVATDPVVSFKSAIWFWMTPQSPKSSHDVITSQWTPSAADVAAGKLPYGTVT 239
Clone_S1  LINNPDLVATDPVVSFKSAIWFWMTPQSPKSSHDVITSQWTPSAADVAAGKLPYGTVT 240
*****

Clone_R7  NIINGGLECGRGQDSRVEDRIGFFKRYCDLFGVGYGNNLDCYSQAPFGNSLLNLHPIV 297
Clone_S1  NIINGGLECGRGQDSRVEDRIGFFKRYCDLFGVGYGNNLDCYSQAPFGNSLLNLHPIV 298
*****

```

Figura 5: Alinhamento das seqüências de aminoácidos codificadas pelos clones S1 e R7. Ocorreu uma substituição de um ácido glutâmico por uma glicina no clone S1 em comparação com o molde

O clone S1 foi multiplicado para uma preparação em pequena escala. Após 18 horas de cultivo foi observada a formação de diversas colônias dentre estas 12 foram selecionadas ao acaso para preparação de DNA plasmidial em pequena escala e digestão com as endonucleases *Bgl*III e *Bst*EII. O resultado obtido a partir do ensaio de digestão enzimática pode ser observado na Figura 6, a qual mostra indícios de que a subclonagem foi bem sucedida já que é possível visualizar a presença de fragmento de 894 pb, correspondendo a *VuChiI* (Figura 4). O vetor pCAMBIA 1305.2 possui um promotor CaMV35S dobrado e a sequência de um peptídeo sinal GRP (*glycin-rich protein*) de endereçamento do produto do gene *GUS* para o espaço extracelular. A construção foi feita de modo a aproveitar a sequência deste peptídeo para secreção de *VuChiI* no espaço apoplástico, para isso o gene repórter foi retirado por digestão com *Bgl*III e *Bst*EII e a quitinase foi inserida aproveitando os sítios para fundi-la ao peptídeo sinal. A superexpressão de genes que são induzidos após estresses bióticos e abióticos é uma estratégia muito usada, para melhorar a resposta de plantas ao ataque de patógenos. Tais genes incluem genes para quitinases como é o caso desse trabalho, além de glucanases, MAPK, fatores de transcrição entre outros (DANA *et al.*, 2006).

4.2 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 com o inserto de *VuChiI*

O plasmídeo pCAMBIA::*VuChiI* foi extraído pelo método da lise alcalina a partir de culturas do clone S1 de *E. coli* Top 10 F' e foi inserido em células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 por eletroporação, conforme já descrito na metodologia. As células eletroporadas de *A. tumefaciens* quando inoculadas em meio YM contendo 30 mg/L de estreptomicina e 50 mg/L de canamicina resultaram em colônias após aproximadamente 48 horas de incubação. No controle da transformação onde as células foram eletroporadas apenas na presença de água, não foi observada a formação de colônias. Apenas 3 colônias foram obtidas e inoculadas em meio YM contendo antibióticos para a extração de DNA plasmidial. O DNA plasmidial extraído foi utilizado em uma reação de PCR com os primers Qui*Bgl*III e Qui*Bst*EII. O produto da reação de amplificação, ao ser aplicado em gel de agarose 0,8% e visualizado em luz ultravioleta mostrou que os três clones apresentaram amplificação de um fragmento compatível com os 894 pb de *VuChiI* (Figura 7).

