



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ISABEL CRISTINA DA CÓSTA SOUZA

ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* NA DEFESA VEGETAL FACE A ESTRESSES BIÓTICO E ABIÓTICO

FORTALEZA

2019

ISABEL CRISTINA DA CÓSTA SOUZA

ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* NA DEFESA VEGETAL FACE A ESTRESSES BIÓTICO E ABIÓTICO

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Proteínas vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos.
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª Cristina Paiva da Silveira Carvalho.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S238a Souza, Isabel Cristina da C6sta.

Análise do envolvimento de proteínas do látex de *Calotropis procera* na defesa vegetal face a estresses bi6tico e abi6tico / Isabel Cristina da C6sta Souza. – 2019.
119 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Cear6, Centro de Ci6ncias, Programa de P6s-Gradua6o em Bioqu6mica , Fortaleza, 2019.

Orienta6o: Prof. Dr. M6rcio Viana Ramos.

Coorienta6o: Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho.

1. Fitopat6genos. 2. Prote6nas de defesa. 3. Transforma6o gen6tica. I. T6tulo.

CDD 572

ISABEL CRISTINA DA CÓSTA SOUZA

ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* NA DEFESA VEGETAL FACE A ESTRESSES BIÓTICO E ABIÓTICO

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Proteínas vegetais.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcio Viana Ramos (Orientador)
Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC)

Dra. Carla Freire Celedonio Fernandes
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Prof. Dr. Cristiano Souza Lima
Deptº de Fitotecnia (UFC)

Dr. Gilvan Pessoa Furtado
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Dr. Pedro Filho Noronha de Souza
Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Márcio Viana Ramos, pela confiança e pelo incentivo fornecido, além de não medir esforços para disponibilizar todos os meios possíveis e impossíveis para o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Cristina Paiva, por ser um exemplo de competência, dedicação e simplicidade. Agradeço também pelos excelentes conselhos e pela sua amizade.

À Dr^a. Christiana Bruce, pelas valiosíssimas contribuições dadas na correção do trabalho, estando sempre disponível em colaborar e disponibilizar recursos para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Professor Thalles Barbosa, por disponibilizar o espaço e os recursos e por toda a contribuição científica investida nesse trabalho.

Ao Professor Cristiano Lima, por sempre estar disponível para me ajudar e por ter aceitado participar da minha banca examinadora.

À Dr^a. Carla Celedonio, Dr. Gilvan Pessoa e Dr. Pedro Filho pela disponibilidade em contribuir com o meu trabalho, aceitando participar da banca examinadora.

A todos os colegas que fazem parte do laboratório (Ayles, Beatriz, Camila, Carolina, Deborah, João Pedro, Larissa, Marina, Sandro, Mauro, Emanuel, Rafael, Iara, Henrique e Flavio) e a amiga Aldelisa (Teca), pela cumplicidade e companheirismo. Agradeço em especial a Maria Zelândia e a Wallace Cruz, pelo companheirismo de seis anos de trajetória pela UFC.

Agradeço também aos colegas do departamento, Diego Chagas, Misrael Sales, Rachel e Felipe Sousa, pelos bons momentos compartilhados e pela ajuda incondicional.

À equipe formadora da Escola Estadual Padre José Anchieta, em especial aos amigos Roberto Araújo, Francisco Batista e Maria de Fátima, pelo apoio e compreensão dado ao período de execução do trabalho de tese.

Agradeço especialmente a minha família, pelo apoio para concretizar esta etapa: á minha mãe Ana e ao meu pai Geraldo, obrigada por entenderem minha ausência; a minha irmã Isabele e sobrinha Maria, por constituir minha família e cuidar dos meus pais.

A Rafael Melo, pelo amor, companheirismo e paciência, apoiando-me em todas as etapas desse trabalho.

Os procedimentos experimentais que compõem esta tese foram realizados com o apoio dos seguintes Programas/Instituições:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - através das atividades de capacitação no ensino e pesquisa em Bioquímica.

PROGRAMA DE APOIO A PLANOS DE REESTRUTURAÇÃO E EXPANSÃO DAS UNIVERSIDADES FEDERAIS (REUNI)/ COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) - através da concessão de bolsa de doutorado e de fomentos à pesquisa.

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq) e FUNDAÇÃO CEARENSE DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (FUNCAP) - pela contribuição para a melhoria nas condições experimentais e formação de recursos humanos dentro do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA AGROINDÚSTRIA TROPICAL (EMBRAPA) - através do fornecimento de meios experimentais e científicos para o desenvolvimento do trabalho.

RESUMO

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram diferentes estratégias de defesa para sua proteção. O látex é um composto presente em uma ampla variedade de espécies sendo um recurso para a defesa contra herbívoros e fitopatógenos. Sua diversidade química e funcional tem sido bastante estudada, contendo metabólitos secundários e proteínas predominam. A espécie *Calotropis procera* (Apocynaceae) é laticífera. Três classes de proteínas isoladas do látex dessa espécie já foram bem caracterizadas: proteases, osmotinas e quitinases. O objetivo desse estudo foi traçar uma correlação entre proteínas presentes no látex de *C. procera* e sua participação na defesa das plantas frente a estresses bióticos e abióticos. Foram realizados ensaios para mensurar o controle *in vitro* do crescimento micelial e germinação de esporos de fungos fitopatogênicos (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium tuiense* e *F. oxysporum* f. sp. *cubense*) testando o efeito sinérgico das proteínas totais assim como suas frações isoladas. Dessa forma, foi verificado que as proteínas totais apresentam um maior efeito quando comparado com as proteínas fracionadas do látex. Porém a combinação das proteases com as osmotinas potencializam o efeito quando comparado com a ação isolada das osmotinas. As proteínas totais do látex foram testadas como agentes elicitores na defesa de mudas de bananeira desafiadas com o fungo *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. Foi observado que as plantas que passaram por um tratamento prévio com proteínas do látex apresentaram uma redução na ocorrência e severidade da doença. Mantiveram o crescimento e redução no dano de membrana assim como aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidante. Plantas de *Nicotiana tabacum* foram transformadas com o gene da osmotina do látex de *C. procera* (CpOsm). Após a confirmação da transformação da primeira geração de plantas, as proteínas totais de folhas de tabaco foram extraídas e testadas na inibição da germinação e crescimento micelial dos fungos *F. tuiens* e *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. Os resultados mostram que as plantas transformadas com o gene CpOsm conseguiram inibir o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos com maior eficiência quando comparadas com as plantas não transformadas. As plantas, transformadas e controle, foram submetidas a teste de resistência a salinidade. As plantas transformadas não exibiram diferença de tamanho e número de folhas, porém conseguiram aumentar a concentração de prolina livre quando comparada com as plantas não transformadas. É possível aferir um provável efeito das proteínas do látex de *C. procera* no mecanismo de defesa das plantas ao ataque de fitopatógenos e relacionar a proteína CpOsm com mecanismos de ação de proteção das plantas ao estresse salino e a ataques por fitopatógenos.

Palavras-chave: Fitopatógenos. Proteínas de defesa. Transformação genética.

ABSTRACT

Throughout evolution, the plants have been developing defense mechanisms for their protection, an example of this is the production of latex as a vegetal resource in the defense against herbivores and phytopathogens. The chemical and functional diversity of the laticiferous fluids is being studied, with emphasis on secondary metabolites and defense proteins. The species *Calotropis procera* belongs to the family Apocynaceae and is prominent in latex production. Three classes of proteins isolated from latex: proteases, osmotin and chitinases. However, the objective of this study was to trace a relationship between the proteins present in the latex of *C. procera* and their role in plant defense against biotic and abiotic stresses. For this, methodologies for the *in vitro* control of the mycelial growth and germination of the phytopathogenic fungi *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium tuiense* e *F. oxysporum* f. sp. *cubense* testing the synergistic effect of total proteins and their isolated fractions. Thus, it was verified the total proteins present a greater effect when compared to the latex fractions of *C. procera*, but the combination of the proteases with the osmotin enhances the effect compared to the isolated osmotin. The total proteins of *C. procera* latex were tested as elicitors in the defense of banana seedlings challenged with the fungus *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. It was observed that plants who were previously treated with latex proteins showed a reduction in the occurrence and severity of the disease, maintenance of growth, reduction in membrane damage and increase in the activity of the antioxidant system enzymes. Osmotins are defense-related proteins when it comes to biotic and abiotic stresses. To test this hypothesis to the sequence of the process of *Nicotiana tabacum* with the osmotin of *C. procera* (CpOsm). After confirming the transformation of the first generation of plants, the total proteins of tobacco leaves were extracted and tested in the inhibition of the germination and mycelial growth of the fungi *F. tuienses* and *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. The results show plants transformed with the CpOsm gene inhibit the mycelial growth of phytopathogenic fungi with greater efficiency when compared to the untransformed plants. The transformed and control plants were submitted to salinity resistance test. For this, the plants were maintained in nutrient medium MS with 300 mM NaCl for seven days, after the transformed plants had no difference in growth and number of leaves, however they were able to increase the concentration of free proline when compared to the non-plants transformed. It is possible to measure a probable effect of *C. procera* latex proteins on the plant defense mechanism against the attack of

phytopathogens and to relate the CpOsm protein with mechanisms of action of protection of plants to saline stress and attacks by phytopathogens.

Keywords: Phytopathogens. Defense Proteins. Genetic transformation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Etapa do ensaio de indução de resistência.....	41
Figura 2	– Atividade antifúngica das proteínas do látex de <i>C. procera</i>	46
Figura 3	– Atividade antifúngica das frações proteicas do látex de <i>C. procera</i>	47
Figura 4	– Atividade de inibição de germinação de esporos de fungos fitopatogênicos	48
Figura 5	– Potencial das proteínas do látex de <i>C. procera</i> (CpLP) como indutor de resistência, em mudas micropropagadas de bananeira cv. Maçã.....	52
Figura 6	– Avaliação do índice de incidência de doença (IID) e do índice de severidade de doença (ISD) em mudas de bananeira elicitadas com CpLP.	53
Figura 7	– Avaliação da taxa de crescimento vegetal em mudas de bananeira elicitadas com CpLP.....	54
Figura 8	– Atividade enzimática das enzimas APX, CAT, G-POD em mudas micropropagadas de bananeira, elicitadas com as proteínas do látex de <i>C. procera</i> CpLP.....	56
Figura 9	– Peroxidação de lipídeos em mudas micropropagadas de bananeira elicitadas com as proteínas do látex de <i>C. procera</i> (CpLP).....	59
Figura 10	– Corte transversal do pseudocaule de mudas micropropagadas de bananeira, visualizado por análise de microscopia eletrônica de varredura.	60
Figura 11	– Corte de folhas de mudas micropropagadas de bananeira por microscopia eletrônica de varredura.....	62
Figura 12	– Corte de raízes de mudas micropropagadas de bananeira por microscopia eletrônica de varredura.....	63
Figura 13	– Comprovação da presença do fragmento gênico CpOsm.....	84
Figura 14	– Obtenção do fragmento gênico CpOsm por PCR.....	85
Figura 15	– Produção do vetor recombinante pUCRBC-1::CpOsm.....	86
Figura 16	– Confirmação da produção do vetor recombinante pUCRBC-1::CpOsm. Eletroforese em gel de agarose 1% dos plasmídeos obtidos.....	87

Figura 17	– Separação do fragmento RBC::CpOsm em gel de agarose.....	88
Figura 18	– Estratégias utilizadas para obtenção de células de <i>E. coli</i> transformadas com o vetor recombinante pBINPLUS::RBC-1::CpOsm.....	89
Figura 19	– Obtenção do fragmento gênico RBC-1::CpOsm.....	90
Figura 20	– Produção do vetor recombinante pBINPLUS::RBC-1::CpOsm.....	90
Figura 21	– Confirmação da produção do vetor binário recombinante pBINPLUS::RBC::CpOsm.....	91
Figura 22	– Transformação de células de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com o vetor binário.....	92
Figura 23	– Etapas do experimento de transformação genética de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i>	93
Figura 24	– Transformação de explantes de <i>Nicotiana Tabacum</i> . Explantes de <i>Nicotiana tabacum</i> não transformados crescendo em meio MS + BAP + Canamicina.....	94
Figura 25	– Plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> não transformados crescendo em meio MS + BAP + canamicina (A e E) e em meio MS + BAP (B e F) e explantes transformados com o vetor pBINPLUS (C e G) e com o vetor RBC-1::CpOsm::pBINPLUS (d e h).....	94
Figura 26	– Confirmação da presença do gene CpOsm em plantas de <i>N. tabacum</i> transformadas.....	96
Figura 27	– Confirmação da transcrição do gene CpOsm em plantas e <i>N. tabacum</i> transformadas.....	97
Figura 28	– Perfil proteico de plantas e <i>N. tabacum</i> transformadas.....	99
Figura 29	– Confirmação da presença da proteína CpOsm em plantas e <i>N. tabacum</i> transformadas.....	100
Figura 30	– Confirmação da presença da proteína CpOsm em plantas e <i>N. tabacum</i> transformadas.....	101
Figura 31	– Atividade antifúngica dos extratos proteicos de folhas de plantas de fumo.	103

Figura 32 – Atividade antifúngica dos extratos proteicos de folhas de plantas de fumo.	104
Figura 33 – Análise da resistência de plantas transformadas com o gene CpOsm ao estresse salino.....	106
Figura 34 – Observações fisiológicas de plantas transformadas com o gene CpOsm submetidas a estresse salino.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Respostas dos explantes de fumo (<i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi) submetidos aos tratamentos e cultivados por quatro semanas em meio de indução de brotos.....	95
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Avr	Avirulencia
cDNA	DNA complementar
CpLP	Proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i>
CpOsm	Osmotina de <i>Calotropis procera</i>
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
cv.	Cultivar
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
RNA	Ácido Ribonucléico
dNTPs	<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>
ETI	<i>Effector Triggered Immunity</i>
f. sp.	Formae speciales
FOC	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>
MAMPs	<i>Microbe-Associated Molecular Patterns</i>
Mejas	Metil Jasmonato
mRNA	RNA mensageiro
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
Proteínas PR	Proteínas relacionadas à patogênese
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
PTI	<i>Pattern Triggered Immunity</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	<i>Mecanismo de defesa vegetal.....</i>	16
1.2	<i>Látex.....</i>	17
1.3	<i>Calotropis procera.....</i>	18
1.4	<i>Proteínas do látex de C. procera.....</i>	20
1.4.1	<i>Protease.....</i>	20
1.4.2	<i>Quitinase</i>	21
1.4.3	<i>Osmotinas.....</i>	23
1.5	<i>Justificativa.....</i>	24
2	POTENCIAL DAS PROTEÍNAS DE DEFESA DO LÁTEX DE <i>C. procera</i> NA PROTEÇÃO CONTRA FITOPATÓGENOS.....	26
2.1	<i>Introdução.....</i>	26
2.2	<i>Objetivos.....</i>	27
2.2.1	<i>Objetivo geral.....</i>	27
2.2.2	<i>Objetivos específicos.....</i>	27
2.3	<i>Materiais e métodos.....</i>	28
2.3.1	<i>Materiais.....</i>	28
2.3.1.1	<i>Material vegetal.....</i>	28
2.3.1.2	<i>Fungos.....</i>	28
2.3.1.3	<i>Reagentes químicos.....</i>	29
2.3.2	<i>Métodos.....</i>	29
2.3.2.1	<i>Avaliação do potencial antifúngico das proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i> e suas frações.....</i>	29
2.3.2.1.1	<i>Isolamento dos fungos fitopatogênicos.....</i>	29
2.3.2.1.2	<i>Extração e fracionamento de proteínas do látex.....</i>	30
2.3.2.1.3	<i>Avaliação da atividade antifúngica.....</i>	30
2.3.2.2	<i>Avaliação do potencial do CpLP como indutor de resistência.....</i>	32
2.3.2.2.1	<i>Ensaio de avaliação do potencial do CpLP como indutor de resistência.....</i>	32
2.3.2.2.2	<i>Avaliação da incidência e da severidade da doença.....</i>	42
2.3.2.2.3	<i>Determinação da taxa de crescimento das mudas micropropagadas após a inoculação com o patógeno.....</i>	42

2.3.2.2.4	Peroxidação de lipídeos.....	43
2.3.2.2.5	Extração de proteínas totais.....	43
2.3.2.2.6	Análise das enzimas do sistema antioxidante.....	44
2.3.2.2.7	Análise de microscopia eletrônica de varredura.....	44
2.4	Resultados e discussão.....	45
2.4.1	<i>Avaliação do potencial antifúngico das proteínas do látex de Calotropis procera e suas frações.....</i>	45
2.4.2	<i>Avaliação do potencial do CpLP como indutor de resistência.....</i>	50
2.4.2.1	<i>Avaliação do índice de incidência da doença e índice de severidade.....</i>	50
2.4.2.2	<i>Determinação da taxa de crescimento.....</i>	53
2.4.2.3	<i>Atividade enzimática.....</i>	54
2.4.2.4	<i>Peroxidação de lipídeos.....</i>	55
2.4.2.5	<i>Análise de microscopia eletrônica de varredura.....</i>	59
2.5	Conclusão.....	65
3	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Nicotiana tabacum</i> COM A REGIÃO CODIFICADORA DO GENE CpOsm E SEUS EFEITOS NA DEFESA VEGETAL.....	66
3.1	Introdução.....	66
3.2	Objetivos.....	68
3.2.1	<i>Objetivo geral.....</i>	68
3.2.2	<i>Objetivos específicos.....</i>	68
3.3	Materiais e métodos.....	69
3.3.1	<i>Materiais.....</i>	69
3.3.1.1	<i>Plantas.....</i>	69
3.3.1.2	<i>Fungos.....</i>	69
3.3.1.3	<i>Bactérias.....</i>	69
3.3.1.4	<i>Plasmídeos.....</i>	70
3.3.1.5	<i>Enzimas.....</i>	70
3.3.1.6	<i>Reagentes e outros materiais.....</i>	70
3.3.2	<i>Métodos.....</i>	70
3.3.2.1	<i>Obtenção do fragmento génico CpOsm.....</i>	70
3.3.2.1.1	<i>Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores.....</i>	71
3.3.2.1.2	<i>Extração do DNA plasmidial do vetor pET303::CpOsm.....</i>	71

3.3.2.1.3	Amplificação do fragmento gênico CpOsm e purificação do produto de PCR....	72
3.3.2.2	<i>Obtenção do cassete de expressão RBC-1::CpOsm e clonagem do vetor RBC-1::CpOsm::pBINPLUS em Escherichia coli DH5</i>	73
3.3.2.2.1	Produção do vetor pUCRBC-1::CpOsm e transformação de E. Coli DH5α com o vetor recombinante.....	73
3.3.2.2.2	Obtenção do cassete de expressão RBC-1::CpOsm e produção do vetor binário pBINPLUS::RBC-1::CpOsm.....	74
3.3.2.3	<i>Transformação de células de Agrobacterium tumefaciens com o vetor binário recombinante pBINPLUS::RBC-1::CpOsm</i>	75
3.3.2.3.1	Transformação da Agrobacterium tumefaciens.....	75
3.3.2.4	<i>Transformação de tabaco (Nicotiana tabacum var. Xanthi) via agroinfecção</i>	75
3.3.2.5	<i>Análise da expressão e transcrição do gene CpOsm em plantas transformadas</i>	76
3.3.2.5.1	Análise dos transformantes primários por PCR.....	76
3.3.2.5.2	Análise de transcrição do gene CpOsm via RT-PCR.....	77
3.3.2.6	<i>Deteção da CpOsm recombinante em plantas de tabaco e sua função biológica in vitro</i>	78
3.3.2.6.1	Extração de proteínas de folhas de Nicotiana tabacum.....	78
3.3.2.6.2	Produção de anticorpos anti-CpOsm nativa.....	78
3.3.2.6.3	Dot blotting.....	79
3.3.2.6.4	Western Blotting.....	80
3.3.2.6.5	Atividade de inibição do crescimento micelial e germinação de esporos de fungos fitopatogênicos.....	80
3.3.2.6.6	Avaliação do estresse salino em plantas de fumo.....	82
3.3.2.6.7	Avaliação do crescimento e número de folhas.....	82
3.3.2.6.8	Quantificação de prolina.....	82
3.4	Resultados e discussão	83
3.4.1	<i>Obtenção do fragmento gênico CpOsm</i>	83
3.4.2	<i>Obtenção de células de E. coli transformadas com o vetor pUCRBC-1::CpOsm</i>	85
3.4.3	<i>Obtenção do cassete de expressão RBC-1::CpOsm e clonagem do vetor RBC-1::CpOsm::pBINPLUS em E. coli</i>	87
3.4.4	<i>Transformação de células de Agrobacterium tumefaciens com o vetor binário recombinante pBINPLUS::RBC-1::CpOsm</i>	91

3.4.5	<i>Análise da expressão e transcrição do gene CpOsm em plantas transformadas</i>	96
3.4.6	<i>Avaliar a presença da proteína em plantas transformadas e sua função biológica in vitro</i>	98
3.4.6.1	<i>Avaliação da presença da proteína recombinante</i>	98
3.4.6.2	<i>Avaliação do potencial antifúngico das proteínas totais extraídas das folhas de plantas de tabaco</i>	101
3.4.6.3	<i>Avaliação do estresse salino em plantas de fumo</i>	105
3.5	Conclusão	108
	REFERÊNCIAS	109
	ANEXO A - VETOR DE CLONAGEM UTILIZADO COMO MOLDE PARA OBTENÇÃO DO FRAGMENTO DA CpOsm	121
	ANEXO B - VETOR DE CLONAGEM UTILIZADO COMO FONTE PARA OBTENÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO DA RuBisCo	122
	ANEXO C - VETOR BINÁRIO DE CLONAGEM UTILIZADO NA TRANSFORMAÇÃO DAS PLANTAS DE TABACO	123
	ANEXO D - SEQUENCIAS DOS INDICADORES (PRIMERS) PARA AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE DNA CODIFICANDO CpOsm ...	124

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Mecanismo de defesa vegetal

As plantas vivem constantemente expostas a um grande número de pragas e patógenos, bem como à variações ambientais. Durante o processo evolutivo mecanismos de defesa foram selecionados e conferiram aos vegetais a capacidade de responder aos estresses bióticos e abióticos (SHIGENAGA; ARGUESO, 2016). Esses mecanismos podem ser estruturais e bioquímicos, ambos pré e/ou pós-formados em relação à tentativa de penetração do patógeno no hospedeiro (SHAH et al., 2014). De modo geral, as defesas pré-formadas são suficientes para bloquear as tentativas de infecções dos agentes patogênicos.

Eventualmente, os patógenos conseguem ultrapassar as barreiras químicas e estruturais pré-formadas, ocorrendo o início de uma ativação do sistema de defesa vegetal induzido (LAZNIEWSKA et al., 2012). O acionamento da resposta de defesa induzida, inicia-se após o reconhecimento de situações relacionadas à patogenicidade. Esse reconhecimento pode ser mediado por padrões moleculares associados aos microrganismos e/ou mediada pela interação dos genes de resistência da planta e o gene de avirulência do patógeno (ROUX et al., 2014).

A primeira percepção, baseia-se no reconhecimento de moléculas características e conservadas entre os microrganismos (BECK, 2012). Essas moléculas, em geral, são compostos essenciais para o ciclo de vida desses microrganismos e não necessariamente desempenham um papel na patogenicidade (NÁVAROVÁ et al., 2012), sendo conhecidas como padrões moleculares associados ao patógeno ou micróbio (do inglês, *Pathogen/Microbe-Associated Molecular Patterns* - PAMPs ou MAMPs). As células vegetais possuem receptores de reconhecimento de padrões (PRR), esses estão localizados na membrana celular e são capazes de identificar os PAMPs e/ou MAMPs (SHIGENAGA; ARGUESO, 2016). Quando esses padrões são reconhecidos, ativa-se a imunidade denominada PTI (do inglês, *Pattern Triggered Immunity*), também conhecida como imunidade inata das plantas (CUI et al., 2015). Outra observação em relação aos receptores de padrões, são que estes se mantêm conservados em termos estruturais entre as famílias botânicas (BRESSENDORFF et al., 2016).

A segunda via de ativação da defesa vegetal é conhecida como imunidade acionada por efetores a ETI (do inglês, *Effector Triggered Immunity*). Os efetores são proteínas codificadas pelos genes de avirulência do patógeno (genes *Avr*) e têm a capacidade de driblar a imunidade por PTI. Assim, as plantas desenvolveram uma forma de imunidade baseada no reconhecimento

direto dos efetores por meio da interação com proteínas de resistência, codificadas pelos genes de resistência (genes R) do hospedeiro (OBWALD et al., 2014, ENT et al., 2018). Esse modelo de resistência, foi proposto inicialmente por Flor (1955) conhecido como resistência gene-a-gene.

Após o reconhecimento de PAMPs/MAMPs ou de efetores, o sistema de defesa das plantas é ativado através de vias de sinalização, baseadas em mudanças nos níveis de cálcio no citoplasma, rápida produção de espécies reativas de oxigênio e cascata de sinalização via MAP Quinases (do inglês, *Mitogen Activated Protein Kinases*). As ampliações desses sinais ocorrem por meio de hormônios reguladores como ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) resultando na ativação de fatores de transcrição, dentre eles os da superfamília WRKY e de genes de defesa (CUI et al., 2015; SALGUEIRO-LINHARES; COLL, 2019). Dessa forma, a interação das defesas pré-formadas, com a ativação da defesa vegetal induzida e juntamente com as cascatas mediadas por hormônios proporcionaram o sucesso de adaptação das plantas ao ambiente terrestre.

1.2 Látex

Entre as proteções vegetais de caráter pré-formados, pode-se destacar a presença de estruturas secretoras. Os laticíferos são células vegetais especializadas na produção de um fluido citoplasmático chamado de látex, esse é exsudado pelas plantas quando as mesmas sofrem danos mecânicos nos tecidos vegetais. De modo geral, o látex é um conteúdo citoplasmático de aspecto leitoso e o seu papel fisiológico está frequentemente associado à defesa vegetal frente ao ataque de microrganismos e herbívoros (KITAJIMA et al., 2018; RAMOS et al., 2019).

Os laticíferos são classificados pelas suas características anatômicas e conteúdo citoplasmático distinto. Existem dois tipos de células laticíferas, baseados no desenvolvimento e morfologia: os não-articulados e os articulados. Os laticíferos articulados são formados por células dispostas sequencialmente, em fileiras únicas, interconectadas por perfurações em suas paredes celulares. Os laticíferos não articulados, por outro lado, originam-se e são constituídos por uma única célula alongada, que se desenvolve nos espaços intercelulares e, eventualmente ramifica-se, dando origem a uma rede cuja disposição assemelha-se às hifas de fungos (KONNO, 2011).

Estima-se que vinte mil espécies distribuídas entre quarenta famílias das angiospermas possuam esses canais secretores de fluidos laticíferos como mecanismo de defesa. Dentre essas famílias botânicas as mais representativas quanto à presença de laticíferos são: Asclepiadaceae, Apocynaceae, Moraceae, Papaveraceae e Euphorbiaceae (LEWINSOHN, 1991; ALBUQUERQUE et al., 2009).

O látex é composto por uma mistura de biomoléculas e organelas. Entre as moléculas presentes no látex podem ser destacadas: proteínas, carboidratos, terpenos, alcaloides, vitaminas, lipídios, aminoácidos livres, taninos, cardenólídeos e isoprenoides. Embora os látex de diferentes espécies compartilhem um papel biológico, suas proteínas e compostos fenólicos são altamente variáveis entre as espécies de plantas (KONNO, 2011; LICÁ et al., 2018).

Existem inúmeros trabalhos relacionando o látex com o processo de defesa dos vegetais. Foi observado que o látex pode proteger as plantas de uma forma direta utilizando sua capacidade de aderência para imobilização de herbívoros. Outra forma de ação do látex é associado à variedade de biomoléculas presentes na sua composição. Sabe-se que os alcaloides, compostos fenólicos e os glicosídeos possuem uma potente toxicidade sobre animais (HIRAYAMA et al., 2007; CHAMBERS et al., 2007;).

Além de metabólitos, o látex é rico em uma diversidade de proteínas que participam na defesa das plantas. Entre as proteínas encontradas podemos destacar as proteases. Essas são frequentemente associadas à proteção contra herbívoros agindo frequentemente na degradação da membrana peritrófica de alguns insetos (PECHAN et al., 2000 ; PECHAN et al., 2002). Outras proteínas de defesa encontradas nos látex são as quitinases, inibidores de proteases, oxidases e lectinas (KITAJIMA et al., 2010; WAHLER et al., 2009; KURAIISHI, 2019).

Devido à diversidade de compostos químicos presente nos fluidos laticíferos estudos recentes objetivam fornecer evidências que auxiliem na compreensão da função dessas moléculas e sua aplicabilidade na biotecnologia.

1.3 Calotropis procera

Uma espécie laticífera bastante estudada é *Calotropis procera*. A planta é encontrada em regiões tropicais e subtropicais da África e Ásia, no Oriente Médio e na América Latina, onde possui alto valor socioeconômico (LOTTERMOSER 2011; PUSAPATI et al., 2012). Essa planta possui vários nomes populares, sendo comumente chamada de algodão-de-seda, flor-de-seda, ciúme, hortêncica, paininha-de-seda e leiteiro (SILVA et al., 2013).

Morfologicamente a planta é ereta, com ramificações e altura variável entre pequenos arbustos podendo atingir até cinco metros de altura. Estas plantas possuem um caule verde e lenhoso, que quando injuriado exala látex. Suas raízes são profundas podendo atingir de 3 a 4 metros de profundidade. As folhas são grandes com cerca de 15 cm de comprimento e 10 cm de largura, são sésseis, opostas e grossas (HASSAN, 2015; CHAUDHARY et al., 2017). Os frutos possuem formato ovoide, sendo estes inflados e com um tamanho de 8 a 12 cm de comprimento, possuindo uma aparência cerosa e contêm uma grande quantidade de látex (MURTI *et al.* 2010), estes frutos possuem cerca de 350 a 500 sementes por fruto (HASSAN, 2015). As sementes são de formato ovoide, com base arredondada e extremidade aguda; achatadas, e com superfície rugosa, na sua extremidade possui um grande número de filamentos sedosos que facilitam a dispersão (GOMES, 2008).

A *C. procera* é bastante utilizada para fins tecnológicos. Estudo relata a eficiência desta espécie no processo de fitorremediação, possuindo a capacidade de extrair metais pesados do solo e acumular nas folhas (D'SOUZA *et al.* 2010). Esta espécie também é utilizada no controle biológico de plantas daninhas, já que são espécies alelopáticas (SAMREEN *et al.*, 2009).

Uma característica peculiar dessa espécie é a intensa produção de látex, devido principalmente à constituição dos seus laticíferos, identificados como não articulados, o que permite que o látex seja exsudado mais rapidamente após danos nos tecidos. Observa-se que a constituição do látex contém uma variedade de moléculas como a borracha, glicosídeos cardiotônicos como calactina, calotoxina, procerosida, uscharina, uzarigenina entre outros e uma variedade de proteínas (ANSARI E ALI, 1999; HASSAN et al., 2015; CHAUDHARY et al., 2017).

Muitos autores tem demonstrado várias propriedades do látex de *C. procera*, como hemólise das células sanguíneas e atividade anti-plasmodial (SHARMA et al., 2001), ação cicatrizante (RASIK et al., 1999), antitumoral (CHOEDON et al., 2006; VIANA et al., 2017), antipirética (DEWAN et al., 2000b), analgésica (DEWAN et al., 2000a), anti-inflamatória (ARYA; KUMAR, 2005, SANGRAULA et al., 2002; ALENCAR et al., 2006; KUMAR et al., 2014; VIANA et al., 2017), antibacteriana (LARHSINE et al., 1999; REENA et al., 2019), antioxidante (REENA et al., 2019), larvicida e inseticida (RAMOS et al., 2006; RAMOS et al., 2010) e preventiva contra choque séptico (LIMA-FILHO et al., 2010).

Uma propriedade fisiológica bem característica desta espécie é a manutenção do crescimento e sobrevivência quando expostas à condições de seca e salinidade. Esta planta é considerada como uma das mais tolerantes à seca (BOUTRAA, 2010), conseguindo manter os

seus processos fisiológicos sob condições adversas como restrição hídrica, altas temperaturas e solos pobres em nutrientes (BOUTRAA, 2010; YANIV; KOLTAI, 2018). Sharma (1934) afirma que esta planta ocorre em áreas de baixa pluviosidade, com precipitação anual variando de 150 a 1.000 mm, tolera altitudes de 1.000 metros e temperaturas entre 20 a 30 °C, estas características confere a esta planta alta dinâmica em sua ocorrência.

Porém, existem poucos relatos na literatura sobre quais mecanismos de defesa são acionados quando *C. procera* é submetida a estresses bióticos e abióticos, e a participação das proteínas do látex na defesa das plantas.

1.4 Proteínas do látex de C. procera

O látex de *C. procera* é rico em uma diversidade de metabólitos, em especial metabólitos secundários, havendo, no entanto, um volume considerável de proteínas nesse fluido. Entre as proteínas pode-se destacar a presença de proteases, quitinases e osmotinas. Essas foram identificadas, isoladas e caracterizadas.

1.4.1 Proteases

As proteases constituem uma família de proteínas altamente difundidas na natureza. Essas proteínas estão envolvidas em vários processos biológicos como na digestão, sinalização e crescimento celular em animais, desenvolvimento e amadurecimento de frutos, degradação proteica, reconhecimento de patógenos e apoptose em plantas (DOMSALLA E MELZIG, 2008; COSTA, 2016).

A forma de catálise das proteases serve como suporte para classificação dessas proteínas. A região catalítica dessas enzimas é formada por aminoácidos específicos e esses aminoácidos presentes no sítio ativo definem suas classes: as proteases aspárticas possuem aspartato e tirosina; as serínicas, serina e histidina; as cisteínicas, cisteína e histidina; as do tipo treonina, possuem treonina; as do tipo glutamato possuem o ácido glutâmico; e as metalo proteases possuem íon metálicos no sítio ativo (Zn^{2+} , Ca^{2+} ou Mn^{2+}) (TURK, B.; TURK D.; TURK, V.; 2012).

Algumas proteases do tipo serínicas estão classificadas na família 7 das proteínas Relacionadas à Patogênese (PR-proteínas). Essas proteases estão diretamente associadas à respostas de defesa da planta a fungos fitopatogênicos (JORDA et al., 2000).

O látex é uma importante fonte de proteases vegetais. Mais de 110 fluidos laticíferos, oriundos de espécies pertencentes a diferentes famílias, são conhecidos por conter enzimas proteolíticas em sua composição. No látex, estas proteínas além de atuarem na defesa vegetal, agindo diretamente contra os patógenos, promovem a degradação de proteínas durante o desenvolvimento de laticíferos e atuam no processo de coagulação dos fluidos laticíferos (DOMSALLA E MELZIG, 2008).

No látex da espécie *C. procera* múltiplas proteases já foram identificadas. A primeira protease cisteínica isolada do látex dessa espécie foi a proceraina, uma molécula com alta estabilidade frente à temperatura e pH (DUBEY E JAGANNADHAM, 2003). Posteriormente, foi purificada a protease cisteínica nomeada de proceraina B, esta enzima apresentou características distintas da proceraina (SINGH et al., 2010). Além destas, Ramos e colaboradores (2013) isolaram três isoformas de proteases cisteínicas do látex de *C. procera*, identificadas como CpCP1, CpCP-2 e CpCP-3, sendo estas proteínas diferentes das proteases anteriormente purificadas.

As isoformas isoladas do látex de *C. procera*, exibem diferentes perfis de massa molecular, CpCP-1 e CpCP2 apresentam massa similar (26,213 e 26,133 kDa, respectivamente) e CpCP 3, exibe massa molecular superior (25,086 kDa), apesar dessa diferença entre massa molecular o sequenciamento revelou que essas isoformas têm sequências N-terminal idênticas. Essas proteases apresentam ainda a capacidade de hidrolisar o BANA (α -N-benzoil-arginina-p-naftilamida), sendo esse substrato específico para proteases cisteínicas e sua atividade proteolítica é aumentada na presença de ditioneitol (DTT). O tratamento térmico dessas proteases na faixa de 30 a 50 °C, durante um período de exposição de 30 min, não alterou significativamente a sua atividade proteolítica (RAMOS et al., 2013).

Com relação à atividade biológica, foi relatado por Souza e colaboradores (2011), que as proteínas totais do látex de *C. procera* foram capazes de inibir o crescimento micelial e a germinação de esporos de fungos fitopatogênicos, sendo esse efeito intensificado quando as amostras foram tratadas com o agente redutor DTT, enquanto que na presença de um inibidor de protease o efeito antifúngico foi reduzido, levando à conclusão de que as proteases cisteínicas do látex de *C. procera* são responsáveis por parte do efeito antifúngico das proteínas totais.

1.4.2 Quitinases

Outra classe de PR-proteínas encontradas no látex de *C. procera* são as quitinases, enzimas capazes de hidrolisar quitina, no qual são produzidas por uma ampla variedade de organismos incluindo bactérias, fungos, insetos, plantas e animais, apresentando diferentes finalidades nos organismos como nutrição, morfogênese e defesa contra patógenos que possuem quitina em sua composição (ADRANGI et al., 2010).

Essa classe enzimática compreende uma importante parte das PR-proteínas vegetais, sendo pertencentes das famílias PR-3, PR-4, PR-8, PR-10 e PR-11, na qual são geralmente associadas a indução de resistência em resposta ao ataque de fungos e outros fitopatógenos (SINGH, 2010; LI E YI, 2012).

A maioria das plantas expressam, de forma constitutiva, níveis relativamente baixos de quitinases e só produzem níveis mais elevados destas enzimas quando submetidas a ataques por fitopatógenos (DAHIYA et al., 2006). Danos provocados por fungos ou injúrias causadas por insetos provocam a liberação de uma variedade de hormônios, tais como etileno e ácido salicílico, que estimulam a produção de quitinases (GIANNIKIS et al., 1998). A transcrição de genes de quitinases ou o aumento na atividade enzimática podem ser induzidos por outros estímulos externos como os danos abióticos (HAMEL; BELLEMARE, 1995; HANFREY et al., 1996; COHEN-KUPIEC E CHET, 1998).

Trabalhos também evidenciam que a superexpressão dos genes de quitinases proporcionam resistência de culturas não só a microrganismos, mas também a estresse salino (DANA et al., 2006). Evidenciando a importância dessas proteínas para solucionar problemas de caráter biótico e abiótico. Além dessas funções relacionadas a mecanismos de defesa, acredita-se que essas enzimas possam desempenhar diversos outros papéis, como a regulação de processos de crescimento e desenvolvimento em plantas e também apresentam envolvimento no processo de amadurecimento de frutos induzidos por etileno (BOWMAN E FREE, 2006; DAHIYA et al., 2006).

As quitinases purificadas do látex de *C. procera* foram obtidas através de duas cromatografias em matriz de troca iônica: a primeira em CM-Sepharose (pH = 5,0), seguido de um fracionamento em matriz Mono-Q acoplada ao sistema de HPLC. O segundo fracionamento rendeu um P4 que possuía uma forte atividade quitinolítica, com pH ótimo variando entre 5-6 e temperatura ótima de 25 °C, análise proteômica da fração por eletroforese bidimensional permitiu identificar 15 spots, contendo proteínas ácidas (pI entre 4 e 6) e com massa molecular

aparente de 30 kDa. Quando avaliados por espectrometria de massas todos esses spots foram identificados como quitinases e apresentaram massa intacta de 27,4 kDa (VIANA, 2015).

A sequência amino terminal obtida revelou 50% de similaridade com quitinases de *Solanum lycopersicum*, *Oryza sativa*, *Nicotiana tomentosiformes* dentre outras. Sua estrutura secundária é constituída majoritariamente de alfa-hélices na estrutura e as isoformas se mostraram pouco resistentes a variações de temperatura e pH. Essas quitinases foram capazes de inibir a germinação de esporos de *C. gloeosporioides*, elas causaram leves alterações na permeabilidade da membrana dos esporos evidenciando uma possível aplicação para o controle desse fungo (FREITAS, 2016).

Considerando o importante papel das quitinases na defesa de plantas, vários estudos têm sido realizados para produção de plantas transgênicas que expressem várias quitinases, na tentativa de aumentar a sua resistência contra patógenos e contra danos abióticos.

1.4.3 Osmotinas

As osmotinas são proteínas que possuem estruturas primárias semelhantes à taumatina, proteína presente nos frutos da planta tropical *Thaumatococcus danielli*. Tanto as osmotinas como taumatinas pertencem à família 5 das proteínas relacionadas à patogênese, PR-5 (LIU et al., 2010).

A primeira osmotina foi descrita em culturas de células de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) adaptadas às condições de salinidade (SINGH et al., 1987). Essas proteínas se caracterizam por possuírem resistência à proteólise e à desnaturação em extremos de pH e temperatura. Essas características são conferidas pela presença de 10-16 resíduos de cisteína, envolvidos na formação de 5-8 pontes dissulfeto (VELAZHAHAN et al., 1999).

Muitos estudos têm demonstrado que a síntese de osmotinas em plantas é regulada por diversos sinais hormonais e ambientais, e confere proteção a vários tipos de danos incluindo infecções fúngicas, injúria mecânica, salinidade, dessecação, frio, radiação ultravioleta (TZOU et al., 2011; LEE et al., 2010; HONG et al., 2004). Isto é curioso porque associa essas proteínas com os dois mais amplos estresses aos quais as plantas estão sujeitas, biótico e abiótico e, por conseguinte, sugere que estas proteínas devam ser multifuncionais participando do processo de defesa.

As osmotinas são mais abundantes em tecidos como raízes, epiderme, corola e botões florais imaturos, sendo quase indetectáveis em outros tecidos (VIKTOROVA et al., 2012). A

descrição de osmotinas em látex, entretanto é bem rara, incluindo *Hevea brasiliensis* e mais recentemente *Calotropis procera* (SUBROTO et al. 2001; FREITAS et al., 2011 a).

A osmotina encontrada no látex de *C. procera*, denominada de CpOsm, foi purificada por cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose (pH = 5,0) e Resource-S (pH = 6,0), respectivamente (FREITAS et al., 2011a, b). Embora duas isoformas tenham sido observadas em eletroforese de duas dimensões (pI = 8,9 e 9,1), uma única sequência N-terminal de aminoácidos foi determinada. Quando submetida à eletroforese em condições desnaturantes, CpOsm migra como uma única banda de ~20,1 kDa. Entretanto, duas isoformas com massas moleculares de 22,34 Da e 22,536 kDa foram detectadas por espectrometria de massas (FREITAS et al., 2011a). CpOsm apresentou atividade antifúngica sobre *Fusarium solani* (IC50= 67,0 µg/mL), *Neurospora sp.* (IC50= 57,5 µg/mL) e *Colletotrichum gloeosporioides* (IC50= 32,1 µg/mL) inibindo a germinação de esporos e o crescimento vegetativo de hifas. Esta atividade foi perdida quando a proteína foi tratada com DTT, sugerindo que as pontes dissulfeto são fundamentais para que as proteínas sejam biologicamente ativas (FREITAS et al., 2011b).

Trabalhos realizados com a CpOsm recombinante mostraram, por meio de microscopia de força atômica, que a proteína era capaz de lesar irreversivelmente a estrutura de esporos de *Fusarium solani* e estes resultados dão indícios dos mecanismos de ação desta proteína sobre os fungos fitopatogênicos (RAMOS et al., 2015). Além da função de proteção a fitopatógenos, trabalho realizado por Souza e colaboradores (2017) associa uma provável relação entre a transcrição da CpOsm e a regulação da estabilidade de células de *C. procera* cultivadas in vitro na presença de altos níveis de NaCl. Dessa forma, existem indícios na literatura que a CpOsm participe da regulação das plantas a estresses bióticos e abióticos.

Pelo exposto, as osmotinas são proteínas com potencial de aplicação na agricultura, uma vez que estas moléculas podem conferir tanto proteção contra estresses abióticos (hídrico, salino e baixas temperaturas) como também contra estresses bióticos (infecção por fungos, por exemplo).

1.5 Justificativa

O presente estudo propôs a utilização de metodologias para investigar aspectos das funções biológicas das proteínas do látex de *Calotropis procera* no processo de defesa vegetal face a estresses bióticos e abióticos. Como já mencionado, essas proteínas são classificadas

como proteínas relacionadas a patogenicidade e estão associadas a processos biológicos envolvendo a defesa das plantas a estresse bióticos e abióticos.

Esta pesquisa abordou aspectos extremamente relevantes. O primeiro aspecto seria o de permitir uma comparação entre o efeito sinérgico das proteínas totais do látex de *C. procera* com o efeito das classes predominantes de proteínas sob fungos fitopatogênicos de importância econômica, buscando realizar uma associação da participação das proteínas laticíferas na defesa contra fitopatógenos.

O segundo seria o de caracterizar uma ação indireta das proteínas do látex de *C. procera* com o mecanismo de elicitação de defesa vegetal. Esse ponto forneceu informações sobre o potencial das proteínas de defesa em processos de ativação de cascatas na defesa de plantas versus ataques de fitopatógenos. Além disso, inseriu uma função biotecnológica para as proteínas do látex de *C. procera*: uma fonte alternativa para o manejo integrado plantas.

O terceiro aspecto estaria relacionado com uma abordagem mais restrita a funcionalidade da proteína osmotina de *C. procera*, testando a hipótese de sua dupla funcionalidade na defesa vegetal. Dessa forma, foi desenvolvido plantas de *N. tabacum* transformado com gene da osmotina de *C. procera* como modelo de estudo e aplicadas metodologias para testar a importância biológica dessa proteína.

A prospecção molecular por novas atividades de interesse agrônomo e estudos fisiológicos não perdeu força com o passar dos anos. Justifica-se isso porque a agricultura produtiva permanece refém das inúmeras adversidades climáticas, infecções, predadores, salinização e déficit hídrico dos solos, entre outras situações. Logo, estudar moléculas que possuam um potencial para minimizar grandes problemas agrícolas como a queda de produtividade devido a salinidade dos solos e os ataques por fitopatógenos e compreender como as moléculas agem são de bastante importância. Dessa forma, esse trabalho trouxe contribuições para prospecção de produtos para o mercado agrícola e para estudos de caráter do entendimento fisiológico de proteínas laticíferas na defesa vegetal.

2 POTENCIAL DAS PROTEÍNAS DE DEFESA DO LÁTEX DE *C. procera* NA PROTEÇÃO CONTRA FITOPATÓGENOS

2.1 Introdução

Os fungos são microrganismos que possuem uma ampla distribuição na natureza. Estima-se que cerca de 250.000 espécies de fungos habitam a superfície terrestre, distribuídos em todos os ecossistemas e nos mais diversos ambientes (SELITRENNIKOFF, 2001). Devido a essa diversidade, ao longo do processo evolutivo foram selecionados complexos mecanismos de defesa vegetal contra esses agentes patogênicos, ao mesmo tempo em que alguns destes patógenos conseguem reverter a defesa da planta (LI et al., 2013).

De modo geral, as plantas possuem mecanismos de defesas estruturais e bioquímicos, ambos pré-formados ou induzíveis em relação a ataques por patógenos (SHAH et al., 2014). Um eficiente mecanismo bioquímico de defesa é a síntese de proteínas com ação antifúngica. Dentre as proteínas mais estudadas na defesa de plantas, estão incluídas algumas famílias de PR-proteínas como as β -1,3-glucanases (PR-2), quitinases (PR-3), osmotinas (PR-5), inibidores de proteases (PR-6), proteases (PR-7), peroxidases (PR-9) e defensinas (PR-12) (FERREIRA et al., 2007).

O mecanismo de ação destas proteínas antifúngicas utiliza como alvos principais a parede celular, a membrana plasmática e alvos intracelulares. Estas proteínas podem interferir na síntese da parede celular, por meio da inibição da biossíntese dos componentes celulares essenciais da parede, como quitina ou glucanos, ou podem atuar em alvos intracelulares como os ribossomos, encerrando a síntese proteica nas células fúngicas (SHAH et al., 2014).

A maioria das proteínas antifúngicas atuam causando danos a membrana plasmática dos fungos. Alguns autores sugerem que estas proteínas se inserem na membrana celular dos fungos formando poros transmembranares, gerando um efluxo de íons intracelulares resultando na morte da célula (TOSSI et al, 2000). Algumas proteínas podem ainda exercer sua atividade antifúngica por meio da geração de peróxido de hidrogênio (FERREIRA et al., 2007) que pode ser diretamente tóxico para os fungos e/ou estimular respostas de defesa na planta (PUNJA, 2001; PARK et al., 2004).

As proteínas antifúngicas são alvos potenciais na busca de estratégias alternativa do manejo de fungos. Existem inúmeros trabalhos que exibem o efeito das proteínas em uma ação direta no controle de fungos. Como por exemplo o trabalho realizado por KABIR e

colaboradores (2016) que descreve o emprego de quitinases purificadas a partir de sementes de *Trichosanthes dioicapara* na inibição de crescimento de fungos fitopatógenos.

Além disso, genes que codificam proteínas antifúngicas estão sendo utilizados para o desenvolvimento de plantas resistentes ao ataque de fitopatógenos. Como por exemplo plantas transgênicas de *Arabidopsis* adquirem resistência ao fitopatógeno *Botrytis cinerea* quando transformadas com um gene codificador de uma quitinase presente no látex de *Morus multicaulis* (GAI et al, 2017).

Outra aplicação biotecnológica associada às proteínas antifúngicas é a utilização dessas na indução de resistência em plantas. Como por exemplo, o trabalho realizado por Nováková e colaboradores (2016), foi descrita a utilização de quitinases e beta-glucanases produzidas pelo fungo *Leptosphaeria maculans* para indução de resistência em plantas de colza (*Brassica napus*), essas proteínas foram capazes de induzir o aumento da expressão do gene para uma PR-1 e de impedirem o desenvolvimento do fungo na planta.

Nesse capítulo serão relatados o efeito das proteínas totais e frações do látex de *C. procera* sobre diferentes fungos fitopatogênicos de importância agrícola. Adicionalmente, serão também constatadas se estas proteínas tem a capacidade de induzir resistência em mudas de bananeiras, quando submetidas a inoculação por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, agente causal do Mal do Panamá.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antifúngico e indutor de resistência vegetal das proteínas de defesa encontradas no látex de *C. procera*.