As linhagens recombinantes de *A. tumefaciens* em que o T-DNA nativo é substituído por genes de interesse, são os veículos mais eficientes utilizados atualmente para a introdução de genes exógenos em plantas (CITOVSKY *et al.*, 2007). O método apresenta boa eficiência e baixo custo operacional (BRASILEIRO, 1998). Outras vantagens incluem a inserção de baixo

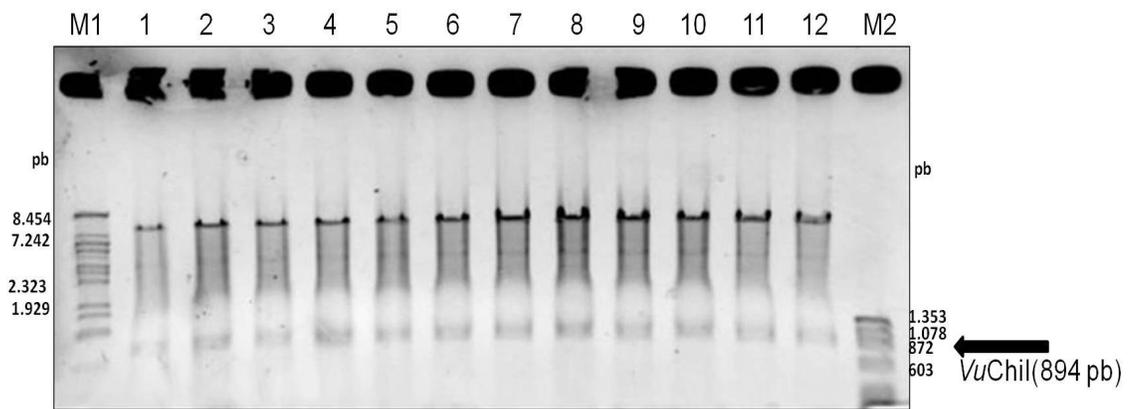


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 0,6% da digestão do plasmídeo pCAMBIA 1305.2.:*VuChiI* com as enzimas *Bgl*II e *Bst*EII. Marcador 1: DNA λ digerido com *Bst*EII; Poços 1 ao 12: clones confirmados, Marcador 2: DNA ϕ X174 digerido com *Hae*III

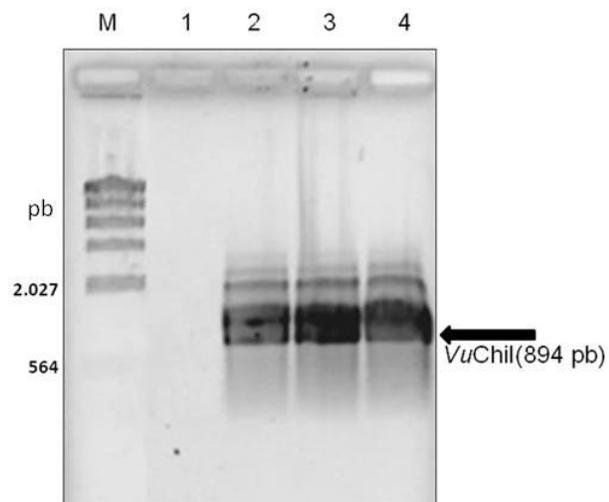


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 0,8% de pCAMBIA1305.2::VuChiI amplificado com os iniciadores específicos Qui/BgII e Qui/BsteII. Marcador DNA λ digerido com *Hind*III (200 ng); Poço 1: controle negativo, Poços 2, 3 e 4: clones 1, 6 e 8 de pCAMBIA1305.2::Quit

número de cópias do transgene que evita o silenciamento do mesmo, maior proporção de plantas com cópias intactas do transgene e maior estabilidade na expressão em comparação com a biobalística (DAI *et al.*, 2001, TRAVELLA *et al.*, 2005).

4.3 Transformação de plantas de tabaco com o inserto *VuChiI*

Segmentos foliares de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) foram co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens* portando o plasmídeo pCAMBIA::*VuChiI*. Após o co-cultivo os explantes foram cultivados em meio MS seletivo (sais e vitaminas MS, sacarose 3,0%, ágar 0,7%, 1,0 mg/L de BAP, 500 mg/L de cefotaxima, 50 mg/L de canamicina, MES 0,5 mg/mL e acetoseringona 100 µM, pH 5,8) para regeneração de plantas putativamente transgênicas. Ao final de cinco semanas de cultivo, os brotos regenerados a partir de explantes de cada tratamento, foram cuidadosamente seccionados em condições estéreis e transferidos para frascos contendo meio de enraizamento (sais e vitaminas MS, sacarose 3,0%, ágar 0,7%, pH 5,8) contendo 50 mg/L de higromicina (Figura 8). O método de transformação mais indicado para este tipo de abordagem (superexpressão) é a transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, pois ao contrário do sistema de bombardeamento é um método guiado de inserção do transgene apresentando uma menor frequência de integração em tandem de múltiplas cópias que levaria ao silenciamento gênico ao invés de expressar constitutivamente o gene (RIVA *et al.*, 1998, KUMAR E FLADUNG, 2001).

Os procedimentos de transformação *in vitro* induzem diversas variações nos transformantes primários (R0). Nesta geração de transgênicos, a cultura de tecidos e os efeitos da transformação são confundidos. Está bem estabelecido que o processo de cultura de tecidos possa gerar tanto variações epigenéticas, que são induzidas pelo ambiente no fenótipo, como variações somaclonais. Mesmo com um processo rigoroso de seleção durante a transformação e regeneração, plantas quiméricas, com tecidos transformados e não-transformados, podem persistir na geração R0. (BHAT E SRINIVASAN, 2002). As variações somaclonais também contribuem para diferenças entre os transgênicos. Muitos fatores têm sido descritos como responsáveis por estas variações, mas a maioria deles pode ser classificada como fatores de estresse, aos quais as plantas estão sujeitas durante a desdiferenciação e regeneração na cultura de tecidos incluindo as lesões, a desidratação, o estresse osmótico e o suprimento insuficiente de nutrientes (FILIPECKI E MALEPSZY, 2006).

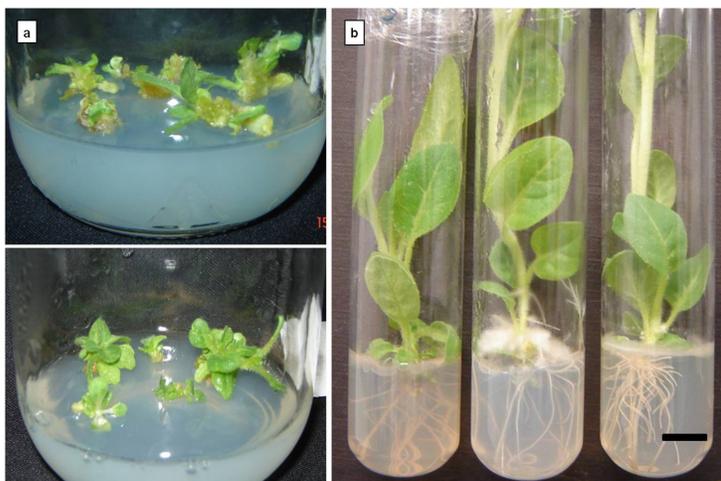


Figura 8: Regeneração de tabaco em meio seletivo (a) e Plantas de tabaco regeneradas em meio seletivo (MS adicionado de higromicina 50 mg/L) transformadas por co-cultivo com *A. tumefaciens* portando o vetor pCAMBIAVuChiI em meio de enraizamento (b). Barra: 1 cm

A transformação genética de plantas com sequencias codificadoras de quitinases tem sido realizada em muitos trabalhos, empregando genes de origem diversa e uma grande variedade de espécies de plantas hospedeiras. Algumas vantagens das quitinases na proteção de plantas contra patógenos incluem seu potencial fungicida, o fato de possuírem um alvo específico, minimizando efeitos nocivos à planta hospedeira e seu caráter atóxico a humanos e vertebrados superiores, além de conferirem resistência a um amplo espectro de patógenos (PATIL *et al.*, 2000). Deste modo, a introdução de genes de quitinases em plantas mostra-se uma estratégia eficiente para o combate de sintomas e doenças provocadas por tais microrganismos, aumentando a produtividade, reduzindo os custos associados à produção e contribuindo para uma redução nos índices de poluição ambiental vinculada ao uso de fungicidas. Além de conferir a vantagem adaptativa da resistência a doenças causadas por fungos, genes de quitinases também podem conferir um caráter tóxico a insetos, o que reduziria a predação das plantas por esses animais (WANG *et al.*, 1999).

Em comparação com as quitinases fúngicas, as quitinases de plantas são geralmente endoquitinases; têm massas moleculares com cerca de 30 kDa podem ter natureza ácida ou básica. As formas ácidas são secretadas para o apoplasto ou ambiente extracelular, enquanto as básicas são acumuladas intracelularmente nos vacúolos (BOL *et al.*, 1990; SAHAI E MANOCHA, 1993). Castro (2011) realizaram um trabalho de caracterização de *VuChiI* e estabeleceram que o valor do pI é 5, sendo uma quitinase acídica. Essas características indicam que essa enzima possa ser ativa no espaço apoplástico. As quitinases de classe I estão localizadas principalmente nos vacúolos e são subdivididas nas classes Ia e Ib (THEIS E STAHL, 2004, SHAKBAZAU E KARTEL, 2008). A maioria das quitinases de classe Ia apresentam um elevado pI e estão localizadas nos vacúolos. As quitinases acídicas pertencentes à classe Ib são secretadas para o espaço apoplástico (ARIE *et al.*, 2000).