2.2.2 Objetivos específicos

- Obter culturas puras dos fungos fitopatogênicos *Fusarium tuiense*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e *Colletotrichum gloeosporioides*.
- Extrair e fracionar as proteínas de defesa presentes no látex de *C. procera*.
- Avaliar a influência de diferentes concentrações das proteínas do látex de *C. procera* no crescimento micelial e germinação dos esporos dos fungos fitopatogênicos.

- Definir qual (is) fração (ões) das proteína (s) presente no látex é (são) responsável (eis) pelo efeito no crescimento micelial e germinação dos esporos dos fungos fitopatogênicos.
- Verificar se as proteínas do látex possuem uma ação indutora de defesa em mudas de bananeira cv. Maçã, proporcionando proteção contra o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

2.3 Materiais e métodos

2.3.1 Materiais

2.3.1.1 Material vegetal

Exemplares de *Calotropis procera* (Ait) R. Br. foram identificadas por um taxonomista do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará e depositadas sob exsicatas de número 32663. Plantas saudáveis, localizadas na cidade de Fortaleza-CE, foram utilizadas como fonte de látex fresco.

Para o experimento de indução de defesa, foram utilizadas mudas micropropagadas de bananeira (*Musa* spp.) cv. Maçã. Essas mudas foram adquiridas comercialmente da empresa BioClone Produção de Mudas Ltda.

2.3.1.2 Fungos

Foram utilizados os seguintes fungos nos ensaios deste trabalho:

- a) O fungo fitopatogênico *Fusarium tuiense*, agente causal da mal formação floral e vegetativa da mangueira, pertence à micoteca do Laboratório de Micologia do Departamento de Fitotecnia- UFC.
- b) Os fungos *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose do cajueiro e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, agente causal do Mal do Panamá foram isolados, identificados e são pertencentes a Coleção de trabalho do Laboratório de Patologia Pós-colheita, da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE).

2.3.1.3 Reagentes químicos

Membrana de diálise “cut off” 8.000 Da, Metiljasmonato, ácido tricloroacético (TCA), peróxido de hidrogênio, ácido ascórbico foram obtidos da Sigma-Aldrich, Brasil. Os meios de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) foram obtidos da DIFCO e Himedia, respectivamente. iodoacetamida (IAA) e matriz CM-Sepharose Fast Flow foram obtidas da G&E healthcare, Brasil. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.3.2 Métodos

2.3.2.1 Avaliação do potencial antifúngico das proteínas do látex de *Calotropis procera* e suas frações.

2.3.2.1.1 Isolamento dos fungos fitopatogênicos

O material de partida para o isolamento dos fungos foi coletado no Campo Experimental de Pacajus-CE, sendo esse pertencente a Embrapa Agroindústria Tropical. Para tal, foram coletadas folhas de cajueiro contendo sintomas causados pela antracnose (*C. gloeosporioides*) e porções do rizoma de bananeira com a sintomatologia do Mal do Panamá (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*).

Para o isolamento, das folhas de cajueiro foram retirados fragmentos de 0,5 cm no local de transição entre o tecido sadio e o lesionado. Enquanto que, para as mudas de bananeira foram retirados pedaços dos rizomas. Em seguida, foi realizado o isolamento indireto dos patógenos. Para tal, realizou-se desinfestação superficial em álcool 70%, por 30 segundos, seguido de lavagem com hipoclorito a 0,5%, por 1 min, com posteriores lavagens (2x), com água destilada estéril. Os tecidos foram secos em papel de filtro esterilizado, depositados em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) e incubados a 25 ± 2 °C, por um período de 3-7 dias. Após observado o crescimento micelial, as colônias foram repicadas para placas de Petri, contendo meio BDA, para obtenção das culturas puras. Após a esporulação, os isolados foram identificados com base em suas características morfológicas (BARNETT; HUNTER, 1972).

As culturas identificadas como *C. gloeosporioides* e *F. oxysporum* f. sp. *cubense* foram mantidas em placas com meio de BDA, para utilização posterior, exemplares desses fungos também foram conservados pelo método de Castellani (CASTELLANI, 1939).

2.3.2.1.2 Extração e fracionamento de proteínas do látex

O látex de *C. procera* foi coletado a partir do rompimento do ápice caulinar de plantas sadias, seguindo instruções relatadas por Alencar e colaboradores (2006). Esse fluido leitoso foi depositado em tubos de centrifugação do tipo Falcon (50 mL), sendo adicionado o volume de água destilada na diluição de 1:2 (v:v). Em seguida a amostra foi centrifugada (5.000 x g) a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi submetido à diálise contra água destilada, em membranas com capacidade de retenção de moléculas superior a 8.000 Da. Após o processo de diálise, o líquido retido no interior das membranas foi novamente centrifugado, nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante foi liofilizado, obtendo-se assim as proteínas totais do látex de *C. procera* (CpLP).

Para o procedimento de fracionamento do CpLP foi realizada uma cromatografia de troca iônica, em coluna de CM-Sepharose Fast Flow (14 x 2,5 cm) de acordo com metodologia descrita por Ramos e colaboradores (2006). Para isso, a coluna foi previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0). O CpLP (80 mg) foi dissolvido em 8 mL da solução de equilíbrio. O material foi centrifugado a 10.000 x g, numa temperatura de 5 °C, durante 10 minutos e o sobrenadante obtido foi aplicado à coluna.

Após o processo de aplicação da amostra, as proteínas não retidas foram inicialmente eluídas com a mesma solução de equilíbrio, para a obtenção do pico I (PI). As proteínas retidas foram eluídas após aplicação do tampão de equilíbrio acrescido de NaCl 0,2 M para obtenção do pico II (PII). O pico III (PIII) foi obtido após a aplicação da solução de equilíbrio acrescida de NaCl 0,3 M. As frações de 5,0 mL coletadas a um fluxo constante 0,5 mL/min foram lidas em espectrofotômetro a 280 nm. O material obtido de cada fração foi reunido, dialisado e liofilizado. Adicionalmente, as amostras do PII foram tratadas com inibidor de protease iodoacetamida. Para isso, adicionou-se a concentração de 300 mM da do reagente a amostras solúveis das proteínas PII, em seguida a solução foi dializadas e novamente liofilizada.

2.3.2.1.3 Avaliação da atividade antifúngica

Para avaliar o efeito das proteínas do látex de *C. procera* (CpLP) e suas frações na inibição do crescimento micelial e na germinação de esporos foram realizados ensaios *in vitro* utilizando-se a metodologia descrita por Souza e colaboradores (2011). Esses ensaios foram realizados com fungos fitopatogênicos causadores de doenças de importância agrícola.

Os fungos fitopatogênicos utilizados foram duas espécies do gênero *Fusarium*, o *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e o *F. tuiense*; e o *C. gloeosporioides*. Discos de micélio desses fungos preservados pelo método Castellani foram transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e mantidos em estufa a 25 ± 2 °C, na ausência de luz. Após um período de 7-14 dias as placas foram utilizadas para produção de suspensão dos esporos.

As suspensões de esporos dos fungos foram preparadas pela adição de 5 mL de água destilada estéril em placa de Petri. Com auxílio de uma alça de Drigalski, foram feitos movimentos suaves na superfície do micélio para liberação dos esporos. As suspensões obtidas foram filtradas em malhas finas de nylon estéreis para a retirada das hifas remanescentes. Os esporos foram contados com o auxílio de uma câmara de Neubauer, em microscópio de luz e a concentração de esporos foi ajustada para 10^6 esporos/mL.

As amostras utilizadas foram dissolvidas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, na concentração de 5 mg/mL (o CpLP) e 2,5 mg/mL (as frações PI, PII, PIII), centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e filtrada através de membrana com poro de 0,20 µm de diâmetro. Foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente, tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e o fungicida tiabendazol (4 mL/L).

Para avaliar a inibição do crescimento micelial dos fungos foi preparada misturas contendo 10 µL de uma suspensão aquosa de esporos (10^6 esporos/mL) e 90 µL de meio líquido *Yeast Peptone Dextrose* (YPD), o resultante foi incubado em placas de microtitulação de poliestireno de fundo plano de 96 poços. Após 16 horas a 27°C e no escuro, 100 µL das amostras foram adicionadas. A turbidimetria foi monitorada a 620 nm, por 48 horas em intervalos de 12 horas num leitor de microplacas (Biotrak II Plate Reader, Amersham Biosciences). Os dados foram examinados utilizando o programa GraphPadPrism 6 e análise de variância (ANOVA). O teste de múltiplas comparações de Tukey foi utilizado para identificar as médias que diferiram no teste de ANOVA. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes.

Para a avaliação da germinação foram realizadas misturas contendo 10 µL de suspensão de esporos (10^6 esporos/mL), 10 µL das amostras de proteínas e adicionadas em placas de polietileno reticuladas estéreis por 16 horas a 27°C. As placas foram avaliadas quanto à inibição da germinação de esporos sob microscópio de luz. Foram obtidas microfotografias de cada preparação para avaliar a germinação de esporos.

2.3.2.2 Avaliação do potencial do CpLP como indutor de resistência

2.3.2.2.1 Ensaio de avaliação do potencial do CpLP como indutor de resistência

Após os ensaios *in vitro*, foram realizados testes para verificar o potencial de indução de resistência vegetal das proteínas totais do látex de *C. procera* (CpLP) em mudas de bananeira inoculadas com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC). As mudas de bananeira mantidas em cultura *in vitro* foram adquiridas da empresa BioClone Produção de Mudanças LTDA. Essas mudas apresentavam cerca de quatro semanas de subcultivo. As mudas foram transplantadas para recipientes contendo o volume de 500 mL de substrato e areia estéril na proporção de 1:1 (m/m) e mantidas em casa de vegetação por 5 semanas para o processo de aclimatização.

Decorrida as cinco semanas de aclimatização, selecionou-se um grupo de mudas para o início do experimento. O experimento consistiu na formação de dois grupos experimentais, sendo um grupo de plantas inoculadas com o FOC e outro grupo não inoculado. Em cada grupo foram aplicados os seguintes tratamentos: (1) extrato aquoso do CpLP na concentração de 0,15 mg/mL; (2) solução aquosa de Metiljasmonato 1,5 mM e (3) água.

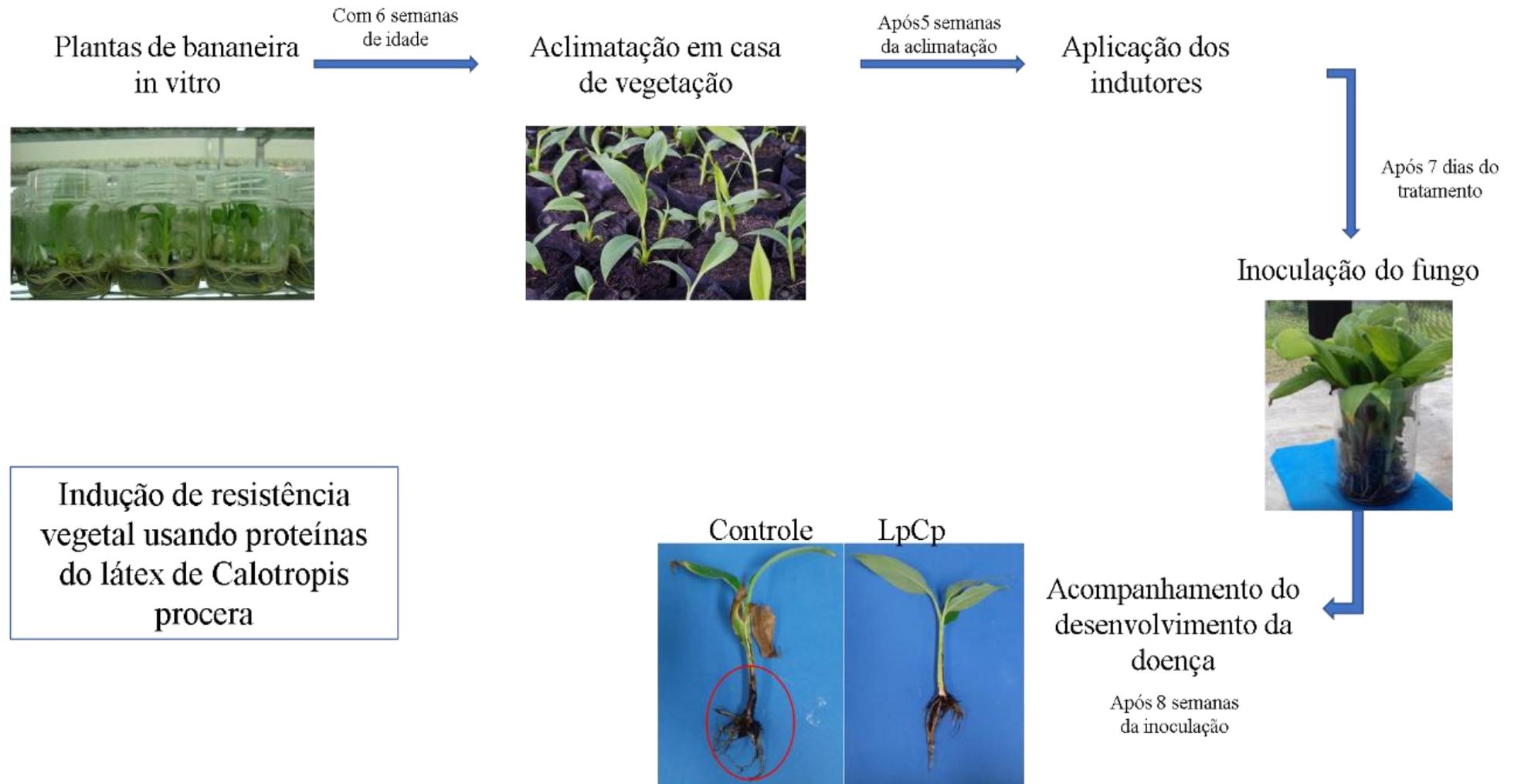
Os tratamentos foram pulverizados sobre mudas de bananeira até o ponto de escorrimento (cerca de 10 mL de solução por muda), após sete dias da aplicação desses compostos, as mudas foram inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. A inoculação do FOC, foi baseada na metodologia proposta por Borges e colaboradores (2007). Para isso, mudas de bananeira foram retiradas do substrato e suas raízes foram imersas por 20 minutos em suspensão de esporos na concentração de 10^6 esporos/mL. Em seguida, as mudas foram transplantadas para vasos e mantidas em casa de vegetação. Cada tratamento foi composto por 40 repetições, sendo a unidade experimental uma muda da espécie vegetal trabalhada.

Para a avaliação do experimento, foram realizados os seguintes pontos de coletas de amostras de plantas: 0, 12, 24, 48 horas e 7, 14 e 28 dias após a inoculação do fungo. As amostras coletadas foram utilizadas como fonte de material para extração de proteína.

Para a análise do efeito dos tratamentos nas plantas foram avaliados os seguintes parâmetros: índice de aparecimento da doença e taxa crescimento vegetal. Além disso foram feitas as seguintes análises: determinação da peroxidação de lipídeos, análise das enzimas do sistema antioxidante e microscopia eletrônica de varredura.

Os dados numéricos obtidos foram avaliados utilizando o teste de análise de variância (ANOVA). O teste de múltiplas comparações de Tukey foi utilizado para identificar as médias que diferiram no teste da ANOVA. O software estatístico utilizado foi o GraphPadPrism 6.

Figura 1 – Etapas do ensaio de indução de resistência



2.3.2.2.2 Avaliação da incidência e da severidade da doença

O desenvolvimento da doença foi determinado em intervalos de 7 dias a partir da inoculação do *FOC*. Para quantificação dos sintomas foi utilizada a classificação descrita por Cubeta e colaboradores (2004), que considera os sintomas reflexos da doença. Dessa forma, as plantas foram classificadas em cinco níveis da doença, onde: 0- planta saudável; 1- estrias ou amarelecimento das folhas inferiores; 2- estrias ou amarelamento da parte superior; 3-extensas estrias ou amarelamento na maioria das folhas; 4- murchamento grave e morte de plantas.

Após estabelecer o nível da doença das plantas de cada tratamento, foi calculado o Índice de Incidência da Doença (IID), na qual foi utilizada a seguinte equação:

$$IID(\%) = \frac{N^{\circ} \text{ de plantas infectadas}}{N^{\circ} \text{ total de plantas do tratamento}} \times 100$$

Para a avaliação o Índice de Severidade da Doença (ISD), utilizou-se a seguinte equação:

$$ISD = \frac{N^{\circ} \text{ de classificação} \times N^{\circ} \text{ de plantas infectadas}}{4 \times N^{\circ} \text{ total de plantas do tratamento}} \times 100$$

Onde o número de classificação é correspondente a nota atribuída aos níveis da doença.

2.3.2.2.3 Determinação da taxa de crescimento das mudas micropropagadas após a inoculação com o patógeno

Para a determinação deste parâmetro, utilizou-se a metodologia descrita por Lokhande e colaboradores (2010). Mudanças de bananeira dos diferentes tratamentos, tiveram sua taxa de crescimento determinada pela seguinte equação.

$$TC = \frac{Pf - P_0}{P_0}$$

Onde: P_0 = peso fresco das mudas no início do tratamento (antes da inoculação do *FOC*), P_f = peso fresco no final do tratamento (28 dias após a inoculação do *FOC*), TCR = taxa de crescimento.

2.3.2.2.4 Peroxidação de lipídeos

Para avaliar a peroxidação de lipídeos foi estimado o conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês, *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), conforme descrito por Heath e Packer (1968). Para isso, foram macerados na presença de nitrogênio líquido 200 mg das folhas de bananeiras dos diferentes tratamentos. Durante a maceração, adicionou-se 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) à 0,1 % e o material foi macerado por mais três minutos. O material formado foi centrifugado a 12.000 g, durante 15 minutos na temperatura de 4 °C. Em seguida, 500 µL desse extrato foi adicionado a uma solução de TCA 20% (p/v) e TBA 0,5% (p/v) em tubos de ensaio rosqueáveis. A reação foi levada a banho-maria a 95 °C, durante 25 minutos, esta reação foi interrompida adicionando os tubos de ensaio em banho de gelo. Após 30 minutos em temperatura ambiente, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro em dois comprimentos de onda distintos: 532 e 660 nm (formação do complexo MDA-TBA). O conteúdo de lipídeos foi determinado após a subtração entre leituras de absorvância em 532 nm e 600 nm e utilizando-se seu coeficiente de extinção molar $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, sendo o resultado foi expresso em $\text{nmol/g}^{-1} \text{ MF}$. Esta análise foi determinada através de amostras compostas, formadas por fragmentos de três mudas diferentes para cada tratamento, sendo as análises feitas em triplicata.

2.3.2.2.5 Extração de proteínas totais

O protocolo de partida para extração das proteínas totais das folhas de mudas de bananeira foi o descrito por Ponte e colaboradores (2014). Para isso amostras de folhas (1 g) foram pulverizadas com nitrogênio líquido e maceradas com 2 mL tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, contendo DTT 2 mM e PEG 3%. A mistura foi centrifugada a $12000 \times g$ durante 20 min a 4°C. O sobrenadante foi usado como o extrato proteico total para as determinações das atividades enzimáticas.

2.3.2.2.6 Análise das enzimas do sistema antioxidante

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada pelo método de Nakano e Asada (1981). Nesta metodologia, alíquotas de 0,1 mL de extrato proteico foram adicionadas ao meio de reação composto de 2,7 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0, contendo 0,5 mM de ácido ascórbico (m/v). Logo após, adicionou-se 0,2 mL de H₂O₂ 30 mM ao meio de reação e foi acompanhado o decaimento da absorbância a 290 nm. Esta leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro no intervalo de 0 a 300 segundos, sendo feita em intervalos sucessivos de 15 segundos. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente extinção molar do ascorbato e seu resultado foi expresso em consumo de $\mu\text{M de H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pelo método de descrito por Beer e Sizer (1952). A reação foi iniciada através da adição de 0,05 mL do extrato enzimático no meio de reação contendo 2,95 mL do tampão fosfato de potássio 50 mM adicionado de 20 mM de H₂O₂ em pH 7. O consumo de H₂O₂ foi monitorado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 240 nm, o cálculo da atividade foi realizado utilizando o coeficiente de extinção molar do H₂O₂ e seu resultado foi expresso em consumo de $\mu\text{M de H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

Para determinar a atividade da peroxidase do guaiacol (G-POD) foi utilizada a metodologia descrita por Urbanek e colaboradores (1991). Para tal, a mistura reacional contendo tampão fosfato de potássio 100 mM acrescido de EDTA 0,1 μM em pH 7,0 foi adicionado a H₂O₂ 15 mM. A reação foi iniciada pela adição de 10 μL do extrato enzimático ao meio de reação e o aumento da absorbância foi medido a 470 nm por minuto. A atividade foi determinada pela quantidade de tetraguaiacol formado, utilizando seu coeficiente de extinção molar como base para cálculos ($26,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Foi considerado que 4 moles de guaiacol são necessários para reduzir 1 mol de H₂O₂. Os resultados foram expressos em consumo de $\mu\text{M de H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

2.3.2.2.7 Análise de microscopia eletrônica de varredura

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no Laboratório de microscopia eletrônica, da Embrapa Agroindústria Tropical. Foram utilizadas para as análises, mudas de bananeira com 28 dias de inoculação de *FOC* e o grupo controle tratadas com CpLP, Mejas e água. Para tal, retirou-se pequenos fragmentos de diferentes partes das mudas (folha,

pseudocaule e rizoma) e iniciou o processo de fixação, com auxílio do fixador Karnovsky e uma pós-fixação em tetróxido de ósmio (1%).

Posteriormente, foram realizadas desidratações com soluções de etanol em concentrações crescentes: (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%) e secadas ao ponto crítico. As amostras foram metalizadas usando um dispositivo de revestimento por aspersão (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA). As análises, para visualização das amostras foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV, Zeiss DSM, modelo 940A), utilizando a voltagem de aceleração de 15kV e uma ampliação de 3.000-6.000x.

2.4 Resultados e discussão

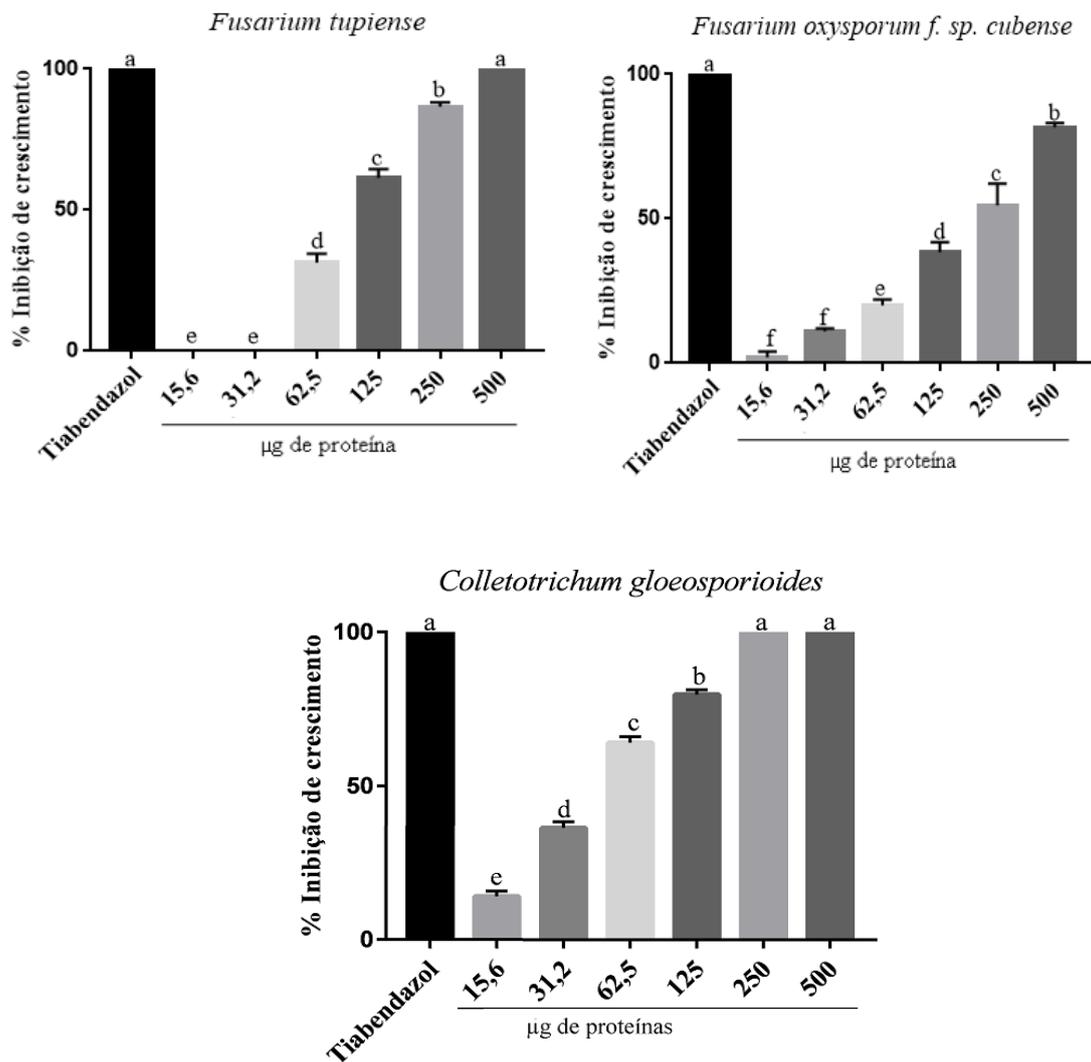
2.4.1 Avaliação do potencial antifúngico das proteínas do látex de *Calotropis procera* e suas frações.