A etapa seguinte de confirmação da transformação consistiu na extração de DNA genômico dos clones enraizados em meio seletivo. O DNA extraído foi usado como molde em uma reação de amplificação com iniciadores específicos. Os produtos de PCR foram aplicados em eletroforese em gel de agarose 0,8% resultando em bandas correspondentes ao tamanho do fragmento do gene *VuChiI* (≈ 900 pb). Os clones dos tratamentos controle não tiveram seu DNA amplificado com os iniciadores específicos para *VuChiI* como já era esperado (Figura 9). Foram produzidas três linhagens de plantas transformadas confirmadas por PCR que foram chamadas de T4A3, T4B6 e T4D1. As plantas confirmadas foram aclimatadas em substrato autoclavado formado por areia e vermiculita na proporção de 1:1 e mantidas em sala de cultura sob fotoperíodo de 12 horas a uma temperatura de 25 °C.

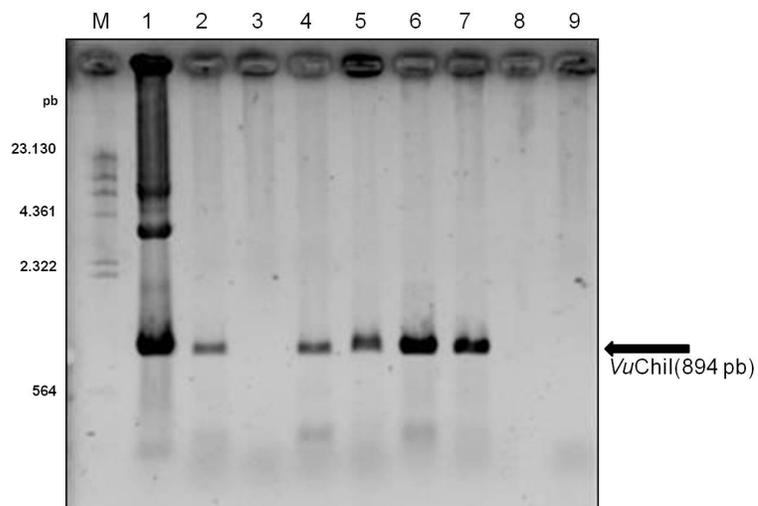


Figura 9: Reação de PCR com os iniciadores *QuiBgIII* e *QuiBstEII*, utilizando como molde o DNA gênomico extraído de plantas de tabaco regeneradas em meio de seleção. Marcador DNA λ digerido com *HindIII* (200 ng), Poços: 1: Controle positivo, pCAMBIA 1305.2::*VuChiI*, 2 e 3: Plantas do clone T4A3, 4 e 5: Plantas do clone T4B6, 6 e 7: Plantas do clone T4D1, 8: Branco da reação, 9: controle negativo, DNA extraído de planta não transgênica

Após três semanas as plantas foram transferidas para vasos de 5 dm³, contendo uma mistura de solo fertilizado e areia na proporção de 1:1 e acondicionadas em casa de vegetação. Após aproximadamente três meses de cultivo em casa de vegetação, as plantas transformadas começaram a produzir as sementes da geração R1. As sementes foram coletadas e armazenadas em câmara fria. As sementes obtidas das plantas transformadas (geração R1) e das plantas do controle negativo foram cultivadas em meio MS basal acrescido de sacarose 3%, ágar 0,7%, pH 5,8 e em meio MS basal acrescido de sacarose 3%, higromicina 50 mg/L, ágar 0,7%, pH 5,8. O ensaio foi realizado para testar a germinação das sementes obtidas das plantas transformadas e do controle negativo em meio seletivo e comparar com a germinação em meio MS basal. Apenas sementes da linhagem T4A3 foram testadas nesse experimento. O resultado deste ensaio mostrou que as sementes obtidas das plantas do controle negativo germinaram normalmente em meio MS basal com uma frequência maior que 95% em todas as quatro repetições do tratamento (Tabela 1). As sementes do controle também chegaram a expor a radícula no tratamento com antibiótico, porém tiveram seu crescimento paralizado o que é o resultado esperado já que estas plantas não possuem tolerância à higromicina (Figura 10). As sementes obtidas das plantas transformadas apresentaram germinação tanto em meio seletivo contendo higromicina quanto em meio MS basal. A frequência de germinação foi praticamente igual entre os tratamentos como pode ser observado na Figura 9. O número de sementes germinadas nas quatro repetições do experimento foi contado e está exposto na Tabela 1. A média de germinação das sementes de T4A3 em meio seletivo foi de 83,75%, enquanto que em meio MS basal foi de 91,5%. Os dados foram utilizados para análise da segregação do transgene na geração R1. A análise de X^2 mostrou que a segregação do transgene atendeu as expectativas mendelianas com nível de significância $\geq 0,05$.