A atividade antifúngica das proteínas do látex de *C. procera* e suas frações foram investigadas com base nos ensaios de inibições do crescimento micelial e da germinação dos esporos dos fitopatógenos: *Fusarium tuiense*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Para tanto, foram utilizadas as proteínas do látex na concentração máxima 5 mg/mL realizando posteriores diluições seriadas e as frações das proteínas do látex de *C. procera* (PI, PII, PII com Iodoacetamida e PIII) na concentração de 2,5 mg/mL.

As proteínas do látex de *C. procera* apresentaram forte inibição do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos. Os percentuais de inibição do crescimento utilizando uma quantidade de 500 µg de proteína variaram de 81% para *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e 100% para *F. tuiense* e *C. gloeosporioides*. Foi constatado um efeito de dose resposta, no qual a redução da concentração da proteína também reduziu a porcentagem de inibição do crescimento micelial dos fungos (Figura 2).

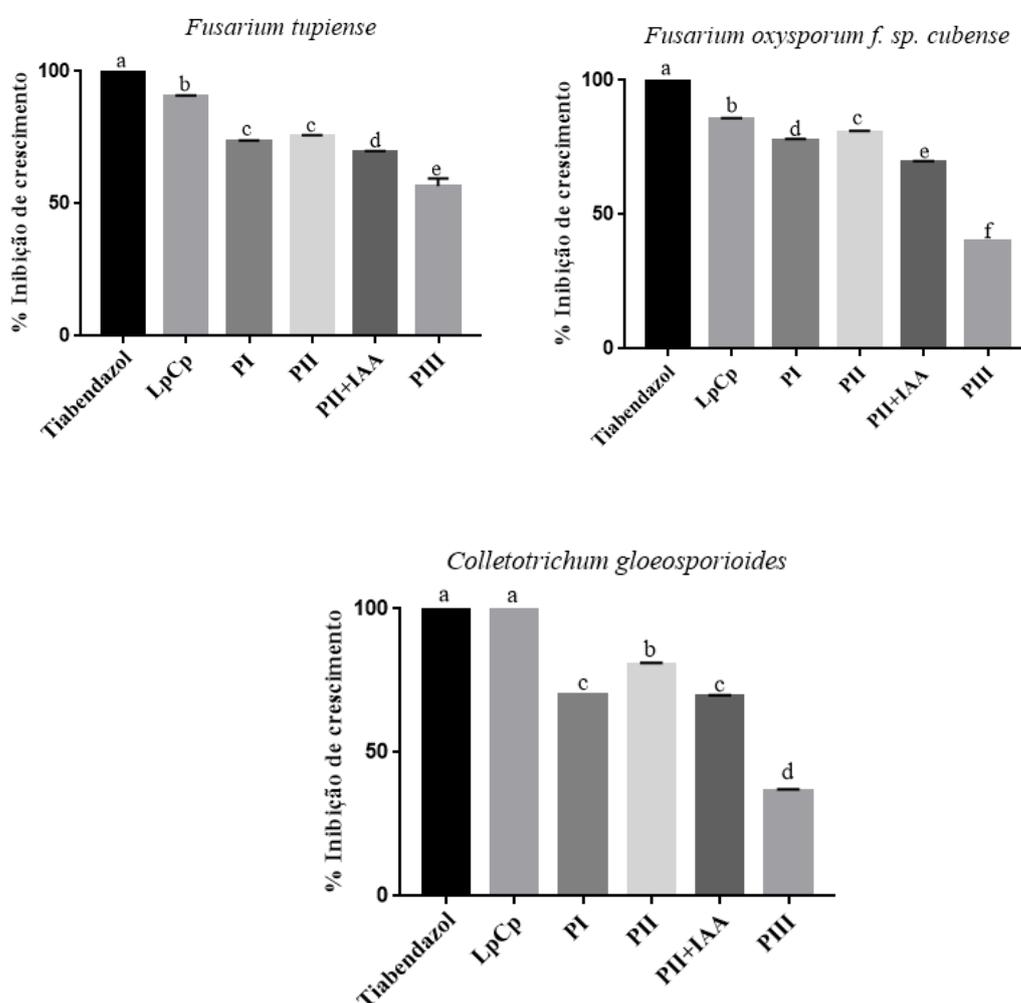
Ao avaliar o efeito das frações das proteínas dos látex de *C. procera* na concentração de 250 µg de proteína, foi possível observar que todas as frações afetaram crescimento vegetativo dos fungos. Os valores de inibição para as frações PI, PII, PII com IAA e PIII variaram de 52,5% a 75,5% para *F. tuiense*. Enquanto que para *F. oxysporum* f. sp. *cubense* a variação foi de 40% a 81%. Já para *C. gloeosporioides* as variações foram de 37% a 81,5% (Figura 3).

Figura 2 – Atividade antifúngica das proteínas do látex de *C. procera*. Gráficos apresentando a porcentagem de inibição de crescimento micelial de diferentes fungos fitopatogênicos utilizando concentrações crescentes de proteínas do látex de *C. procera*. Controle: fungicida tiabendazol (4 mL/L). Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de três determinações independentes. Significância estatística foi avaliada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey com $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística.



Fonte: elaborada pelo autor.

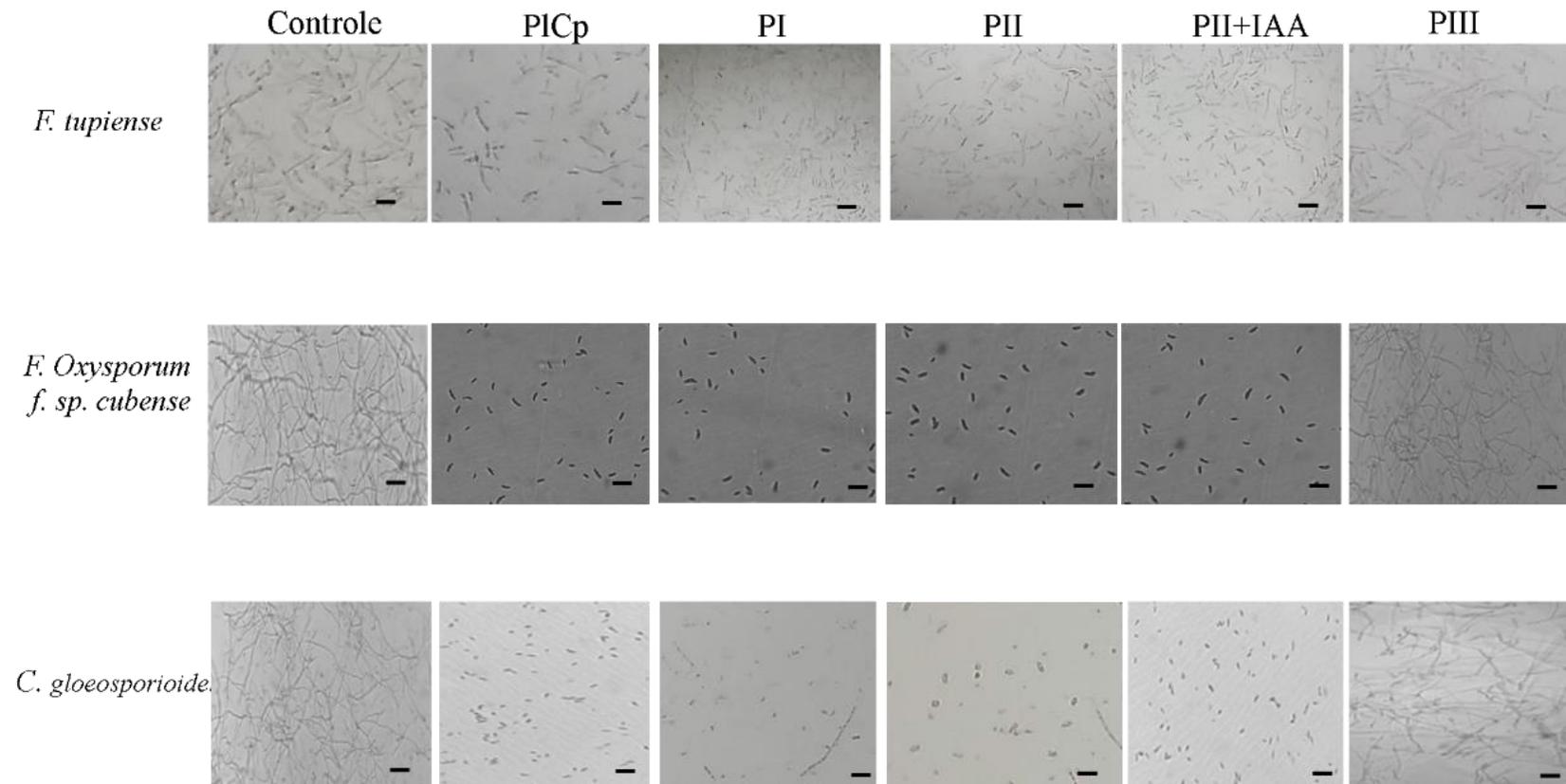
Figura 3 – Atividade antifúngica das frações proteicas do látex de *C. procera*. Gráficos apresentando a porcentagem de inibição de crescimento micelial de diferentes fungos fitopatogênicos utilizando as proteínas totais (CpLP) e as frações proteicas do látex de *C. procera*: PI, PII, PII com iodoacetamina (PII+IAA) e PIII. Controle: fungicida tiabendazol (4 mL/L). Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de três determinações independentes. Significância estatística foi avaliada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey com $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística.



Fonte: elaborada pelo autor.

Diferenças visuais quanto as inibições da germinação de esporos também foram observadas nas proteínas do látex de *C. procera* e nas suas frações PI, PII, PII com IAA e PIII para os fungos *F. tupiense*, *F. oxysporum f. sp. cubense* e *Colletotrichum gloeosporioides* corroborando assim com os ensaios de crescimento micelial (Figura 4).

Figura 4 – Atividade de inibição de germinação de esporos de fungos fitopatogênicos. Imagem apresentando a germinação de diferentes fungos fitopatogênicos utilizando as proteínas totais (CpLP) e as frações proteicas do látex de *C. procera*: PI, PII, PII com iodoacetamina (PII com IAA) e PIII. Barras de 40 µm.



Fonte: elaborada pelo autor.

Ao analisar os resultados dos diferentes fungos testados pode-se constatar dois aspectos importantes. Apesar de todas as frações possuírem capacidade de inibição, a fração de PIII reage de forma menos eficaz na inibição do crescimento micelial e da germinação dos esporos. Outro ponto importante é a redução da porcentagem de inibição do crescimento micelial quando o PII é tratado com o inibidor de protease iodoacetamida.

Os fluidos lactíferos são compostos por inúmeras moléculas de defesa, com destaque para as proteínas, por sua quantidade e variedade. Algumas proteínas do látex de *C. procera* já foram identificadas, classificadas e testadas quanto ao seu papel biológico. Em trabalho realizado por Ramos e colaboradores (2006) foi demonstrado que ao fracionar as proteínas totais utilizando a coluna de troca iônica CM-Sepharose foi obtido três frações proteínas (PI, PII e PIII). Em outro trabalho realizado por Freitas e colaboradores (2016), observou-se que a fração PI é a que possui inúmeras isoformas de proteínas do tipo quitinases. Essas proteínas foram associadas a uma possível proteção contra fungos fitopatogênicos, pois as mesmas apresentaram uma sutil inibição no crescimento micelial e na germinação dos esporos dos fungos. Neste trabalho, foi observado que a fração PI possuiu uma eficiente inibição contra os fungos testados, sendo bem superior ao efeito das quitinases purificadas relatadas na literatura, podendo levantar a hipótese de um possível efeito sinérgico entre as quitinases e outras proteínas ainda não identificadas na fração.

Em trabalho realizado por Souza e colaboradores (2011) foi observado que as proteínas totais do látex de *C. procera* possuem um alto potencial para inibição de fungos fitopatogênicos. Essa atividade é reduzida quando as amostras da proteína são tratadas com um inibidor de protease, sugerindo assim um provável efeito dessas proteínas na ação contra fungos. Em trabalho posterior, realizado por Ramos e colaboradores (2012) evidenciou que as atividades das proteases são encontradas na fração PII e PIII do látex de *C. procera*. Posteriormente, Freitas e colaboradores (2011a; 2011b) observou que a fração PII possui além de uma grande quantidade de proteases, proteínas do tipo osmotina que são frequentemente relacionadas com a proteção contra fungos. Nesse estudo, observou-se que a fração PII quando tratada com inibidor de protease reduzia de forma significativa sua ação, mas ainda era possível inibir uma porcentagem superior a 50% do crescimento vegetativo dos fungos, exibindo assim a intensa ação das osmotinas sobre os fungos.

Apesar dos vários trabalhos descrevendo a composição e funcionalidade das proteínas totais do látex de *C. procera* e suas frações PI e PII, ainda são escassos estudos avaliando as proteínas presentes em PIII, porém podemos observar que as proteínas presentes nessa fração

possuem uma ação eficaz contra os fungos fitopatogênicos testados. Dessa forma, torna-se essencial estudos de purificação e identificação das proteínas presentes em PIII.

2.4.2 Avaliação do potencial do CpLP como indutor de resistência

2.4.2.1 Avaliação do índice de incidência da doença e índice de severidade

O potencial de indução de resistência das proteínas totais do látex de *C. procera* foi determinado usando como modelo de estudo mudas de bananeira inoculadas com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*FOC*). Esse fungo é o agente causal do Mal do Panamá da bananeira, doença que vem impedindo o plantio de cultivares bastante apreciadas pelo consumidor.

Para realização do ensaio, foram criados dois grupos de plantas, onde o primeiro grupo passaria pela inoculação com o *FOC* e o segundo grupo não seria inoculado. Sete dias antes de realizar o processo de inoculação foram aplicados os tratamentos para indução de resistência. Os tratamentos aplicados foram: 1) o metil jasmonato (Mejas), composto relatado na literatura como indutor de resistência; 2) as proteínas totais do látex de *C. procera* (CpLP) e 3) água.

Os sintomas do Mal do Panamá só foram constatados em plantas inoculadas com o patógeno (*FOC*). Os primeiros sintomas da enfermidade foram visualizados 14 dias após a inoculação, em 55% das plantas do tratamento com indução apenas com água. Após 21 dias da inoculação, todas as plantas do grupo induzido com água apresentavam o desenvolvimento da doença.

Enquanto que, sintomas do Mal do Panamá só foram observadas em apenas 20% das plantas, quando induzidas com as proteínas do látex de *C. procera* (CpLP) e metil jasmonato (Mejas). Esta porcentagem de plantas doentes foi mantida em até 28 dias após a inoculação (Figura 5).

O índice de severidade da doença variou de 10% (plantas induzidas com CpLP e Mejas) a 75% (plantas induzidas apenas com água) (Figura 6). Nas mudas de bananeira, induzidas com água foi possível constatar os seguintes sintomas: queda das folhas, murchamento e morte. Já naquelas induzidas com CpLP e Mejas verificou-se apenas a presença de amarelecimento, das folhas mais velhas. Provavelmente, este sintoma esteja relacionado com a senescência natural das folhas mais velhas e, com o aparecimento de folhas mais novas nas mudas (FORTUNATO et al., 2013)

O processo de infecção pelo fungo *FOC*, inicia-se por meio do desenvolvimento do fungo no sistema radicular. A sintomatologia consiste no amarelecimento progressivo das folhas mais velhas para as mais novas, começando pelos bordos do limbo foliar e evoluindo para a nervura principal. Posteriormente, as folhas murcham, secam e se quebram junto ao pseudocaule (PLOETZ, 2001; DITA et al., 2018).

Devido a severidade dos sintomas causados por esse patógeno, é ampla busca de alternativas sustentáveis para reduzir a incidência e severidade da doença. Como por exemplo, em trabalho realizado por Getha e colaboradores (2005), que conseguiu reduzir cerca de 50% da severidade dos sintomas do *FOC* em mudas de bananeira utilizando um tratamento prévio com *Streptomyces sp.*

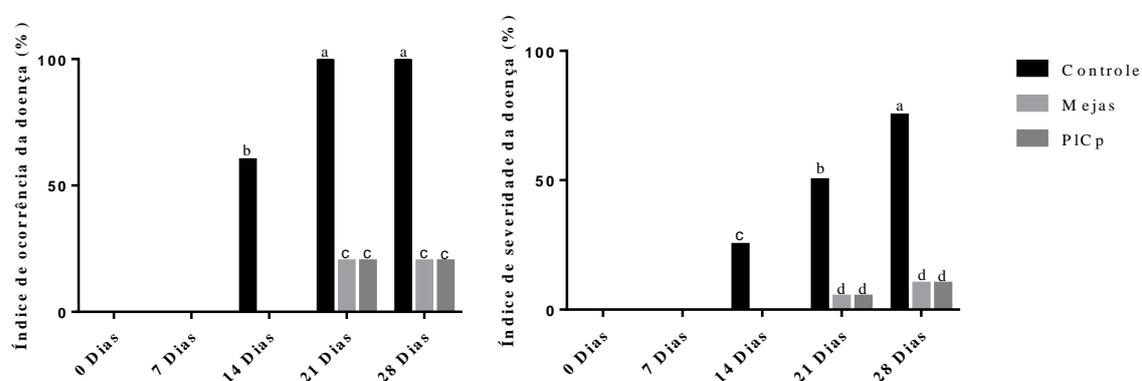
Nesse trabalho, o CpLP e o Mejas possuíram efeitos significativos sobre a severidade e incidência da doença. Em trabalho realizado por Sun e colaboradores (2013), foram observados resultados similares quando utilizou-se o Mejas para induzir a resistência de mudas de bananeira a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, corroborando assim com os resultados obtidos.

Figura 5 – Potencial das proteínas do látex de *C. procera* (CpLP) como indutor de resistência, em mudas micropropagadas de bananeira cv. Maçã. Imagem apresentando mudas de bananeiras inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *cabense* (FOC) e o tratamento controle 28 dias após a inoculação do fungo. O processo de indução da defesa foi realizado sete dias antes da inoculação do FOC, as plantas passaram pelos seguintes tratamentos: Controle negativo (água), MeJas (Metil Jasmonato 1,5 mM) e CpLP (proteínas do látex de *C. procera* 0,15 mg/mL).



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 6 – Avaliação do índice de incidência de doença (IID) e do índice de severidade de doença (ISD) em mudas de bananeira elicidadas com CpLP. Gráfico apresentando os dados de ocorrência e severidade da doença em mudas de bananeiras inoculadas com *F. oxysporum* f. *sp. cubense* (FOC) 28 dias após a inoculação do fungo. O processo de indução da defesa vegetal foi realizado sete dias antes da inoculação do FOC, as plantas passaram pelos seguintes tratamentos: controle (água), MeJas (Metil Jasmonato 1,5 mM) e CpLP (proteínas do látex de *C. procerca* 0,15 mg/mL). Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de três determinações independentes. Significância estatística foi avaliada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey com $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística.



Fonte: elaborada pelo autor.

2.4.2.2 Determinação da taxa de crescimento

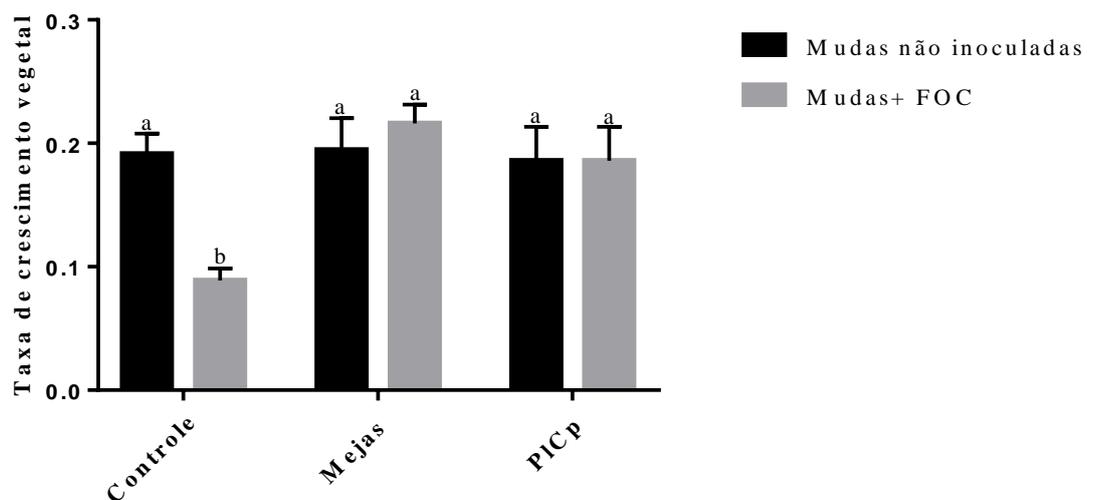
Com o intuito de avaliar possíveis danos causados pelo desenvolvimento de *FOC* nos tecidos do hospedeiro, foi analisada a taxa de crescimento (TC) das mudas de bananeira após 28 dias da inoculação do fungo. Esta taxa também foi avaliada nas plantas controle (plantas não inoculadas). A TC, foi obtida através da massa fresca total dos mudas antes e 28 dias após a inoculação por *FOC*. Observou-se que a taxa de crescimento foi padrão entre os tratamentos. Houve redução na taxa de crescimento para as plantas induzidas com água (controle negativo), com posterior inoculação do patógeno. As reduções foram de aproximadamente 43%, quando compara-se com as plantas não inoculadas do mesmo tratamento (Figura 7).

As infecções por patógenos fúngicos ocasionam uma série de danos fisiológicos nas plantas. Como resposta ao ataque pelos patógenos, muitas plantas reduzem o seu crescimento e produtividade (DITA et al, 2018). Tal fato, foi observado no presente estudo.

Após o FOC conseguir driblar as barreiras pré-formadas dos hospedeiros, ele inicia o processo de produção de hifas espessas e microconídios. Após algum tempo, as hifas tornam-se então clamidósporos localizando-se nos espaços intercelulares (Li et al., 2017; Xiao et al., 2013). Uma vez que o *FOC* atinge as raízes e o sistema vascular do hospedeiro, vai ocorrer uma deficiência na absorção de nutrientes e no transporte de água para o pseudocaule e folhas (Li et al., 2017). Dessa forma, o desenvolvimento do *FOC* causará uma deficiência no desenvolvimento vegetal.

Figura 7 – Avaliação da taxa de crescimento vegetal em mudas de bananeira elicidadas com CpLP. Gráfico apresentando os dados de taxa de crescimento em mudas de bananeiras inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *cupense* (*FOC*) e o tratamento não inoculado 28 dias após a inoculação do fungo. O processo de indução da defesa vegetal foi realizado sete dias antes da inoculação do *FOC*, as plantas passaram pelos seguintes tratamentos: controle (água), MeJas (Metil Jasmonato 1,5 mM) e CpLP (proteínas do látex de *C. procera* 0,15 mg/mL). Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de três determinações independentes. Significância estatística foi avaliada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey com $p < 0,05$.

Letras diferentes indicam diferença estatística.



Fonte: elaborada pelo autor.

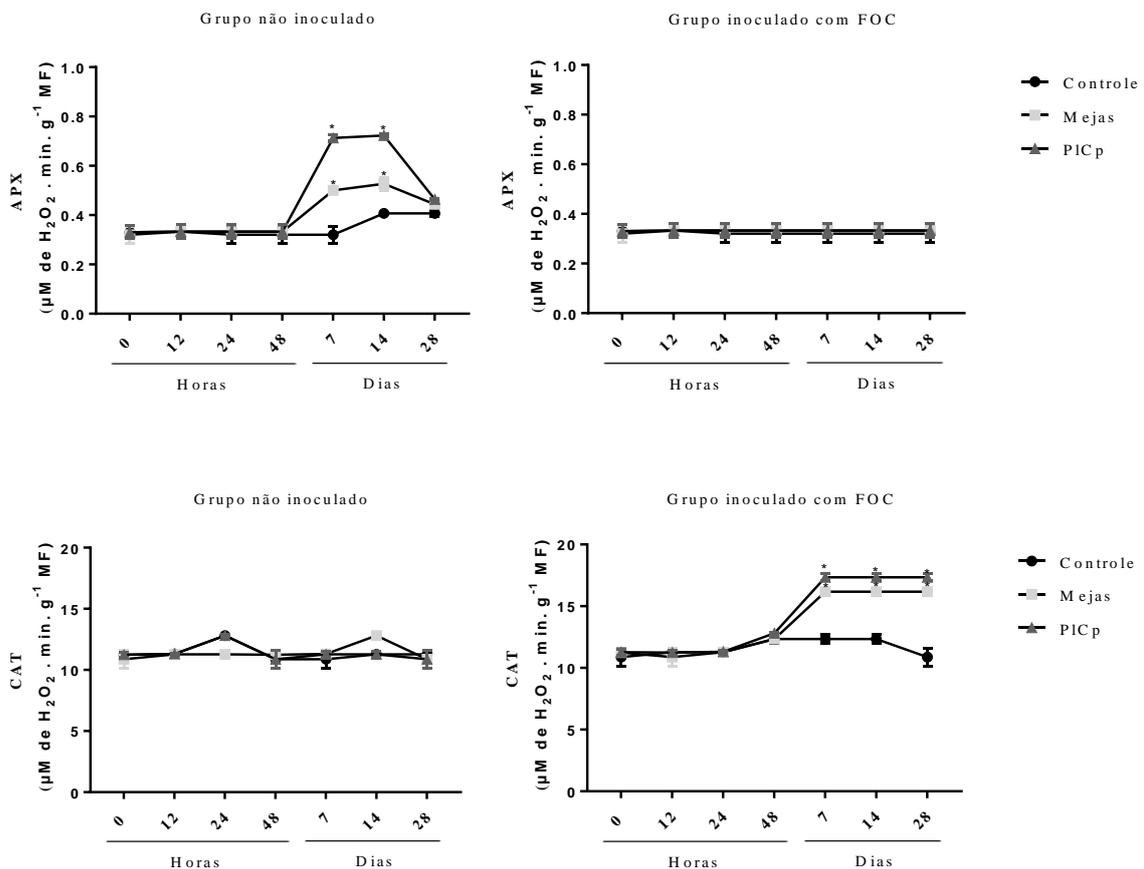
2.4.2.3 Atividade enzimática

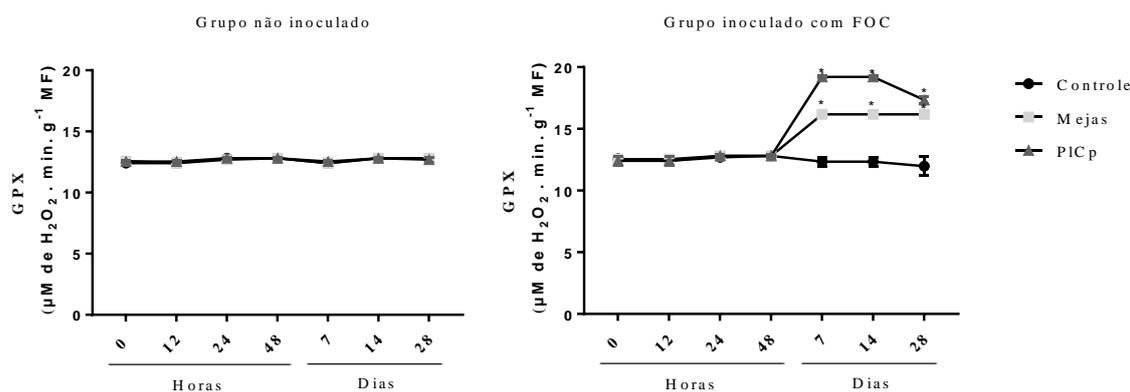
No presente estudo, a atividade da enzima APX não foi alterada durante o tempo de inoculação do fungo, mantendo seus níveis quase que semelhantes, para os diferentes tratamentos das plantas inoculadas com o *FOC*. Porém, ao observar o nível da atividade da APX em plantas que não foram tratadas com *FOC*, pode-se constatar incrementos da atividade, após sete dias nas plantas que foram tratadas com os agentes elicitores CpLP e Mejas (Figura 8). Alguns compostos possuem a capacidade de ativar a indução da resistência em plantas. Como por exemplo o Mejas, capaz de aumentar a atividade de enzimas de defesa como as do sistema antioxidante, as quitinases e glucanases, mesmo na ausência de agentes patogênicos (SUN et al., 2013).

Para a atividade das enzimas catalase e a peroxidase do guaiacol, podem-se observar que as mesmas apresentaram um padrão similar: plantas não inoculadas não apresentaram diferença na atividade durante o tempo de 28 dias. Já as plantas inoculadas com o *FOC* e tratadas com o CpLP e Mejas apresentaram um aumento na sua atividade, após 7 dias de inoculação com o patógeno, quando comparado com as plantas tratadas com água (Figura 8).

Trabalho realizado por Munusamy e colaboradores (2019), observou-se que mudas de bananeira resistente ao ataque do *FOC* aumentam o nível de transcritos do gene da catalase quatro dias após a inoculação com o fungo. Fortunato e colaboradores (2013) observaram que mudas de bananeira aumentam a resistência ao *FOC* quando cultivadas em substrato contendo silício, entre os fatores que contribuem para resistência da planta ao fungo está o aumento da atividade das enzimas do sistema oxidativo. Dessa forma, os resultados obtidos na pesquisa corroboram com trabalhos já relatados na literatura.

Figura 8 — Atividade enzimática das enzimas APX, CAT, G-POD em mudas micropropagadas de bananeira, elicitadas com as proteínas do látex de *C. procerca* CpLP. A taxa de crescimento foi verificada em mudas de bananeiras inoculadas com *F. oxysporum* f. *sp. cubense* (FOC) e em mudas não inoculadas com o patógeno. As avaliações procederam-se 28 dias após a inoculação do fungo. O processo de indução da defesa vegetal foi realizado sete dias antes da inoculação do FOC, as plantas passaram pelos seguintes tratamentos: controle (água), MeJas (Metil Jasmonato 1,5 mM) e CpLP (proteínas do látex de *C. procerca* 0,15 mg/mL). Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de três determinações independentes. Significância estatística foi avaliada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey com $p < 0,05$. A presença do (*) indica diferença estatística dos tratamentos quando comparado ao grupo controle.





Fonte: elaborada pelo autor.

Entre os danos ocasionados pelas infecções por fitopatógenos, o estresse oxidativo é bastante relatado. O estresse é caracterizado pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Como forma de proteção, as plantas possuem uma variedade de enzimas do sistema oxidativo, estas desempenham um papel de desintoxicação das ROS (Miller et al 2009; Mittler, 2002). Estas enzimas antioxidantes são classificadas como proteínas relacionadas à patogênese, cujas atividades são reguladas sob condições de patogenicidade (van Loon et al., 2006). Comumente, a atividade destas enzimas é afetada durante condições de estresse, tendo uma tendência de aumento na sua atividade.

A relação entre o aumento da atividade de enzima antioxidante e a proteção vegetal contra fungos é relatada em inúmeros artigos. Damodaran e colaboradores (2009) estudaram variedade de mudas de bananeira resistentes e suscetíveis ao ataque pelo *FOC*, mostrando que as mudas resistentes possuíam a capacidade de aumentar a atividades de peroxidases quando inoculadas com o fungo, sugerindo assim uma possível relação entre o aumento da atividade dessas enzimas e a proteção do vegetal ao ataque fúngico.

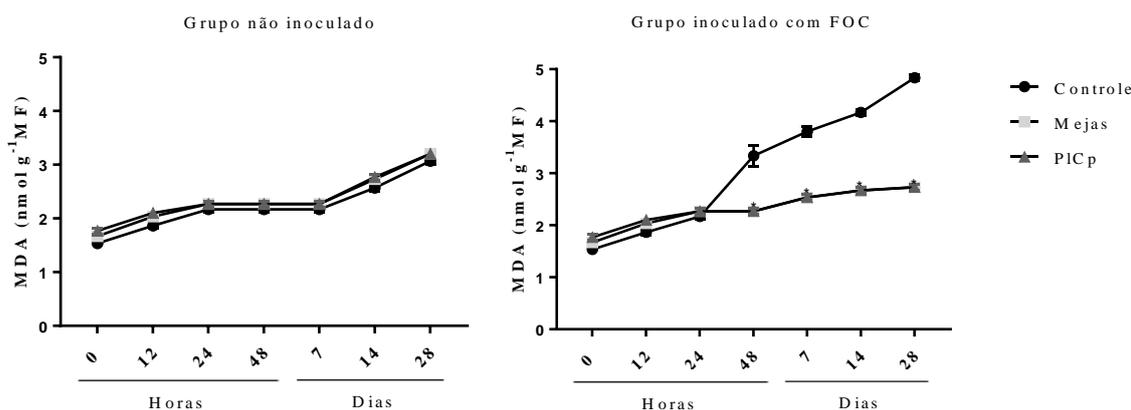
Desse modo, o trabalho relata um aumento significativo na atividade das enzimas GPX e CAT em plantas inoculadas com o *FOC* e tratadas com Mejas e CpLP, sugerindo uma relação desse incremento da atividade enzimática ao não desenvolvimento dos sintomas e ocorrência da doença nas mudas.

2.4.2.4 Peroxidação de lipídeos

As mudas de bananeira inoculadas com o patógeno (*FOC*) e tratadas somente com água (controle negativo) apresentaram um aumento na peroxidação de lipídios, ao longo do período do desenvolvimento do fungo. Foram constatados que os níveis de TBARS foram crescentes quando comparados às amostras das plantas do tratamento controle inoculado com os tratamentos MeJas e CpLP (Figura 9). Sugerindo assim que as plantas inoculadas tratadas com água sofreram um aumento significativo nos danos de membrana.

Existem relatos na literatura que a inoculação do *FOC* causam o aumento no nível de peroxidação de lipídeos e danos de membrana (FELCY-NAVAJOTHY et al., 2012; FORTUNATO et al., 2013; SUN et al., 2013). Os lipídeos são biomoléculas que desempenham um papel importante como componente estrutural da maioria das membranas celulares (PARIDA; DAS, 2005). No presente trabalho, foi observado um aumento no nível de malondialdeído (MDA) em plantas que possuem infecções severas do patógeno, indicando que as membranas das células das mudas de bananeira foram afetadas pelo processo de infecção realizado por *FOC*.

Figura 9 — Peroxidação de lipídeos em mudas micropropagadas de bananeira elicitadas com as proteínas do látex de *C. procera* (CpLP). A taxa de crescimento foi verificada em mudas de bananeiras inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (*FOC*) e em mudas não inoculadas. As avaliações procederam-se 28 dias após a inoculação do fungo. O processo de indução da defesa vegetal foi realizado sete dias antes da inoculação do *FOC*, as plantas passaram pelos seguintes tratamentos: controle (água), MeJas (Metil Jasmonato 1,5 mM) e CpLP (proteínas do látex de *C. procera* 0,15 mg/mL). Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de três determinações independentes. Significância estatística foi avaliada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey com $p < 0,05$. A presença do (*) indica diferença estatística dos tratamentos quando comparado ao grupo controle.



Fonte: elaborada pelo autor.

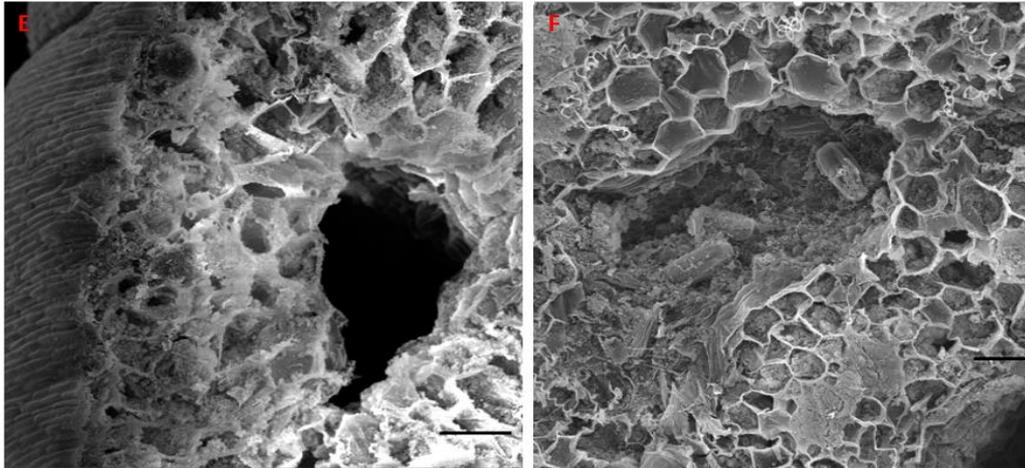
2.4.2.5 Análise de microscopia eletrônica de varredura

Com o objetivo de visualizar estruturas fúngicas nos tecidos vegetais de mudas de bananeira, foi realizado a microscopia eletrônica de varredura (MEV) nos tecidos de pseudocaule, folha e raiz de mudas inoculadas com o *FOC* e o tratamento controle.

Das amostras de tecidos avaliadas, pode-se visualizar estruturas fúngicas apenas no pseudocaule das plantas inoculadas. Nesses cortes, constatou-se estruturas de hifas nas plantas inoculadas tratadas com água. Além disso, a presença de estruturas de resistência do patógeno (os clamidósporos) foram também observados nesse tratamento e no tratamento com Mejas (Figura 10).

Após adentrar no hospedeiro o *FOC* inicia seu processo de colonização. Dessa forma, ele começa a produzir hifas nas estruturas dos vasos condutores. Algumas hifas podem ser vistas em vasos do xilema e crescendo no córtex radicular 10 dias após a inoculação (Li et al., 2011, 2017; Xiao et al., 2013). Uma rede de hifas se desenvolve no sistema intercelular entre os espaços ao longo das junções de células epidérmicas da raiz e também pode ser observado no xilema após alguns dias (Li et al., 2011; Guo et al., 2015). Após a formação das hifas, essas formam-se então clamidósporos em espaços intra e intercelulares (Li et al., 2011).

Os clamidósporos de *FOC* são constantemente produzidos uma vez que o hospedeiro é invadido antes mesmo de expor sintomas visíveis já encontra-se essa estrutura (Li et al., 2011). Explicando assim o aparecimento dessas estruturas em plantas assintomáticas.

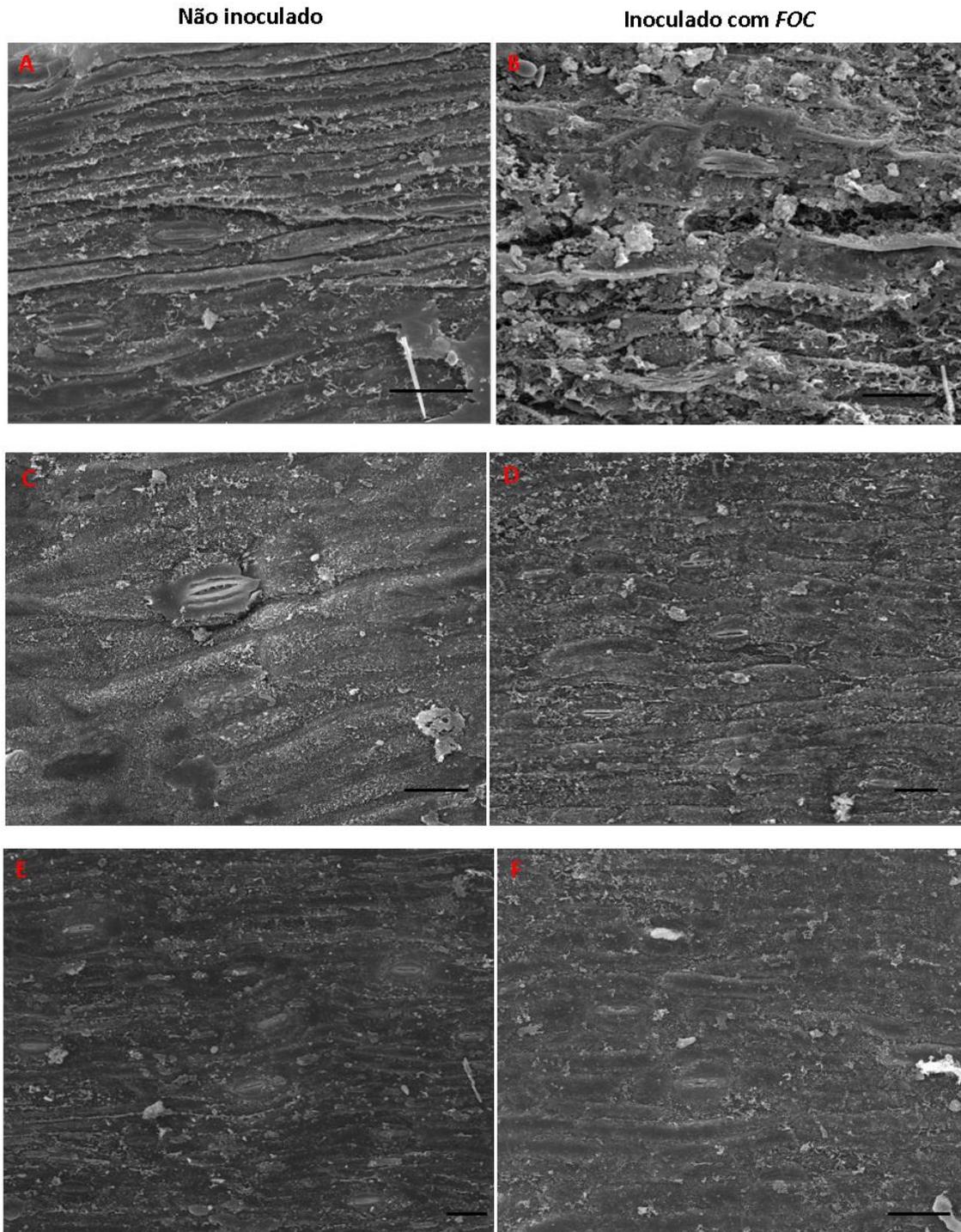


Fonte: elaborada pelo autor.

Nas amostras de folhas das mudas de bananeira não foram observados nenhuma estrutura referente ao patógeno. Entretanto, foi constatada uma desorganização na estrutura do vegetal (Figura 11). Quando o *FOC* consegue se estabelecer nas plantas, inicia-se o processo de produção de enzimas que degradam compostos importantes das células vegetais em busca da sobrevivência e reprodução dos fungos. Como por exemplo, alguns dos principais grupos de pectinas da parede celular podem ser digeridos por uma série de enzimas secretadas pelo patógeno, tais como metilesterases de pectina, poligalacturonases e polimetilgalacturonases (Cantu et al., 2008).

Nas amostras obtidas das raízes, não foi possível observar nenhuma estrutura do patógeno, relacionada a infecção (Figura 12).

Figura 11 – Corte de folhas de mudas micropropagadas de bananeira por microscopia eletrônica de varredura. Os seguintes tratamentos foram realizados: (A) Plantas não inoculadas tratadas com água, (c) Mejas e (E) CpLP (B) Plantas inoculadas com *FOC* tratadas com água, (D) Mejas e (F) CpLP. Legenda: h= hifas, C= clamidósporo. Barras correspondente a 25 μm .



Fonte: elaborada pelo autor.

Dessa forma podemos observar que houve uma redução macroscópica, microscópica e bioquímica dos danos causados pelo *FOC*. As proteínas de totais do látex de *C. procera* apresentaram resultados similares ao Metil Jasmonato, hormônio responsável pela ativação do sistema de defesa vegetal. Assim, propomos a utilização do CpLP como uma fonte alternativa para o manejo integrado do *FOC*.

2.5 Conclusão

O trabalho mostrou que as proteínas totais do látex de *C. procera*(CpLP) e suas frações exibiram um potencial contra o crescimento micelial e germinação dos esporos para os fungos testados. Observou-se também que as proteínas do látex de *C. procera* assim como o hormônio vegetal metil jasmonato (MeJas) possuem a capacidade de induzir a defesa de mudas de bananeira, tornando-a resistente ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*(*FOC*). Dessa forma, a aplicação exógena do CpLP e MeJas reduziram de forma significativa a incidência e severidade dos sintomas da doença causada pela inoculação do *FOC*. Além disso, as plantas tratadas com CpLP e MeJas conseguiram incrementar a atividade das enzimas Catalase e peroxidase do guaiacol. O tratamento com CpLP e MeJas também foi eficiente para a redução de danos de membrana, sugerindo um ataque mais severo do fungo as membranas biológicas das plantas não tratadas.

Em relação ao desenvolvimento microscópico do fungo, as plantas não tratadas exibiram a presença de hifas e clamidósporos nos vasos condutores do seu pseudocaule, sendo essas estruturas não observadas nas plantas tratadas com CpLP. As folhas das amostras não tratadas e inoculadas com o fungo possuíram uma alta desorganização celular, sendo um possível efeito da degradação de enzimas secretadas pelo fungo. Já os cortes microscópicos das raízes não apresentaram nenhuma diferença entre os tratamentos e não exibiram estruturas relacionadas com o *FOC*.

Dessa forma o CpLP, revelou-se como um potente composto de ação antifúngica direta sob fungos fitopatogênicos e como um eficiente indutor de resistência em mudas de bananeira desafiadas com o *FOC*. Sendo necessário trabalhos complementares para estudar quais as vias e mecanismos de ação envolvidos com esses efeitos aqui relatados.

3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Nicotiana tabacum* COM A REGIÃO CODIFICADORA DO GENE *CpOsm* E SEUS EFEITOS NA DEFESA VEGETAL

3.1 Introdução

A transformação genética utilizando *Agrobacterium tumefaciens* é uma técnica que consiste na inserção de uma ou poucas cópias do DNA exógeno no DNA genômico da planta hospedeira. A transformação via *A. tumefaciens* é vastamente utilizadas em plantas dicotiledôneas, apresentando uma grande aplicabilidade, como por exemplo, nos estudos de fisiologia vegetal (COLLIER et al., 2018) e no melhoramento de características de importância agrícola (QAMAR, 2015; LOPEZ-CALCAGNO, 2019).

São inúmeros os trabalhos que relatam a produção de variedades de plantas geneticamente transformadas que apresentam resistência a algum tipo de estresse biótico ou abióticos. Como por exemplo, o trabalho realizado por Rustagi e colaboradores (2015) mostrou que plantas de bananeira transformadas com o gene que codifica uma Proteína Relacionada à Patogênese pertencente à classe 10 (*AhSIPR10*), sobreviveram ao ambiente contendo até 400 mM de NaCl.

A utilização da *Nicotiana tabacum* como modelo de estudo para a transformação genética é bastante empregado na literatura atual. Esse fato é decorrente da alta suscetibilidade a *Agrobacterium tumefaciens* e alta capacidade de regeneração *in vitro* a partir de explantes foliares. Além dessas características a espécie é de fácil manuseio, apresenta o controle de polinização, alta taxa de regeneração *in vitro*, genoma relativamente pequeno, tecnologia de transferência e expressão gênica bem estudada, alto rendimento de biomassa e grande produção de sementes (DUNG et al., 2006, ROMMENS, 2006). De modo geral, 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.

A transformação genética de plantas, com genes que codificam PR-proteínas (do inglês, **Pathogenesis-Related Proteins**), vem sendo bastante empregada. As PR-proteínas são definidas como proteínas sintetizadas pelas plantas quando em situações de patogenicidade. Assim estas proteínas são produzidas quando as plantas estão em contato direto com o estresse ou quando são submetidos a sinalizadores de estresses (LIU E EKRAMODDOULLAH, 2006). Essas proteínas compartilham algumas características, como: a estabilidade em pH baixos e altas temperaturas, resistência à ação de enzimas proteolíticas, o fato de serem monoméricas,

possuem massa molecular variando entre 8 e 50 kDa, podendo estar localizadas no vacúolo, parede celular e/ou apoplasto (STINTIZI et al., 1993).

Dentre as PR proteínas as osmotinas são proteínas que possuem estruturas primárias semelhantes à taumatina, proteína presente nos frutos da planta tropical *Thaumatococcus daniellii*. Tanto as osmotina como a taumatina pertencem à família 5 das PR- proteínas (LIU et al., 2010). A primeira osmotina foi descrita em culturas de células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) adaptadas às condições de salinidade (SINGH et al., 1987).

Após a descoberta desta osmotina, muitos estudos têm demonstrado que a síntese desta em plantas é regulada por diversos sinais hormonais e ambientais, incluindo infecções fúngicas, injúria mecânica, salinidade, dessecação, frio, radiação ultravioleta, e hormônios como auxinas, etileno e ácido abscísico (NOORI; SOKHANSANJ, 2008). Estas proteínas são moléculas indispensáveis para resistência vegetal, pois estão associadas à defesa das plantas a estresses biótico e abiótico.

As osmotinas tem sido alvo de estudo na transformação genética de plantas, devido sua funcionalidade na proteção a estresses bióticos e abióticos. Como por exemplo, em estudo executado por Le e colaboradores (2018), mostra que plantas de arroz e tabaco transformadas com a osmotina de *Tripogon loliiformis* aumentam sua taxa de sobrevivência a múltiplos estresses abióticos (ao frio, a seca e ao estresse salino) quando comparados com as plantas não transformadas. A osmotina de *N. tabacum*, por exemplo, foi usada na transformação de plantas de amoreira (Das et al., 2011), nesse estudo as plantas transformadas tornaram-se resistentes a estresses bióticos e o gene exógeno promoveu resistência aos fungos *Fusarium pallidoroseum*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum dematium* quando comparada com as plantas não transformadas. Além dessas características, as amoreiras transgênicas suportaram condições de estresse salino de até 200 mM de NaCl enquanto as plantas controle, na mesma condição, apresentou morte do sistema foliar.