O extrato proteico total foi obtido das linhagens de plantas transformadas T4A3, T4B6 e T4D1 e utilizado para detecção da atividade quitinásica contra quitina coloidal. A atividade quitinásica foi observada através do aumento da A_{585} do sobrenadante. À medida que a quitina é quebrada, esta é solubilizada acarretando um aumento da absorvância. Os ensaios de atividade mostraram que as três linhagens apresentaram atividade contra quitina coloidal, com destaque para a linhagem T4B6 que apresentou a maior atividade entre as linhagens testadas (Figura 11).

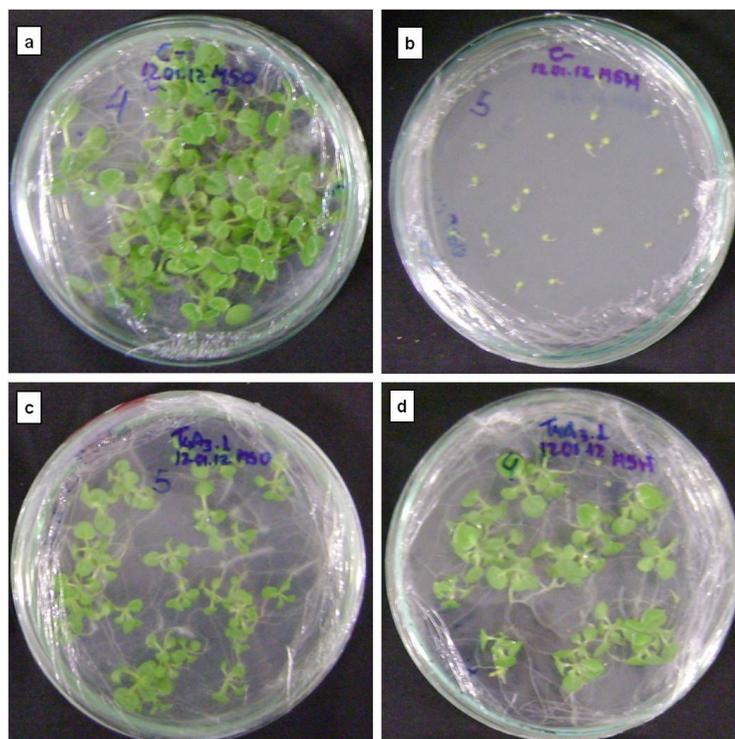


Figura 10: Plantulas de tabaco da geração R1 (Linhagem T4A3) germinadas em meio MS basal e acrescido de higromicina 50 mg/L. a) sementes do controle negativo cultivadas em meio MS basal, b) sementes do controle negativo cultivadas em meio MS acrescido de higromicina 50 mg/L, c) sementes do clone T4A3 cultivadas em meio MS basal, d) sementes do clone T4A3, cultivadas em meio MS suplementado com higromicina 50 mg/L

Tabela 1: Porcentagem de germinação das sementes da geração R1 em meio MS basal e em meio MS suplementado com higromicina 50 mg/L (MSH)

Repetição	Controle MS	Controle MSH	T4A3 MS	T4A3 MSH
1	100%	0%	85%	88%
2	95%	0%	100%	79%
3	100%	0%	86%	80%
4	100%	0%	95%	88%

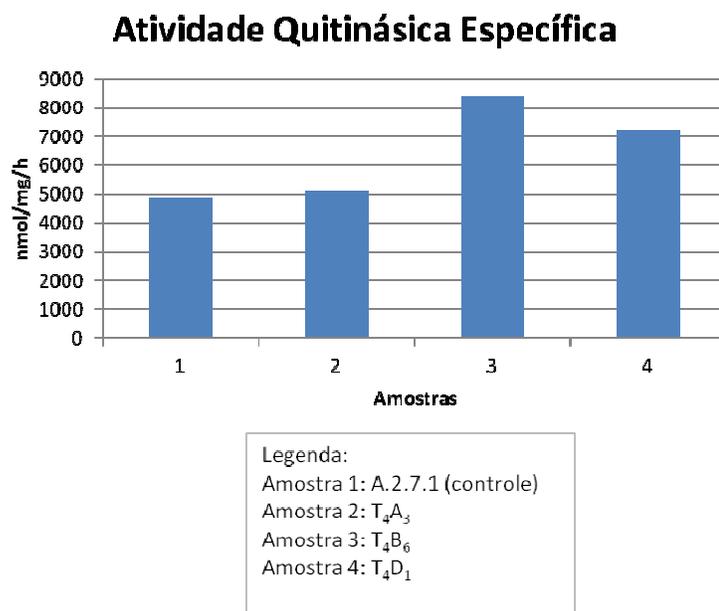


Figura 11: Atividade do extrato protéico total das linhagens transformadas e do controle negativo de tabaco. As linhagens de plantas transformadas apresentaram atividade quitinásica mesmo que com diferença discreta com relação ao controle negativo no caso da linhagem T4A3

A observação de atividade quitinásica nas linhagens transformadas testadas não pode afirmar com certeza que o efeito se deu devido à expressão extracelular da proteína, pois representa a atividade de um extrato protéico total. Apesar disso é um indício de que essas plantas possam ter uma resposta de defesa melhor em comparação ao controle negativo contra patógenos de origem fúngica.