A osmotina pode ser encontrada em diferentes tecidos vegetais como nas raízes, epiderme, corola e botões florais imaturos, sendo quase indetectáveis em outros tecidos (VIKTOROVA et al., 2012), entretanto alguns estudos identificaram a presença da osmotinas em látex (SUBROTO et al. 2001; FREITAS et al 2011a). Como características em comum da osmotina, encontram-se a propriedade de ser rica em resíduos de cisteína, possuírem baixo peso molecular, estabilidade em pH baixo, estabilidade térmica e resistência à degradação por proteases (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

A osmotina purificada do látex de *Calotropis procera* (CpOsm) foi caracterizada com relação aos aspectos estruturais e funcionais (FREITAS *et al.*, 2011a; RAMOS, 2015). Em relação a sua função biológica CpOsm apresentou atividade antifúngica contra *Fusarium solani*, *Neurospora sp.* e *Colletotrichum gloeosporioides* inibindo a germinação de esporos e o crescimento vegetativo de hifas (FREITAS *et al.*, 2011). Além disso, existe uma relação direta com o aumento de transcrição do gene codificador de CpOsm quando células de *C. procera* são expostas a condições de salinidade (SOUZA *et al.*, 2017), sugerindo um possível efeito da CpOsm na proteção dos vegetais a salinidade.

Nesse capítulo, é descrito o estabelecimento de um modelo experimental que consistiu na obtenção de plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas com o gene da osmotina de *Calotropis procera* (CpOsm). Esse modelo experimental, visa auxiliar na compreensão da funcionalidade da osmotina de *C. procera*.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo geral

Obter plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas com o gene da osmotina de *Calotropis procera* (CpOsm).

3.2.2 Objetivo específico

- Inocular células de *Escherichia coli* contendo o vetor pET303::CpOsm para obtenção do fragmento gênico de interesse;
- Subclonar a sequência da CpOsm no vetor de clonagem pUCRBC-1;
- Subclonar o cassete de expressão RBC-1::CpOsm no vetor de clonagem binário pBINPLUS;
- Transformar células de *A. tumefaciens* com o vetor binário recombinante pBINPLUS::RBC-1::CpOsm;
- Transformar discos foliares de tabaco por co-cultivo via *A. tumefaciens*;
- Confirmar a transformação genética de plantas de tabaco com a sequência da CpOsm;
- Regenerar plantas tabaco capazes de expressar a CpOsm recombinante;
- Avaliar a função biológica *in vitro* da CpOsm recombinante produzida em tabaco.

3.3 Materiais e métodos

3.3.1 Materiais

3.3.1.1 Plantas

Plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* var. *Xanthi*) cultivadas *in vitro* foram utilizadas nos experimentos de transformação genética. Essas plantas foram micropropagadas, a partir do segmento nodal, em frascos do tipo *baby food* contendo a formulação nutritiva de MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), sem suplementação com reguladores de crescimento. As culturas foram matidas em condições de temperatura e luz controlada ($25 \pm$ e fotoperíodo de 16 horas). Após 45 dias do subcultivo, elas foram utilizadas no experimento de agroinfecção.

3.3.1.2 Fungo

Foram utilizados os seguintes fungos nos ensaios deste trabalho:

1. O fungo fitopatogênico *Fusarium tuiense*, agente causal da mal formação floral e vegetativa da mangueira, pertence à micoteca do Laboratório de Micologia do Departamento de Fitotecnia- UFC.
2. Os fungos *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose do cajueiro e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, agente causal do Mal do Panamá foram isolados, identificados e são pertencentes a Coleção de trabalho do Laboratório de Patologia Pós-colheita, da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE).

3.3.1.3 Bactérias

Células eletrocompetentes de *Escherichia coli* estirpe DH5 α Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) foram utilizadas nos experimentos de clonagem. Células de *Agrobacterium tumefaciens* estirpe LBA4404 (ElectroMAX, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) foram utilizadas para os experimentos de transformação das plantas de fumo.

3.3.1.4 Plasmídeos

O vetor pET303::CpOsm foi utilizado como DNA molde nas reações de PCR para experimentos de clonagem. O pUCRBC-1 foi usado como vetor de clonagem do inserto de CpOsm em *E. coli* DH5 α com o objetivo de adquirir o cassete de expressão RBC-1::CpOsm. O vetor binário pBINPLUS foi utilizado para a clonagem do cassete de expressão RBC-1::CpOsm em *E. coli* e para transformar células de *A. tumefaciens* estirpe LBA4404.

3.3.1.5 Enzimas

As enzimas de restrição *Bgl*III (40 U/ μ L), *Xba*I (20 U/ μ L), *Eco*RI (20 U/ μ L), *Hind*III (40 U/ μ L) e *Nde*I (20 U/ μ L) foram adquiridas da Fermentas (Burlington, Ontario, Canadá). A fosfatase alcalina (0,01 U/ μ L) e GoTaq DNA Polimerase (5 U/ μ L) foram adquiridas da Promega (Madison, WI, EUA). A T4 DNA ligase (9 U/ μ L) foi adquirida da Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A DNA polimerase de alta fidelidade Phusion Hot Start (0,4 U/ μ L) foi adquirida da Finnzymes (Vanta, Finlândia).

3.3.1.6 Reagentes e outros materiais

Oligonucleotídeos iniciadores, apropriados para reações de PCR, foram sintetizados pela Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Marcadores de massa molecular de ácidos nucléicos usados nas eletroforeses em gel de agarose foram Φ X174 RF DNA/*Hae*III fragments, λ -DNA/*Hind*III digest (New England BioLabs, Ipswich, MA, EUA), e DNA Ladder 1 kb (Jena Bioscience).

Para a extração de RNA foi utilizado o kit *RNeasy plant mini Kit* (Qiagen). Já a purificação de produto de digestão e PCR foi utilizado o *GFX PCR DNA and gel band purification kit* GE Healthcare Bio-Sciences (Piscataway, NJ, EUA). Todos os demais reagentes usados neste trabalho foram de grau analítico e com elevado grau de pureza.

3.3.2 Métodos

3.3.2.1 Obtenção do fragmento gênico CpOsm

3.3.2.1.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Oligonucleotídeos iniciadores específicos foram desenhados para a obtenção da sequência codificadora da proteína de *Calotropis procera* (CpOsm). Esses foram desenhados com base na sequência depositada no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) de número de acesso ALA55570. Sítios para endonucleases de restrição foram adicionados às extremidades 5' dos *primers*, para proporcionar a retirada do gene durante as subclonagens (ANEXO D).

3.3.2.1.2 Extração do DNA plasmidial do vetor pET303::CpOsm

Com o intuito de obter a sequência gênica da osmotina, células de *E. coli* TOP10F' preservadas em estoque de glicerol contendo o vetor recombinantes pET303::CpOsm (ANEXO A), foram cultivadas em placas de Petri contendo meio LB (Meio Luria-Bertani) suplementado com carbenicilina (50 µg/mL) e estreptomicina (30 µg/mL) e mantidas a 37 °C durante o período de 16 horas. Essas células foram produzidas e cedidas por Oliveira (2014).

Após o cultivo em meio sólido, colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de caldo LB contendo os mesmos fatores de seleção que o meio anterior. As culturas foram mantidas sob agitação orbital constante de 180 rpm, a 37 °C, por 16 horas. Decorrido o tempo, alíquotas de 3 mL das suspensões bacterianas foram centrifugadas a 12.000 x g por 5 minutos e posteriormente submetidos ao processo de extração de DNA plasmidial pelo método da lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Após a centrifugação, as células foram coletadas e ressuspensas em 200 µL da solução de Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM e glicose 50 mM. Em seguida, adicionou-se uma alíquota de 200 µL da solução de lise, constituída de NaOH 4,0 M com SDS 10%. Após 5 minutos, foram adicionados às amostras 200 µL de acetato de potássio 2,8 M, com o intuito de neutralizar a suspensão. Decorridos 5 minutos de neutralização as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g 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 a -20 °C por 2 horas e em seguida centrifugadas a 12.000 x g, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. Após a etapa de lavagem, o DNA extraído foi diluído em 50 µL de água ultrapura autoclavada.

Após a obtenção do DNA as amostras foram submetidas a um tratamento com RNase A. Para isso, adicionou-se 2 µL de RNase A (1 mg/mL), incubando-se a amostra por 1 hora a

37 °C. As amostras contendo o DNA plasmidial foram quantificadas em espectrofotômetro, medindo-se a absorvância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm para o cálculo da concentração.

Com o intuito de confirmar a presença do gene da osmotina e para verificar a qualidade do plasmídeo, foi realizado uma digestão enzimática com as enzimas *Bgl*II (20 U/μL) e *Xba*I (20 U/μL). A reação de digestão foi preparada em um volume de 10 μL, contendo 1 μL de DNA plasmidial (500 ng/μL), 0,1 μL (2U) de *Bgl*II, 0,1 μL (2U) de *Xba*I, 1 μL do tampão (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 ultrapura. A reação foi incubada a 37 °C por 3 horas e, logo em seguida, a enzima foi inativa a 60° por 20 minutos. O produto da digestão foi aplicada em um gel de agarose 1% para corrida de eletroforese.

3.3.2.1.3 Amplificação do fragmento gênico CpOsm e purificação do produto de PCR

O plasmídeo recombinante pET303::CpOsm, foi usado como molde em reações de PCR, utilizando uma DNA polimerase termoestável de alta fidelidade (*Phusion Hot Start* DNA polimerase) e *primers* específicos, com sítios de restrição apropriados para clonagem no plasmídeo pUCRBC-1 (ANEXO B).

As reações foram realizadas em um volume final de 20 μL, contendo DNA molde (50 ng), dNTPs (200 μM cada), *primers* específicos (0,5 μM cada), tampão 1X *Phusion* GC ou HF com 1,5 mM de MgCl₂ (Finnzymes), *Phusion Hot Start* DNA polimerase (0,4 U; Finnzymes) e água ultrapura estéril (q.s.p. 20 μL). O processo de amplificação ocorreu em termociclador PTC-200 (MJ Research) programado para uma etapa inicial de desnaturação (3 minutos a 98 °C), seguida por 35 ciclos de 10 segundos a 98 °C (desnaturação), 30 segundos a 65 °C (anelamento) e 2 minutos e 30 segundos a 72 °C (extensão). Após o último ciclo, foi realizada uma última etapa de extensão prolongada (72 °C por 5 minutos). Uma alíquota de 10 μL do produto final de reação foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%.

Os produtos da amplificação foram purificados a partir do gel de agarose com auxílio do *Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare Life Sciences). Para isso, a banda referente aos fragmento de interesse foi homogeneizada com 500 μL de tampão de solubilização através de agitação vigorosa até adquirir uma coloração amarela. A mistura foi adicionada a uma coluna *GFX MicroSpin™* montada em um microtubo de 1,5 mL. A amostra foi centrifugada por 60 segundos a 16.000 x g. O volume no tubo foi descartado e a coluna

com o DNA aderido foi montada em outro microtubo. Foi adicionado à coluna o volume de 500 µL de tampão de lavagem. A amostra foi centrifugada a 16.000 x g por 60 segundos. O microtubo foi descartado e a coluna foi montada em um novo microtubo de 1,5 mL. Foram adicionados 20 µL de tampão de eluição e a coluna mantida à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, a coluna foi centrifugada por 5 minutos a 16.000x g. O produto da eluição foi quantificado e submetido à digestão enzimática com as enzimas de restrição *XbaI* e *BglII*.

3.3.2.2 Obtenção do cassete de expressão *RBC-1::CpOsm* e clonagem do vetor *RBC-1::CpOsm::pBINPLUS* em *Escherichia coli DH5α*

3.3.2.2.1 Produção do vetor pUCRBC-1::CpOsm e transformação de *E. Coli DH5α* com o vetor recombinante

O inserto do gene *CpOsm* purificado e o vetor pUCRBC-1 foram separadamente submetidos ao processo de digestão com as enzimas *XbaI* e *BglII*, a reação procedeu-se como descrito no item 3.2.2. Após a digestão do inserto *CpOsm* e do vetor pUCRBC-1 esses foram submetidos a uma reação de ligação com o intuito de gerar o vetor recombinante pUCRBC-1::CpOsm.

A ligação do inserto com o vetor foi produzida utilizando o *Kit T4 DNA Ligase Invitrogen* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A reação consistiu na adição de 5 µL do tampão *2x Rapid Ligation* (Tris-HCl 60 mM-pH 7,8, MgCl₂ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM, polietilenoglicol 10%), 1 µL de pUCRBC-1 (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 horas no termociclador PTC-200 (MJ Research). O produto da reação de ligação foi utilizado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli DH5α* por meio de eletroporação.

Para o processo de transformação, utilizou-se uma mistura de 10 µL do produto reação de ligação e 40 µL de células eletrocompetentes, o produto foi deixado em repouso por 5 minutos, em banho de gelo, sendo então transferida para uma cubeta de eletroporação de 4 mm, aplicando-se à suspensão de células um pulso de 2,5 kV utilizando o Eletroporador 2510 (Eppendorf). Imediatamente após a aplicação do pulso, as células foram recuperadas da cubeta com 1 mL de meio SOC e incubadas a 37 °C por 90 minutos sob agitação orbital constante de 180 rpm. Após o período de incubação, 100 µL das culturas foram cultivadas em meio LB ágar suplementado com carbenicilina (100 µg/mL), estreptomicina (30 µg/mL). As culturas foram

mantidas a 37 °C por 16 h, até a visualização de colônias. Colônias brancas foram selecionadas ao acaso para extração do DNA plasmidial e posterior confirmação da presença do plasmídeo recombinante via digestão plasmidial e PCR (metodologias descritas anteriormente nos itens 3.2.1.2 e 3.2.1.3).

3.3.2.2.2 Obtenção do cassete de expressão RBC-1::CpOsm e produção do vetor binário pBINPLUS::RBC-1::CpOsm

Após a obtenção do vetor recombinante pUCRBC-1::CpOsm a etapa seguinte foi a retirada do cassete de expressão RBC-1::CpOsm e a inclusão desse inserto no vetor binário pBINPLUS resultando no vetor binário recombinante pBINPLUS::RBC-1::CpOsm (ANEXO C). As enzimas de restrição que possuem sítio de clivagem compatíveis com o múltiplo sítio de clonagem do vetor binário pBINPLUS e com o inserto RBC-1::CpOsm são as enzimas *HindIII* e *EcoRI*.

Para obtenção do cassete e do vetor binário recombinante foi inicialmente realizada a digestão do vetor recombinante pUCRBC-1::CpOsm com as enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI* e logo em seguida o material foi purificado e digerido com uma terceira enzima de restrição a *NdeI*. O vetor binário pBINPLUS foi digerido com as enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI*. O produto foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose na concentração de 1% para confirmar a eficiência da digestão. O material resultante de cada plasmídeo digerido foi purificado utilizando o *Kit GFX PCR and gel band purification* (GE). Após a purificação do inserto e do vetor binário, estes foram submetidos a uma reação de ligação utilizando o *Kit T4 DNA Ligase Invitrogen* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). O produto da reação de ligação foi usado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* DH5 α 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). O DNA plasmidial foi quantificado e submetido à digestão enzimática com as enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI* para a confirmação da eficiência da transformação.

3.3.2.3 Transformação de células de *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor binário recombinante pBINPLUS::RBC-1::CpOsm

3.3.2.3.1- Transformação da *Agrobacterium tumefaciens*

Após a transformação de *E. coli* DH5 α como vetor binário recombinante pBINPLUS::RBC-1::CpOsm foi realizado uma extração do DNA plasmidial, e esse material introduzido em células eletrocompetentes de *A. tumefaciens* LBA4404 por eletroporação (metodologia anteriormente descrita no item 3.2.2.1).

A seleção dos transformantes foi conduzida em meio YM contendo os antibióticos canamicina 50 mg/L e estreptomicina 50 mg/L. Após 72 horas, as colônias isoladas foram transferidas para meio YM líquido contendo os mesmos agentes seletivos. Essas colônias foram submetidas à extração de DNA plasmidial para confirmação da presença do gene CpOsm por PCR.

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

As plantas de tabaco foram transformadas pelo método de agroinfecção (HORSCH *et al.*, 1985). Explantes foliares das plantas de tabaco foram expostos a uma suspensão de *A. tumefaciens* transformadas com o vetor RBC-1::CpOsm::pBINPLUS. Como controle, explantes de tabaco foram co-cultivados com *A. tumefaciens* contendo o vetor binário pBINPLUS. Explantes não transformados também foram usados como controle positivo inoculados em meio com antibiótico) e negativo (inoculados em meio sem antibiótico). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e consistiu de quatro tratamentos, sendo cada tratamento formado por cinco repetições e cada repetição (unidade experimental) constituída por uma placa de Petri contendo dez explantes.

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 28 °C. Ao final do período de incubação, os explantes pertencentes a cada 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 ágar 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 28 °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 canamicina 50 mg/L) e o regulador de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) 1 mg/L. Os brotos adventícios formados foram enraizados em meio MS suplementado de canamicina 50 mg/L desprovido de reguladores de crescimento. As plantas enraizadas foram utilizadas como fonte de material vegetal para o processo de confirmação da transformação.

3.3.2.5 *Análise da expressão e transcrição do gene CpOsm em plantas transformadas*

3.3.2.5.1- Análise dos transformantes primários por PCR

Para confirmação da presença do gene CpOsm nas plantas de *N. tabacum* folhas de plantas de *N. tabacum* que emitiram raízes em meio seletivo (transformados com o vetor pBINPLUS e RBC-1::CpOsm::pBINPLUS) e em meio controle (plantas não transformadas) foram utilizadas como fonte de material para extração de DNA.

O DNA genômico foi extraído de folhas de plantas de *N. tabacum* utilizando a metodologia de SAMBROOK *et al.* (1989). Foram coletadas 500 mg de folhas e maceradas na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, que foi transferido para um tubo contendo 12 mL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM pH 8, CTAB 2%, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M), adicionado de β - mercaptoetanol 0,2% (v/v) e previamente aquecido a 65 °C. Este material foi incubado em banho-maria a 65 °C por aproximadamente 90 minutos, e durante esse período o tubo foi invertido a cada 10 minutos. Ao final dessa incubação, o material foi centrifugado a 5.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para novo tubo e ao mesmo foi adicionado 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v/v). Após inversão, as fases orgânica e aquosa foram separadas por centrifugação a 10.000 x g por 20 minutos à temperatura ambiente.

Após a centrifugação a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e os ácidos nucleicos precipitados pela adição de 2,5 volumes de etanol absoluto resfriado e mantidos a -20 °C por 12 horas. Decorrido o tempo, o material foi novamente centrifugado nas mesmas condições e o precipitado foi coletado. O material obtido foi colocado para secar na bancada e depois dissolvido em 300 μ L de tampão TE (Tris-EDTA, pH 8,0). A solução foi adicionada de 3 μ L de RNase A (10 mg/mL) e incubada a 37 °C durante 60 minutos.

Após a obtenção do DNA, o material foi quantificado e usado como molde para uma reação de PCR utilizando os *primers* específicos da CpOsm.

3.3.2.5.2 Análise de transcrição do gene CpOsm via RT-PCR

Para confirmação a transcrição do gene CpOsm nas plantas de *N. tabacum*, folhas de plantas de *N. tabacum* que enraizaram em meio seletivo (transformados com o vetor pBINPLUS e RBC-1::CpOsm::pBINPLUS) e em meio controle (plantas não transformadas) foram utilizados como fonte de material para extração de DNA.

Para o procedimento de extração de RNA, utilizou-se 200 mg do material que foram macerados em nitrogênio líquido. O pó obtido da maceração foi utilizado para extração de RNA total, através do *RNeasy plant mini Kit* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

Adicionou-se 700 μ L do tampão RLT e 10 μ L de β -mercaptoetanol às amostras maceradas, sendo esta mistura homogeneizada usando vórtex, e a solução obtida transferida através de pipetagem para uma mini coluna do kit (*QIAshredder spin column*), acoplada a um tubo coletor de 2 mL e centrifugada a 25 °C por 2 minutos a 12.000 x *g*. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo microtubo, onde foi adicionado 0,4 mL de etanol 95% e a solução obtida foi misturada por inversão.

A solução obtida anteriormente foi transferida para uma nova coluna do kit (*RNeasy mini spin column*), também acoplada a um tubo coletor de 2 mL e centrifugada a temperatura ambiente (25 °C) por 15 segundos a 8.000 x *g*. O eluído foi descartado sendo adicionado na coluna 400 μ L de tampão RW1, centrifugando-se a temperatura ambiente por 15 segundos a 8.000 x *g*. Após esta lavagem com RW1 a coluna foi transferida para um novo tubo coletor e foram adicionados 500 μ L de tampão RPE na coluna, que foi submetida a uma centrifugação a temperatura ambiente por 15 segundos a 8.000 x *g*. O eluído foi descartado e foram adicionados mais 500 μ L do tampão RPE na coluna. Uma nova centrifugação a temperatura ambiente por 2 minutos a 8.000 x *g* foi realizada a fim de eliminar qualquer resíduo de etanol que pudesse interferir em reações posteriores.

O eluído e o tubo coletor foram descartados e a coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 1,5 mL. Em sequência foram adicionados 40 μ L de água livre de RNases diretamente na coluna, submetendo a nova centrifugação por 1 minuto a 8.000 x *g* para eluição do RNA. O RNA eluído foi armazenado a -20 °C para posterior quantificação, análises eletroforéticas e ensaios de RT-PCR.

O RNA total foi utilizado para a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizando o *Kit da IMpromIITM Transcriptase Reverse* (Promega, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante. Para ocorrer a reação, incubou-se 1 µg da amostra de RNA com 500 ng de iniciador Oligo (dT)₁₈, por 5 minutos à temperatura de 70 °C e depois a 4 °C por mais 5 minutos. Logo após, adicionou-se uma mistura reacional contendo: 4 µL de tampão de transcrição reversa 5 vezes concentrado, 2,4 µL de MgCl₂ 0,025 M, 1 µL de dNTP 0,01 M e 1 µL da enzima transcriptase reversa 1 UA/ µL. A reação de síntese da fita complementar ocorreu a 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 1 hora, seguida de 75 °C por 15 minutos (inativação da enzima). O cDNA obtido foi armazenado a -20 °C para posteriores reações de PCR. Para a realização da PCR foi utilizado 1 µL do resultante da reação acima descrita e utilizado a mesma metodologia descrita em tópicos anteriores.

3.3.2.6 *Detecção da CpOsm recombinante em plantas de tabaco e sua função biológica in vitro*

3.3.2.6.1- Extração de proteínas de folhas de *Nicotiana tabacum*

Para o estudo das proteínas de *N. tabacum* folhas de plantas que emitiram raízes em meio seletivo (transformados com o vetor pBINPLUS e RBC-1::CpOsm::pBINPLUS) e em meio controle (plantas não transformadas) foram utilizados como fonte de material para extração de DNA.

Para realizar a extração foram selecionados um grama de folha para 3 ml de tampão acetato de sódio 50 mM. O tecido foi macerado com nitrogênio líquido em banho de gelo por um tempo padronizado de 10 minutos. O material macerado foi colocado em tubo de centrifuga graduado de 15 mL centrifugado por 15 minutos a 10.000 x g a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e colocado para diálise por 48 horas em uma membrana fina de 12 kDa. Após a diálise, as amostras foram liofilizadas.

As amostras de proteínas dos diferentes clones foram utilizadas para os ensaios de imunodeteção, eletroforese e ensaios de crescimento micelial e germinação de esporos de fungos fitopatogênicos.

3.3.2.6.2- Produção de anticorpos anti-CpOsm nativa

O método de produção de anticorpos anti-osmotina foi descrito por Ramos e colaboradores (2006). A primeira etapa para produção de anticorpos anti-CpOsm consistiu na purificação da osmotina nativa de *C. procera* (CpOsm). Esta purificação foi realizada através do método descrito por Freitas e colaboradores (2011a). A fração proteica do látex de *C. procera* (PL) foi fracionada em três picos após cromatografia em coluna de CM-Sepharose *Fast Flow* a pH 5,0. O pico PII-CM-Sepharose (eluído com 0,2 M de NaCl) foi aplicado em uma coluna de troca iônica Resource-S acoplada em um sistema de FPLC, previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 6,0. Eletroforeses em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram realizadas para visualizar o grau de pureza das amostras (LAEMMLI, 1976).

Os anticorpos policlonais contra a osmotina nativa foram produzidos em coelho macho, da raça Nova Zelândia, de quatro meses de idade, obtido no Departamento de Zootecnia da UFC. A sensibilização foi induzida por uma dose inicial com CpOsm (0,5 mg em 0,5 mL de salina estéril) e adjuvante completo de Freud (0,5 mL), administrada por via intramuscular, na pata traseira do animal. Doses de reforço de 1 mg de CpOsm em 1 mL de solução salina, sem o adjuvante, foram posteriormente aplicadas por via subcutânea no dorso do animal nos dias 21, 35 e 42. Cortes nas extremidades das orelhas do coelho foram realizados e aproximadamente 10-15 mL de sangue foram coletados antes da primeira sensibilização (dia 0) e das doses de reforço (dia 35 e 42). O sangue foi deixado em repouso em estufa a 37 °C por 5 h, para retração do coágulo. Posteriormente, o soro foi obtido após centrifugação a 2.000 g por 5 min a 25 °C. O soro total resultante foi utilizado para os ensaios de *Dot blotting* e *Western Blotting*.

3.3.2.6.3 Dot blotting

Imunodeteção de proteínas imobilizadas em membrana de nitrocelulose foi realizada de acordo com o procedimento originalmente descrito por Towbin e colaboradores (1979). As amostras utilizadas foram o LPCp e as amostras de proteínas extraídas de folha de *N. tabacum* transformada e controle.

Para esta técnica, 20 µg de extrato proteico de folhas de fumo foram dissolvidos em 10 µL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e aplicados na membrana de nitrocelulose. Logo após, as membranas foram incubadas em solução bloqueadora, composta de PBS (NaCl 0,13 M, KCl 2,6 mM, Na₂HPO₄ 5,3 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, pH 7,4) contendo 5% de leite desnatado, sob agitação orbital constante de 40 rpm a 25 °C por 2 h. Decorrido esse período, a solução bloqueadora foi descartada e a membrana foi lavada três vezes consecutivas em PBS contendo 5% de leite desnatado. Os anticorpos primários (anti-CpOsm nativa) foram adicionados em uma

diluição de 1:5.000 (v:v) na solução bloqueadora e a incubação foi realizada à temperatura ambiente, sob agitação constante, por 2 horas. A membrana foi então submetida a três lavagens (cada uma por 2 min, sob agitação) com PBS, para eliminação do excesso de anticorpo primário não ligado às proteínas retidas na membrana. Em seguida, o anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho, conjugada com fosfatase alcalina) foi adicionado à solução, em uma diluição de 1:5.000 (v:v), e o mesmo permaneceu em contato com a membrana por 2 horas, sob agitação constante, à temperatura de 25 °C. Finalmente, após um ciclo de três lavagens sucessivas idênticas às anteriores, a reação de revelação foi desenvolvida utilizando o substrato BCIP/NBT, que constituiu de uma solução de Tris-HCl 0,2 M, pH 9,0, NaCl 0,1 M, MgCl 2,5 mM, NBT 10 mg/mL e BCIP 25 mg/mL. As membranas foram deixadas sob agitação com a solução do substrato, até o aparecimento das bandas. A reação foi interrompida com a lavagem da membrana em água destilada.

3.3.2.6.4 Western Blotting

Para o ensaio de *Western Blotting* a metodologia utilizada foi similar a descrita por TOWBIN et al. (1979), para isso foram realizadas duas eletroforeses, uma para a eletrotransferência das proteínas e outra para coramento com Coomassie Brilhante Blue R-350. Os poços do gel de eletroforese foram preenchidos com LPCp e as amostras de proteínas extraídas de folha de *N. tabacum* transformada e controle, as amostras estavam na concentração de 40 µg por poço.

As proteínas foram transferidas por 2 horas a 100 mA para uma membrana de PVDF, que foi previamente ativada com metanol e incubada por 10 minutos com tampão de corrida contendo 20% de metanol, usando uma unidade de transferência no *Semi-dry* (GE HealthCare). Os passos seguintes da reação foram realizados conforme já descritos no ensaio de Dot Blotting. Após a adição do substrato esperou-se a formação de bandas arroxeadas e a reação foi parada lavando a membrana com água destilada.

3.3.2.6.5 Atividade de inibição do crescimento micelial e germinação de esporos de fungos fitopatogênicos

Para avaliar o efeito das proteínas de folhas de *N. tabacum* na inibição do crescimento micelial e na germinação de esporos de fungos fitopatogênicos foram utilizados extratos

proteicos de plantas transformadas com o vetor pBINPLUS e RBC-1::CpOsm::pBINPLUS e plantas não transformadas. Os fungos foram de duas espécies do gênero *Fusarium*, o *F. oxysporum cubense* e o *F. tuiense*. As culturas de fungos foram mantidos em estufa a 27 ± 2 °C na ausência de luz e renovados mensalmente através da transferência de fragmentos de micélio para placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA).

As suspensões de esporos dos fungos foram preparadas pela adição de 5 mL de água destilada estéril em placa de Petri, quinze dias após o repique. Com auxílio de uma alça de Drigalski, foram feitos movimentos suaves na superfície do micélio para liberação dos esporos. As suspensões obtidas foram filtradas em malhas finas de nylon estéreis para a retirada das hifas remanescentes. Os esporos foram contados com o auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio óptico e a concentração de esporos foi ajustada para 10^6 esporos/mL.

As amostras utilizadas foram dissolvidas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, na concentração de 2 mg/mL, centrifugadas a $10.000 \times g$ por 10 minutos a 4 °C e filtrada através de membrana com poro de 0,20 µm de diâmetro. Foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente, tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e o fungicida tiabendazol (4 mL/L).

Para avaliar a inibição do crescimento micelial foram preparadas amostras contendo 10 µL de uma suspensão aquosa de esporos (10^6 esporos/mL) e 90 µL de meio líquido *Yeast Peptone Dextrose* (YPD). A incubação foi feita em placas de microtitulação de poliestireno de fundo plano, de 96 poços. Após 16 horas a 27 °C e no escuro, 100 µL das amostras foram adicionadas. A turbidimetria foi monitorada a 620 nm, por 48 horas em intervalos de 12 horas num leitor de microplacas (Biotrak II Plate Reader, Amersham Biosciences). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e o programa estatístico utilizado foi GraphPadPrism 6. O teste de múltiplas comparações de Tukey foi utilizado para identificar as médias que diferiram no teste de ANOVA. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes.

Para a avaliação da germinação de esporos foram preparadas amostras contendo 10 µL de suspensão de esporos (10^6 esporos/mL) e 10 µL das amostras de extrato proteico e adicionadas em placas de polietileno reticuladas estéreis por 16 horas a 27 °C. As placas foram avaliadas quanto à inibição da germinação de esporos sob microscópio de luz. A microfotografia de cada preparação foi obtida, e a taxa de germinação de esporos foi avaliada visualmente.

3.3.2.6.6 Avaliação do estresse salino em plantas de fumo

Para a avaliação do efeito da salinidade em plantas de fumo transformadas e controle, foi empregada a metodologia descrita por Chen e colaboradores (2018). Para isso, plantas *in vitro* transformadas com os vetores pBINPLUS, RBC-1::CpOsm::pBINPLUS e o tratamento controle foram usadas para o experimento. Elas foram padronizadas por idade (15 dias após o subcultivo), tamanho médio (3 cm de altura) e por número de folhas (média de 3 folhas por planta). Para a indução do estresse salino, as plantas foram cultivadas em meio MS suplementado com 3% de sacarose e 300 mM de NaCl, meio MS sem a adição de NaCl foi utilizado como grupo controle para todos os tratamentos.

Após uma semana de contato com o meio foram avaliados os seguintes fatores: tamanho da planta, número de folhas e a quantificação de prolina livre.

3.3.2.6.7 Avaliação do crescimento e número de folhas

Após 7 dias de contato com o meio MS na ausência e presença de NaCl, foi realizado uma mensuração do tamanho e do número de folhas das plantas de fumo transformadas e controle. Para cada tratamento, foram analisadas 3 plantas sendo o resultado expresso a média dessas. Os dados foram examinados utilizando o programa GraphPadPrism 6 e análise de variância (ANOVA). O teste de múltiplas comparações de Tukey foi utilizado para identificar as médias que diferiram no teste de ANOVA. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes.

3.3.2.6.8 Quantificação de prolina

Para a determinação do teor de prolina, utilizou-se 100 mg de diferentes amostras de folhas de *N. tabacum* transformadas com o vetor pBINPLUS e RBC-1::CpOsm::pBINPLUS e em meio controle. A concentração de prolina foi determinada de acordo com os procedimentos descritos por Bates e colaboradores (1973).

Nesta metodologia, 100 mg de folhas frescas foram homogeneizadas em 10 mL de ácido sulfossalicílico, em seguida este material foi centrifugado em uma velocidade de 4.000 g durante 15 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante gerado foi retirado para análise de conteúdo de prolina. Para tanto, foram adicionados em tubo de ensaio: 1 mL da amostra, 1

mL de ninidrina ácida e ácido acético. Para o preparo da ninidrina ácida, foi pesado 1,25 g de ninidrina e dissolvido em 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido fosfórico 6 M. Os tubos de ensaio rosqueáveis foram fechados, agitados vigorosamente e colocados em banho-maria a 100 °C por 1 hora. Esta reação foi interrompida colocando as amostras em banho de gelo por aproximadamente cinco minutos. Após o resfriamento, as amostras foram retiradas do banho de gelo e mantidas em temperatura ambiente, em seguida foram adicionados 2 mL de tolueno no meio da reação.

Após a adição do tolueno, os tubos foram agitados vigorosamente, e a fase superior menos densa foi aspirada com o auxílio de pipeta Pasteur e esta solução foi utilizada para a realização das leituras da absorbância em 520 nm. Os teores de prolina das amostras foram determinados através de comparação com uma curva padrão de prolina utilizando como branco o tolueno. As amostras foram compostas de folhas de três plantas diferentes, sendo as análises feitas em triplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e o programa estatístico utilizado foi o GraphPadPrism 6 e o teste de múltiplas comparações de Tukey foi utilizado para identificar as médias que diferiram no teste de ANOVA. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes.

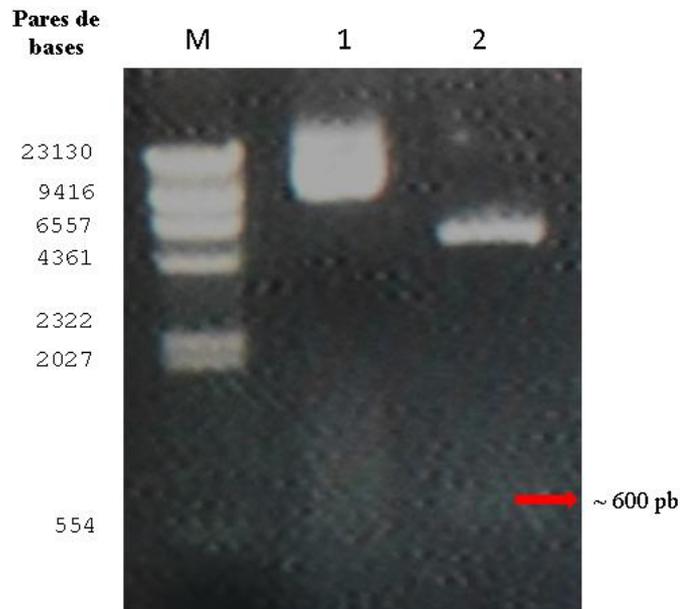
3.4 Resultado e discussão

3.4.1 Obtenção do fragmento gênico *CpOsm*

Durante o processo de construção dos vetores recombinantes, foi realizada uma extração do DNA plasmidial do vetor pET303::*CpOsm* previamente clonado por Oliveira (2014). Esse vetor, forneceu a região codificadora para amplificação do gene *CpOsm*. Células de *E. coli* DH5 α transformadas com o vetor pET303::*CpOsm* foram inoculadas em meio LB sólido suplementado com carbenicilina (50 $\mu\text{g/mL}$) e estreptomicina (30 $\mu\text{g/mL}$) e mantidas a 37 °C. Após 16 horas de incubação das células, foi observado um abundante crescimento de colônias bem isoladas.

As colônias foram transferidas para o meio LB líquido com os mesmos agentes seletivos e mantidas a 37 °C por 16 horas e, logo em seguida, tiveram seu DNA plasmidial extraído. Para confirmar que as células estavam verdadeiramente transformadas, foram realizadas digestões com as enzimas XhoI e XbaI, para a retirada do fragmento de aproximadamente 609 pb referente ao gene da osmotina (Figura 13).

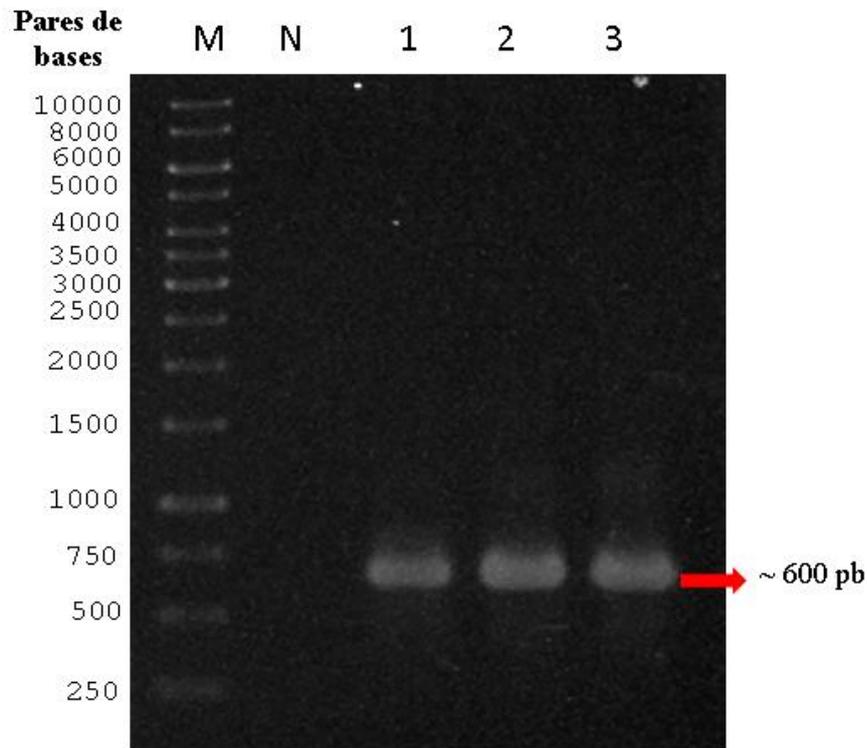
Figura 13 – Comprovação da presença do fragmento gênico CpOsm. Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto de digestão dos plasmídeo pET303::CpOsm. O poço M contém o marcador λ -DNA/*Hind*III (200 ng); o poço 1 contém o DNA plasmidial do vetor pET303::CpOsm íntegro; o poço 2 contém DNA plasmidial do vetor pET303::CpOsm digerido com as enzimas de restrição *Xho*I e *Xba*I.



Fonte: elaborada pelo autor.

Após o resultado positivo, foi realizada uma PCR com a enzima polimerase de alta fidelidade, utilizando os iniciadores CpOsmTb*Xba*I e CpOsmTb*Bgl*III. Esses iniciadores forneceram um sítio de clivagem para as enzimas de restrição *Xba*I e *Bgl*III, que são enzimas compatíveis com o múltiplo sítio de clonagem do vetor pUCRBC-1. O resultado exibiu um fragmento de aproximadamente 609 pb, corroborando com o resultado obtido na digestão (Figura 14).

Figura 14 – Obtenção do fragmento gênico CpOsm por PCR. Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto da PCR utilizando *primers* específicos para o gene CpOsm. O poço M contém o marcador de peso molecular DNA Ladder 1 kb, o poço N contém o controle negativo da reação, nos poços 1-3 contém o produto de amplificação contendo concentrações crescentes de DNA plasmidial (30 ng, 40 ng e 50 ng, respectivamente).



Fonte: elaborada pelo autor.

Trabalhos relatam que entre as características conservadas das osmotinas estão peso molecular e tamanho do fragmento gênico. A osmotina de *C. procera* já foi estudada quanto ao peso molecular, a proteína nativa possui de aproximadamente 22 kDa. Além disso, foi realizada a clonagem e o sequenciamento do gene que amplifica essa proteína, mostrando que o mesmo é composto por 609 pb (FREITAS et al., 2011a; RAMOS et al., 2015). Dessa forma, podemos observar que os fragmentos obtidos por PCR e digestão com enzimas de restrição corroboram com os resultados presente na literatura.

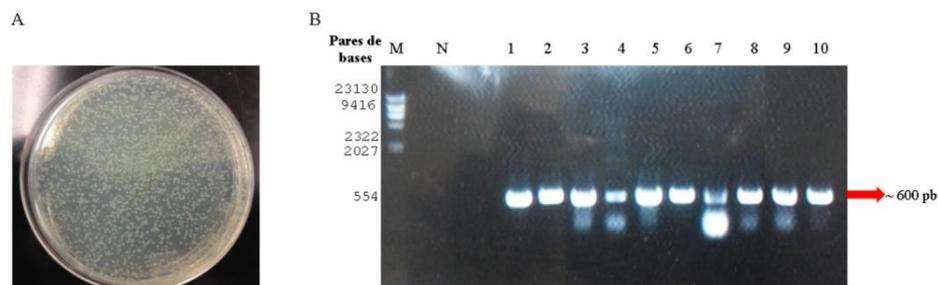
3.4.2 Obtenção de células de *E. coli* transformadas com o vetor pUCRBC-1::CpOsm

Uma das etapas intermediárias do projeto foi a clonagem do gene CpOsm no vetor pUCRBC-1. Essa etapa foi necessária para a formação do cassete de expressão que posteriormente foi introduzido no vetor binário pBINPLUS.

Para realização da subclonagem do inserto CpOsm proveniente do produto de PCR no vetor pUCRBC-1, realizou-se uma digestão de ambos os materiais com as enzimas de restrição *XbaI* e *BglIII*. Em seguida, o material passou por uma reação de ligação seguido de eletroporação em células de *E. coli* DH5 α , resultando na produção inúmeras colônias. Dez colônias foram selecionadas e o seu DNA foi extraído e utilizado como molde em uma reação de PCR. O resultado constatou que os dez clones testados amplificaram positivamente o fragmento gênico CpOsm, ocorrendo a formação de uma banda com peso molecular correspondendo ao tamanho esperado (Figura 15).

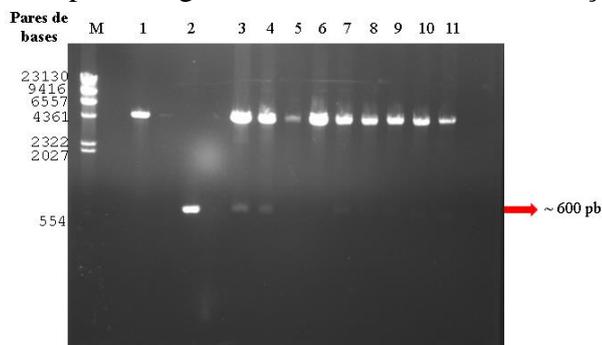
Após a PCR, os produtos de DNA dos clones foram digeridos com *XbaI* e *BglIII*, como uma forma adicional para confirmar a inserção do gene CpOsm no vetor de clonagem pUCRBC-1. Esse ensaio corroborou com os dados obtidos no experimento da PCR. Dessa forma, o produto da digestão apresentou os seguintes fragmentos: um fragmento de 4645 pb, correspondente ao pUCRBC-1, e outro fragmento possuindo 609 pb, correspondente à sequência codificadora do gene CpOsm (Figura 16).

Figura 15 – Produção do vetor recombinante pUCRBC-1::CpOsm. A) Colônias de *E. coli* DH5 α transformadas com o vetor pUCRBC-1::CpOsm crescendo em meio LB com agentes seletivos, B) Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto da PCR utilizando primers específicos para o gene CpOsm, onde o poço M contém o marcador o marcador λ -DNA/*HindIII* (200 ng), o poço N contém o controle negativo da reação, nos poços 1-10 contém o produto de amplificação do DNA plasmidial de diferentes colônias de *E. coli* DH5 α transformadas com o vetor recombinante.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 16 – Confirmação da produção do vetor recombinante pUCRBC-1::CpOsm. Eletroforese em gel de agarose 1% dos plasmídeos obtidos. O poço M contém o marcador λ -DNA/*Hind*III (200 ng); o poço 1 contém o DNA plasmidial do vetor pUCRBC-1 íntegro; o poço 2 contém o produto de amplificação do gene CpOsm, os poços 3-11 DNA plasmidial do vetor pUCRBC-1::CpOsm digerido com as enzimas de restrição *Xba*I e *Bgl*III.



Fonte: elaborada pelo autor.

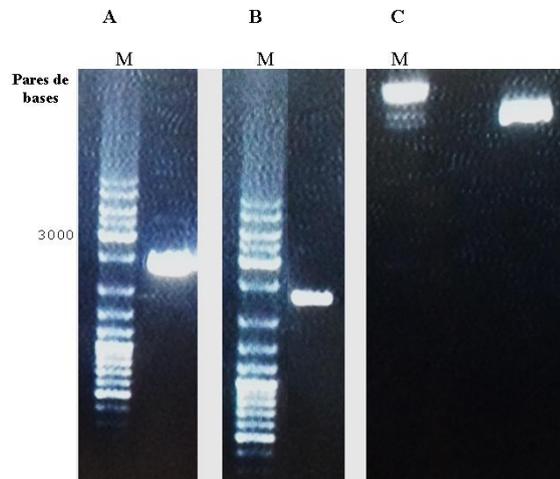
3.4.3 Obtenção do cassete de expressão *RBC-1::CpOsm* e clonagem do vetor *RBC-1::CpOsm::pBINPLUS* em *E. coli*

Após a confirmação da produção do vetor recombinante pUCRBC-1::CpOsm, realizou-se a extração do DNA plasmidial de uma das colônias obtidas. No intuito de gerar o vetor binário recombinante.

Para a confecção do vetor binário recombinante, realizamos a inserção do cassete de expressão do gene da RuBisCo (*RBC-1::CpOsm*), presente no vetor recombinante pUCRBC-1::CpOsm. O cassete de expressão consistia de um fragmento gênico de 2542 pb, sendo formado pelo gene promotor (1015 pb), pelo gene da CpOsm (609 pb) e pelo gene terminador (918 pb). As enzimas de restrição apropriadas para a retirada do cassete de expressão foram a *Hind*III e *Eco*RI, estas possuem compatibilidade com o múltiplo sitio de clonagem do vetor binário pBINPLUS. Após a clivagem do vetor recombinante pUCRBC-1::CpOsm, ocorria a formação de dois fragmentos de tamanhos similares: o cassete de expressão da RuBisCo com o gene CpOsm e o restante do vetor .

Posteriormente a clivagem, realizou-se uma separação em gel de eletroforese, para que ocorra a seleção específica do fragmento desejado. Porém essa metodologia não foi viável devido à similaridade do entre o tamanho dos fragmentos gerados (Figura 17).

Figura 17 – Separação do fragmento RBC::CpOsm em gel de agarose. Eletroforese em gel de agarose 0,5 % (A), 1% (B) e 2,5% (C) do plasmídeo pUCRBC1::CpOsm tratado com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*



Fonte: elaborada pelo autor.

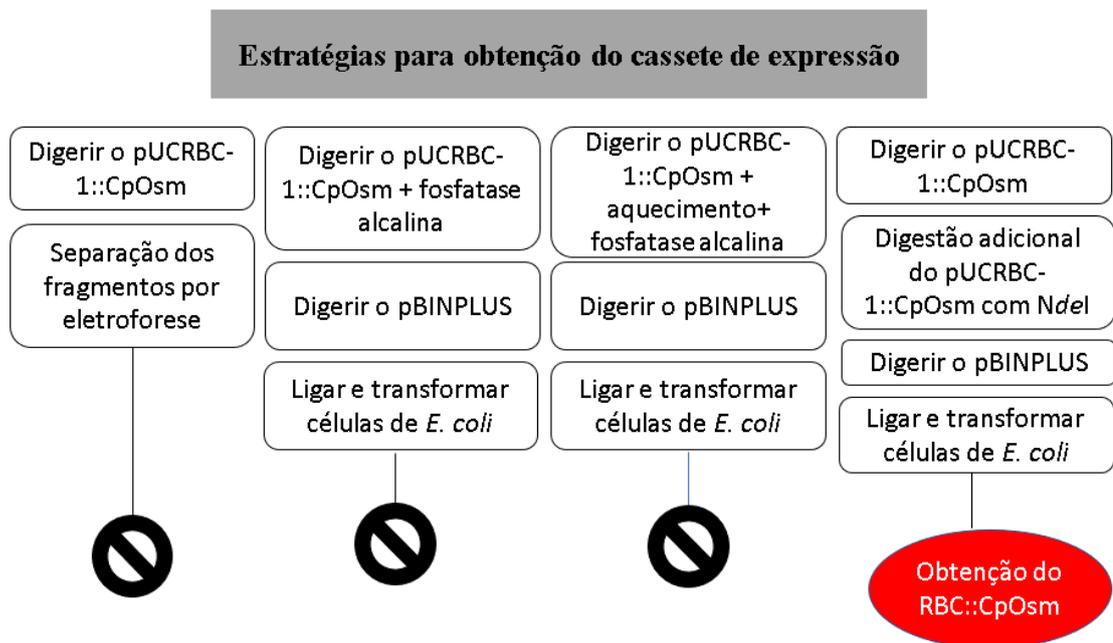
Como forma alternativa para a obtenção do cassete de expressão RBC1::CpOsm foram realizadas outras metodologias. As metodologias utilizadas foram: 1- digestão do pUCRBC1::CpOsm com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* realizando um tratamento com fosfatase, seguido de ligação do produto purificado com o vetor binário pBINPLUS previamente digerido; 2- digestão do pUCRBC1::CpOsm com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, aquecimento do produto obtido, seguido de um tratamento com fosfatase alcalina e posterior ligação do produto purificado com o vetor binário pBINPLUS previamente digerido; 3- digestão do pUCRBC1::CpOsm com as enzimas de restrição *EcoRI*, *HindIII* e *NdeI* seguido de ligação do produto purificado com o vetor binário pBINPLUS previamente digerido. A Figura 6 resume as estratégias utilizadas.