Estudos mais aprofundados sobre o mecanismo de ação da quitinase de classe I recombinante de *V. unguiculata* devem ser realizados, para que esta proteína possa ser utilizada como ferramenta no controle de doenças causadas por fungos em plantas, como alternativa adicional ao uso de fungicidas sintéticos.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram produzidas plantas de tabaco transformadas com um vetor de superexpressão com o intuito de expressar *VuChiI* no espaço extracelular dos tecidos da planta. As plantas transformadas apresentaram a integração do transgene por PCR. Nenhuma anormalidade fenotípica foi observada nessas plantas. Análises de segregação mostraram que o transgene foi transmitido para a progênie segundo proporções mendelianas pelo teste do qui-quadrado com nível de significância $\geq 0,05$. As plantas transformadas também apresentaram atividade contra quitina coloidal.

REFERÊNCIAS

- ARIE, M., HIKICHI, K., TAKAHASHI, K., ESAKA, M. Characterisation of basic chitinase which is secreted by cultured pumpkin cells. **Physiologia Plantarum**, v. 110, p. 232-239, 2000.
- BRASILEIRO, A. Manual de transformação genética de plantas / editado por Ana Cristina Brasileiro; Vera Tavares de Campos Carneiro. **Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-Cenargen** 309p, 1998.
- BHAT, S.R., SRINIVASAN, S. Molecular and genetic analyses of transgenic plants: Considerations and approaches. **Plant Science**, v. 163, p. 673-681, 2002.
- BOL, J.F., LINTHORST, H.J.M., CORNELISSEN, B.J.C. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Annu. Rev. Phytopathology**, v. 28, p. 113-138, 1990.
- BROGLIE, K., CHET, I., HOLLIDAY, M., CRESSMAN, R., BIDDLE, P., KNOWLTON, S., MAUVAIS, C.J., BROGLIE, R. Transgenic Plants with Enhanced Resistance to the Fungal Pathogen *Rhizoctonia solani*. **Science**, v. 254, p. 1194-1197, 1991.
- BURZYTISKI, A., PIS, M., WOJTASZEK, P. Active chitinases in the apoplastic fluids of healthy white lupin (*Lupinus albus* L.) plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 22, p. 31-38, 2000.
- CASTRO, P.G. Produção em *Pichia pastoris* de uma quitinase de feijão-de-corda com atividade antifúngica. (Tese de Doutorado em Bioquímica). **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2011.
- CITOVSKY, V., KOZLOVSKY, S.V., LACROIX, B., ZALTSMAN, A., DAFNY-YELLN, M., VYAS, S., TOVKACH, A., TZFIRA, T. Biological systems of the host cell involved in Agrobacterium infection. **Cellular microbiology**, v. 9, p. 9-20, 2007.
- CORREIA, T.O. Quitinase de classe I de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*): estudo preliminar da expressão do gene, clonagem, expressão e purificação em *Escherichia coli* BL21(λ)DE3 e determinação da estrutura através da modelagem por homologia. (Dissertação de Mestrado em Bioquímica), **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC** Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2007.
- DAI, S., ZHENG, P., MARMEY, P., ZHANG, S., TIAN, W., CHEN, S., BEACHY, R.N., FAUQYET, C. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. **Molecular Breeding**, v. 7, p. 25-33, 2001.
- DANA, M.M., PINTOR-TORO, J.A., CUBERO, B. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. **Plant Physiology**, v. 142, p. 722-730, 2006.

DANI, V., SIMON, W.J., DURANTI, M., CROY, R.R.D. Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. **Proteomics**, v. 5, p. 737-745, 2005.

DI MARO, A., TERRACCIANO, I., STICCOA, L., FIANDRAC, L., RUOCCOD, M., CORRADOB, G., PARENTEA, A., RAO, R. Purification and characterization of a viral chitinase active against plant pathogens and herbivores from transgenic tobacco. **Journal of Biotechnology**, v. 147, p. 1-6, 2010.

DING, X., GOPALAKRISHNAN, B., JOHNSON, L.B., WHITE, F.F., WANG, X., MORGAN, T.D., KRAMER, K.J., MUTHUKRISHNAN, S. Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. **Transgenic Research**, v. 7, p. 77-84, 1998.

DUNG, T., DUC, L., HO, N., UYEN, N. *Agrobacterium*-mediated transformation of CRY1Ac gene to tobacco (*Nicotiana tabacum*) and evaluation of *Heliothis armigera* resistance. **Proceedings of International Workshop on Biotechnology in Agriculture**, p. 156-160, 2006.

EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M., GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.

FECHT-CHRISTOFFERS, M.M., BRAUN, H.-P., LEMAITRE-GUILLIER, C., VANDORSSELAER, A., HORST, W.J. Effect of Manganese Toxicity on the Proteome of the Leaf Apoplast in Cowpea. **Plant Physiology**, v. 133, p. 1935-1946, 2003.

FERNANDES, G.C. Transformação de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) com a região codificadora de uma quitinase de *Chromobacterium violaceum*. (Monografia de Graduação em Ciências Biológicas), **Departamento de Biologia, UFC**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2010.

FILIPECKI, M., MALEPSZY, S. Unintended consequences of plant transformation: molecular insight. **Journal of Applied Genetics**, v. 47, p. 277-286, 2006.

FIOCCHETTI, F., D'AMORE, R., DE PALMA, M., BERTINI, L., CARUSO, C., CAPORALE, C., TESTA, A., CRISTINZIO, G., SACCARDO, F., TUCCI, M. Constitutive over-expression of two wheat pathogenesis-related genes enhances resistance of tobacco plants to *Phytophthora nicotianae*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 73-84, 2008.

FISHER, D.K., GUILTINAN, M.J. Rapid, Efficient Production of Homozygous Transgenic Tobacco Plants with *Agrobacterium tumefaciens*: A Seed to Seed Protocol. **Department of Horticulture, Intercollegiate Programs in Plant Physiology and Genetics, and The Biotechnology Institute, The Pennsylvania State**, p. 1-19, 1995.

GORDON, D., ABAJIAN, C., GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202, 1998.

HELGESON, J.P. Tissue and cell suspension culture. Em: BURK *et al.* (contribuidores) *Nicotiana* procedures for experimental use. **USDA, USA**, p. 52-59, 1979.

HORSCH, R.B., FRY, J.E., HOFFMANN, N.L., EICHHOLTZ, D., ROGERS, S.G., FRALEY, R.T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**, v. 227, p. 1229-1231, 1985.

JACH, G., GORNHARDT, B., MUNDY, J., LONGEMANN, J., PINSDORF, E., LEAH, R., SCHELL, J., MAAS, C. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. **The Plant Journal**, v. 8, p. 97-109, 1995.

JUBE, S., BORTHAKUR, D. Expression of bacterial genes in transgenic tobacco: methods, applications and future prospects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 452-467, 2007.

KERN, M.F., MARASCHIN, S.D.F. Expression of a Chitinase Gene from *Metarhizium anisopliae* in Tobacco Plants Confers Resistance against *Rhizoctonia solani*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, p. 1933-1946, 2010.

KUMAR, S., FLADUNG, M. Controlling transgene integration in plants. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 155-159, 2001.

LORITO, M., WOO, S.L., GARCIA, I., COLUCCI, G., HARMAN, G.E., PINTOR-TORO, J.A., FILIPPONE, E., MUCCIFORA, S., LAWRENCE, C.B., ZOINA, A., TUZUN, S., SCALA, F. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 7860-7865, 1998.

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

NIELSEN, K.K., MIKKELSEN, J.D., KRAGH, K.M., BOJSEN, K. An Acidic Class III Chitinase in Sugar Beet: Induction by *Cercospora beticola*, Characterization, and Expression in Transgenic Tobacco Plants, **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 6, p. 495-506, 1993.

NTUI, V.O., AZADI, P., THIRUKKUMARAN, G., KHAN, R.S., CHIN, D.P., NAKAMURA, I., MII, M. Increased resistance to fusarium wilt in transgenic tobacco lines co-expressing chitinase and wasabi defensin genes. **Plant Pathology**, v. 60, p. 221-231, 2011.

OHNUMA, T., TAIRA, T., YAMAGAMI, T., ASO, Y., ISHIGURO, M. Molecular cloning, functional expression, and mutagenesis of cDNA encoding class I chitinase from rye (*Secale cereale*) seeds. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 68, p. 324-332, 2004.

PATIL, R., GHORMADE, V., DESHPANDE, M. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and microbial technology**, v. 26, p. 473-483, 2000.

PROFOTOVÁ, B., BURKETOVÁ, L., VALENTOVÁ, O. Chitinase isozymes induced by TYMV and *Leptosphaeria maculans* during compatible and incompatible interaction with *Brassica napus*. **Biologia Plantarum**, v. 51, p. 507-513, 2007.

PUNJA, Z.K., RAHARJO, S.H.T. Response of transgenic cucumber and carrot plants expressing different chitinase enzymes to inoculation with pathogens. **Plant Disease**, v. 80, p. 999-1005, 1996.

RIVA, G.A., GONZÁLEZ-CABRERA, J., VÁZQUEZ-PADRÓN, R., AYRA-PARDO, C. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 1-16, 1998.

ROHINI, V.K., RAO, K.S. Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease. **Plant Science**, v. 160, p. 889-898, 2001.

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

SAHAI, A.S., MANOCHA, M.S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 11, p. 317-338, 1993.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2^o edição. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989.

SHAKHBAZAU, A.V. E KARTEL', N.A. Chitinases in Bioengineering Research. **Russian Journal of Genetics**, v. 44, p. 881-889, 2008.

SOMMER, S., SIEBERT, M., BECHTHOLD, A., HEIDE, L. Specific induction of secondary product formation in transgenic plant cell cultures using an inducible promoter. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 891-896, 1998.

SUETAKE, T., TSUDA, S., KAWABATA, S., MIURA, K., IWANAGA, S., HIKICHI, K., NITTA, K., KAWANO, K. Chitin-binding proteins in invertebrates and plants comprise a common chitin-binding structural motif. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, p. 17929-17932, 2000.

SZABÓ, E., SZATMÁRI, Á., BESENYEI, E., ZSIROS, L.R., BOZSÓ, Z. Changes in apoplast protein pattern suggest an early role of cell wall structure remodelling in flagellin-triggered basal immunity. **Biologia Plantarum**, v.56, p. 551-559, 2012.

TERAKAWA, T., TAKAYA, N., HORIUCH, H., KOIKE, M., TAKAGI, M. A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 439-443, 1997.

TENG, Z., WANG, Q. Extraction, identification and characterization of the water-insoluble proteins from tobacco biomass. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 92, p. 1368-1374, 2011.

THEIS, T., STAHL, U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 437-455, 2004.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TRAVELLA, S., ROSS, S.M., HARDEN, J., EVERETT, C., SNAPE, J.W., HARWOOD, W.A. A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 780-789, 2005.

VALOIS, A.C.C. Importância dos transgênicos para a agricultura. **Cadernos de Ciência e Tecnologia, Brasília**, v. 18, p. 27-53, 2001.

WANG, Y., NOWAK, G., CULLEY, D., HADWIGER, L.A., FRISTENSKY, B. Constitutive Expression of Pea Defense Gene DRR206 Confers Resistance to Blackleg (*Leptosphaeria maculans*) Disease in Transgenic Canola (*Brassica napus*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, p. 410-418, 1999.

WITZEL, K., SHAHZAD, M., MATROS, A., MOCK, H.-P., MÜHLING, K.H. Comparative evaluation of extraction methods for apoplastic proteins from maize leaves. **Plant methods**, v. 7, p. 48, 2011.

XIAO, Y.H., LI, X.B., YANG, X.Y., LUO, M., HOU, L., GUO, S.H., LUO, X.Y., PEI, Y. Cloning and characterization of a balsam pear class I chitinase gene (Mcchit1) and its ectopic expression enhances fungal resistance in transgenic plants. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 1211-1219, 2007.

ZHANG, S., WEI, Y., YU, H., LIU, J., PAN, H. Wintersweet accumulates apoplastic chitinase with a dual role in petals. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 57, 670-675, 2010.

ZHU, Q., MAHER, E.A., MASOUD, S., DIXON, R.A., LAMB, C. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. **Bio/Technology**, v. 12, p. 807-812, 1994.