Das metodologias realizadas, apenas a última citada foi viável na produção de colônias transformadas. A clivagem do vetor pUCRBC-1::CpOsm com as enzimas *EcoRI*, *HindIII* e *NdeI* proporcionou três fragmentos gênicos: o cassete de expressão que possuía extremidades compatíveis com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*, um pequeno fragmento que foi clivado pelas enzimas *EcoRI* e *NdeI* e o último fragmento que foi clivado pela *HindIII* e *NdeI*. Dessa forma, foi realizada uma seleção na qual apenas o cassete de expressão possuía regiões compatíveis com o múltiplo sítio de clonagem (Figura 18).

Após a clivagem do pUCRBC-1::CpOsm digerido com as enzimas de restrição *EcoRI*, *HindIII* e *NdeI* foi realizado uma reação de ligação com o plasmídeo pBINPLUS previamente digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*. Logo em seguida, o produto da reação

foi eletroporado em células de *E. coli* DH5 α . Após 16 horas da inoculação em meio específico, houve a formação de inúmeras colônias (Figura 8). Cinco colônias foram selecionadas e o seu DNA foi extraído e utilizado em uma reação de digestão com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*, para confirmar a transformação. O resultado da reação mostrou que os clones testados produziram dois fragmentos de tamanho esperado, um fragmento referente ao plasmídeo pBINPLUS e outro referente ao RBC-1::CpOsm (Figura 19).

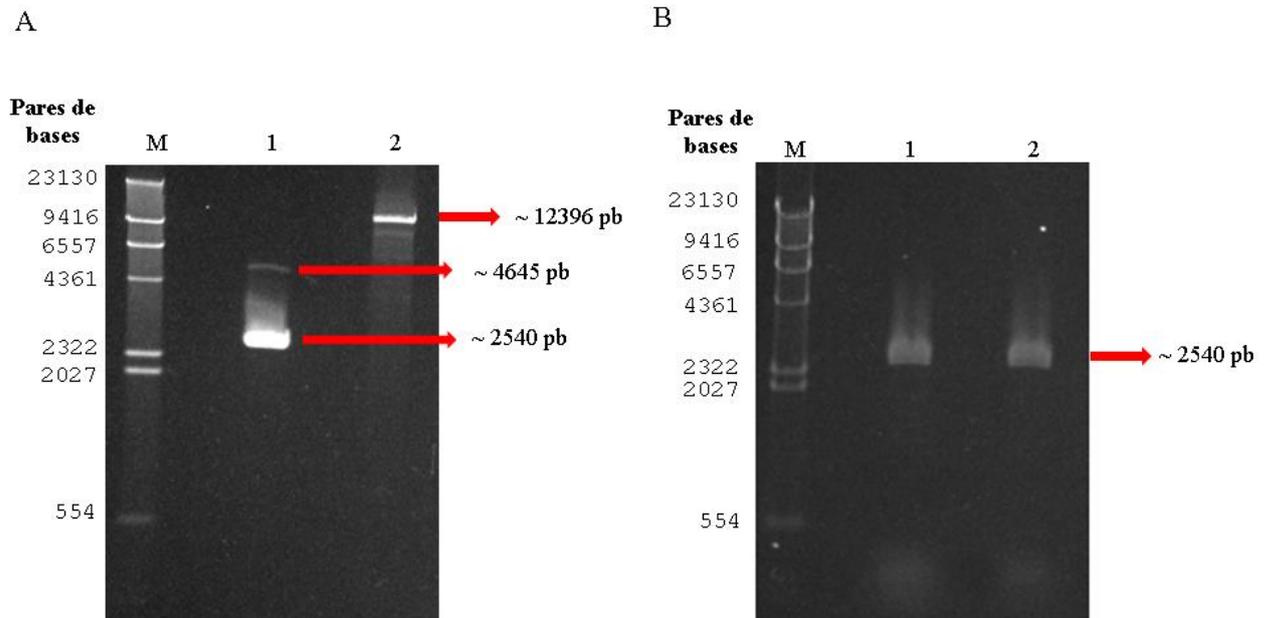
Figura 18 – Estratégias utilizadas para obtenção de células de *E. coli* transformadas com o vetor recombinante pBINPLUS::RBC-1::CpOsm



OBSERVAÇÃO: As enzimas de restrição usadas na digestão foram a *EcoRI* e *HindIII*

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 19 – Obtenção do fragmento gênico RBC-1::CpOsm. A) Eletroforese em gel de agarose 1% dos plasmídeos pUCRBC-1::CpOsm(poço 1) e pBINPLUS (poço 2) digeridos com as enzimas de restrição EcoRI e HindIII; B) Eletroforese em gel de agarose 1% do plasmídeo pUCRBC-1::CpOsm (poço 1 e 2) digerido com as enzimas de restrição EcoRI, HindIII e NdeI. O poço M contém o marcador λ -DNA/HindIII (200 ng).



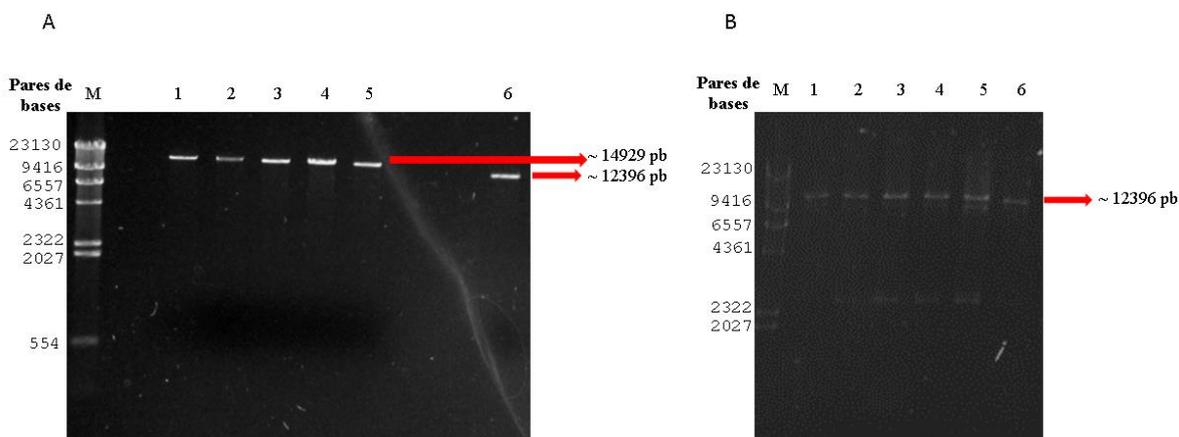
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 20 – Produção do vetor recombinante pBINPLUS::RBC-1::CpOsm. Placa contendo colônias de *E. coli* DH5 α transformadas com o vetor pBINPLUS::RBC-1::CpOsm crescendo em meio LB com agentes seletivos.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 21 – Confirmação da produção do vetor binário recombinante pBINPLUS::RBC-1::CpOsm. A) Eletroforese em gel de agarose 1% com produto de digestão dos plasmídeo RBC-1::CpOsm::pBINPLUS; poço de 1-5 são colônias aparentemente transformadas com o vetor recombinante; no poço 6, colônia transformada com pBINPLUS, todas as amostras foram digeridas com *Xba*I; B) Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de digestão dos plasmídeo RBC-1::CpOsm::pBINPLUS. Poço de 1 contém o vetor pBINPLUS, 2-6 são colônias aparentemente transformadas com o vetor recombinante, ambos os vetores foram digeridos com *Hind*III/*Eco*RI. O poço M contém o marcador λ -DNA/*Hind*III (200 ng)



Fonte: elaborada pelo autor.

3.4.4 Transformação de células de *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor binário recombinante pBINPLUS::RBC-1::CpOsm

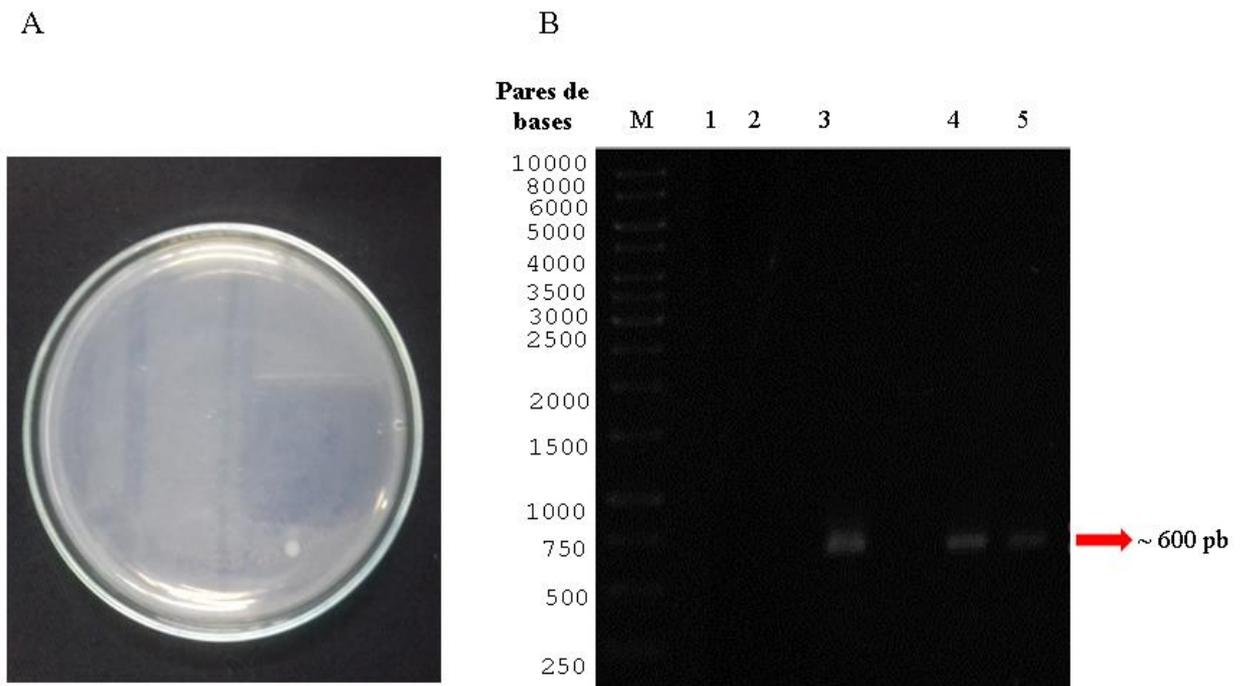
Após a transformação das células de *E. coli* DH5 α com o vetor pBINPLUS::RBC-1::CpOsm, selecionou-se uma das colônias para a realização de uma midipreparação. Após a extração, eletroporou-se o plasmídeo em células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 por eletroporação, conforme já descrito na metodologia. Nessa etapa, utilizou-se o vetor binário recombinante (pBINPLUS::RBC-1::CpOsm), o vetor binário íntegro (pBINPLUS) e células eletroporadas com água como o controle da reação.

As células eletroporadas de *A. tumefaciens* quando inoculadas em meio YM contendo 50 mg/L de estreptomicina e 50 mg/L de canamicina, gerando colônias após aproximadamente 48 horas de inoculação. No controle da transformação, onde as células foram eletroporadas apenas na presença de água, não foi observada a formação de colônias. Apenas duas colônias transformadas com o vetor recombinantes pBINPLUS::RBC-1::CpOsm e duas colônias transformadas com o vetor íntegro 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* específicos para o gene CpOsm. O produto da reação de amplificação, foi aplicado em gel de agarose 1% e observou-se que os dois clones transformados com o vetor recombinantes pBINPLUS::RBC-1::CpOsm apresentaram amplificação de um fragmento compatível com os 609 pb do gene CpOsm e os clones transformados com o plasmídeo pBINPLUS não amplificaram o gene CpOsm (Figura 22).

Figura 22 – Transformação de células de *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor binário.

A) Colônias de *A. tumefaciens* transformadas com o vetor pBINPLUS::RBC-1::CpOsm crescendo em meio YM com agentes seletivos; B) Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto da PCR utilizando primers específicos para o gene CpOsm, o poço M contém o marcador de peso molecular DNA Ladder 1 kb, o poço 1 contém o controle negativo da reação, o poço 2 contém o produto de amplificação com o vetor binário pBINPLUS, o poço 3 contém o produto da amplificação do vetor binário recombinante extraído de *E. Coli*; os poços 4 e 5 contém o produto de amplificação do vetor binário recombinante de diferentes colônias de *A. tumefaciens*.



Fonte: elaborada pelo autor.

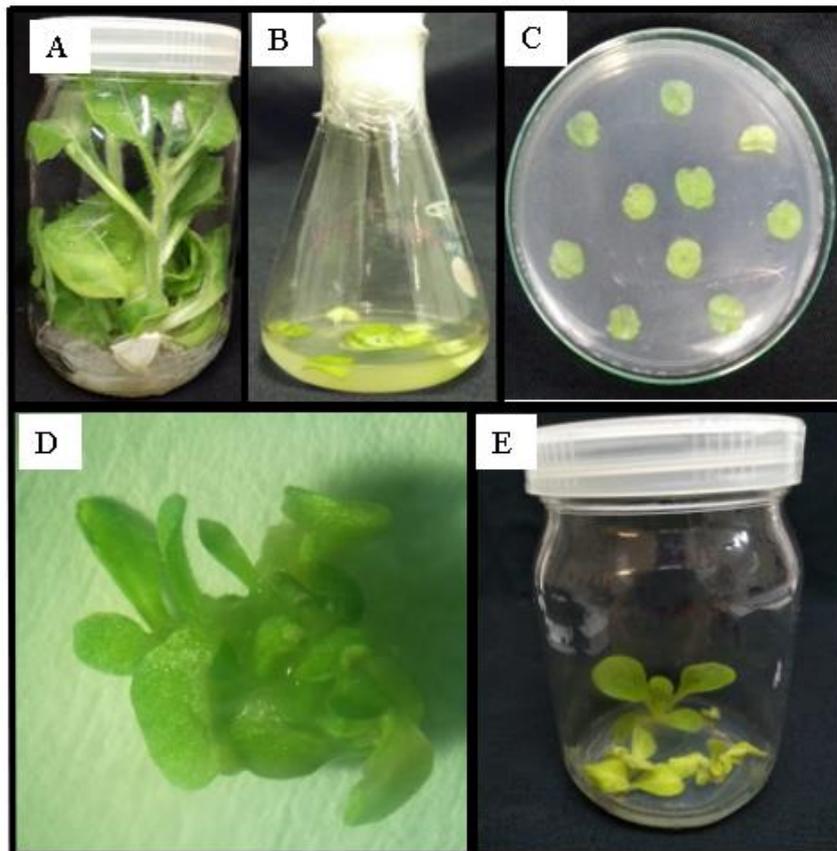
Após a confirmação da transformação das células *A. tumefaciens* com o vetor recombinante e o vetor íntegro, essas foram multiplicadas em um abundante volume de meio YM para iniciar o processo de co-cultivo da *A. tumefaciens* com a *Nicotiana tabacum*.

Segmentos foliares de *N. tabacum* var. Xanthi, foram co-cultivados em dois tratamentos com *A. tumefaciens*: colônias portando o plasmídeo pBINPLUS::RBC-1::CpOsm e colônias portando pBINPLUS. Além desses tratamentos, discos foliares foram tratados na ausência da

A. tumefaciens. Após o co-cultivo, os explantes foram mantidos em meio MS seletivo (adicionado de BAP, 500 mg/L de cefotaxima, 50 mg/L de canamicina e acetoseringona 100 μ M) para regeneração de plantas putativamente transgênicas. Ao final de seis 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 (meio MS sem regulador) suplementado 50 mg/L de canamicina (Figura 23).

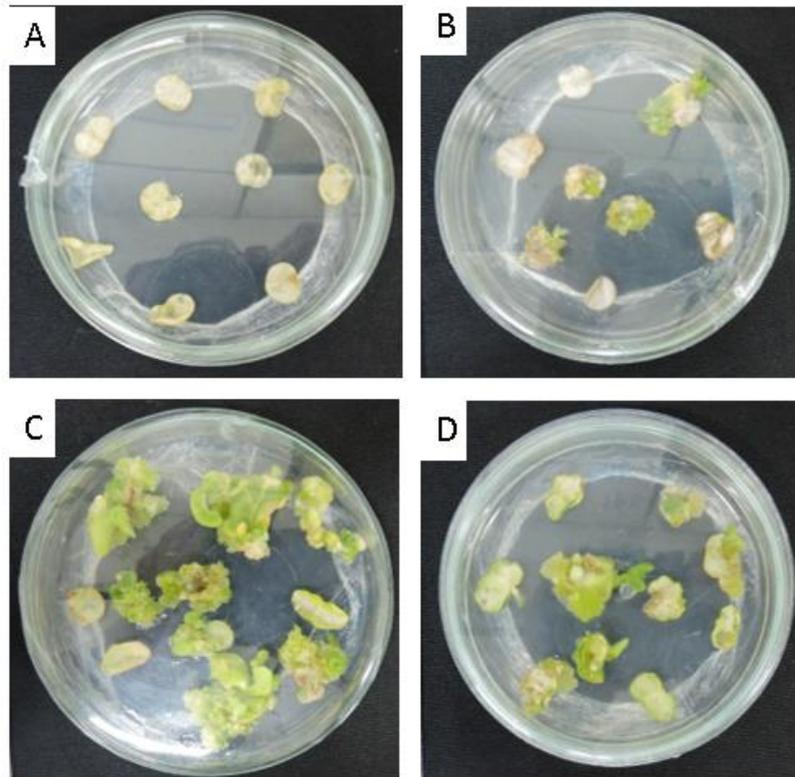
As etapas do processo de transformação das plantas de fumo foram ilustradas na Figura 11. Os brotos após 6 semanas do processo de co-cultivo foram ilustrados na Figura 12. Plantas com quatro semanas crescendo em meio de enraizamento foram ilustradas na Figura 24.

Figura 23 – Etapas do experimento de transformação genética de plantas de *Nicotiana tabacum*. (A) plantas de fumo micropropagada *in vitro* com 6 semanas do subcultivo; (B) discos foliares co-cultivados em suspensão de células de *Agrobacterium tumefaciens* transformada com os vetores pBINPLUS e RBC::CpOsm::pBINPLUS; (C) discos foliares cultivados em meios MS suplementado com BAP 1mg/L + canamicina+ cefotaxima; (D) brotos formados em meio seletivo; (E) plantas cultivadas em meio MS suplementado com canamicina após 3 semanas da inoculação.



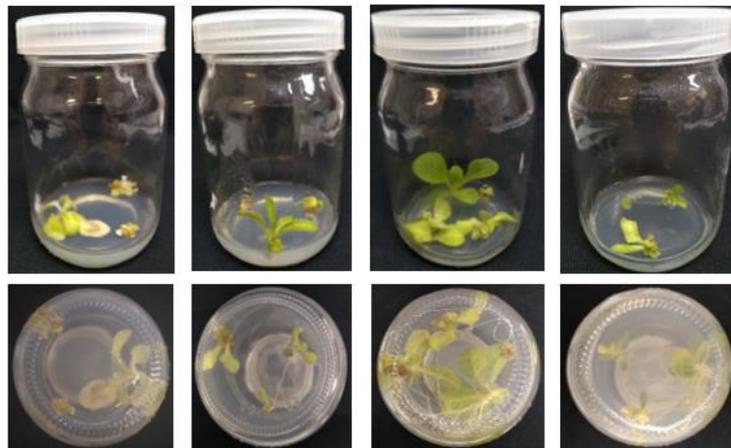
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 24 – Transformação de explantes de *Nicotiana Tabacum*. Explantes de *Nicotiana tabacum* não transformados crescendo em meio MS + BAP + canamicina (A) e em meio MS + BAP (B) e explantes transformados com o vetor pBINPLUS (C) e com o vetor RBC-1::CpOsm::pBINPLUS(D).



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 25 – Plantas de *Nicotiana tabacum* não transformados crescendo em meio MS + BAP + canamicina (A e E) e em meio MS + BAP (B e F) e explantes transformados com o vetor pBINPLUS (C e G) e com o vetor RBC-1::CpOsm::pBINPLUS (d e h).



Fonte: elaborada pelo autor.

Após as seis semanas de cultivo dos explantes transformados com *A. tumefaciens* em meio seletivo, pode-se observar que houve uma redução na taxa de regeneração e processo de formação de raízes quando comparado os explantes do tratamento controle. Os explantes controle formaram cerca de seis vezes brotos que os transformados e apresentaram quase o triplo do número de raiz. Porém os explantes que passaram pelo processo de co-cultivo com *A. tumefaciens* apresentaram a formação de calos sendo essa estrutura ausente nos explantes controle (Tabela 1).

A metodologia de confeccionar linhagens recombinantes de *A. tumefaciens* em que o T-DNA nativo é substituído por genes de interesse, são as estratégias eficientes e viáveis para a introdução de genes exógenos em plantas. Essa técnica, apresenta boa eficiência e baixo custo operacional, além de inserir um baixo número de cópias do transgenes que evita o silenciamento do mesmo e maior estabilidade na expressão em comparação com a biobalística (TRAVELLA *et al.*, 2005, CITOVSKY *et al.*, 2007).

Tabela 1 – Respostas dos explantes de fumo (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) submetidos aos tratamentos e cultivados por quatro semanas em meio de indução de brotos (sais e vitaminas MS, sacarose 3,0 %, ágar 0,7 %, 1,0 mg/l de BA) acrescido de 500 mg/l de cefotaxima e 100 mg/l de canamicina (meio seletivo) ou desprovido de antibióticos (meio não-seletivo)

Tratamentos	Explantes com formação de brotos (%)	Explantes com formação de raízes (%)	Explantes com formação de calos(%)
C-	0,0c	0,0c	0,0b
C+	95,0a	85,0a	0,0b
pBINPLUS	15,0b	30,0b	30,0a
pBINPLUS::RBC-1::CpOsm	15,0b	30,0b	30,0a

C- (controle positivo): plantas de fumo não transformadas em meio seletivo.

C+ (controle positivo): plantas de fumo não transformadas em meio sem antibiótico.

pBINPLUS: plantas transformadas com *A. tumefaciens* com o vetor pBINPLUS cultivadas em meio seletivo.

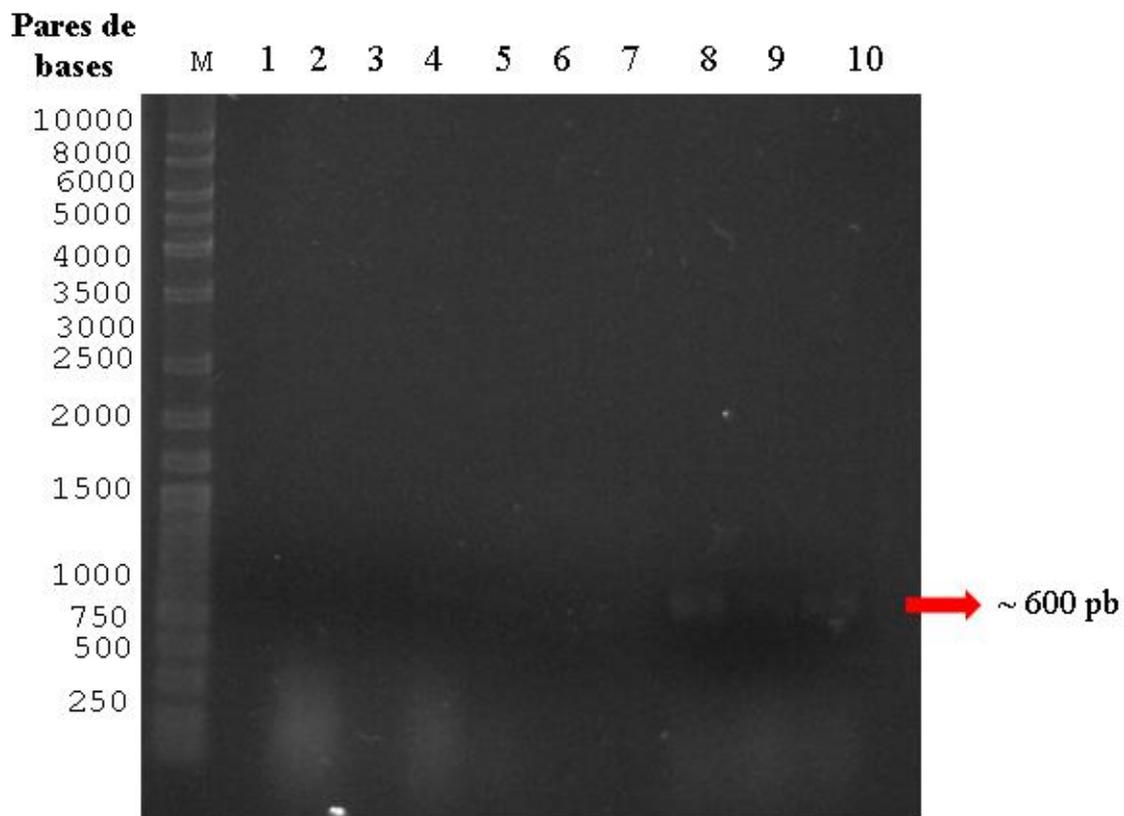
pBINPLUS::RBC-1::CpOsm: plantas transformadas com *A. tumefaciens* com o vetor pBINPLUS::RBC-1::CpOsm cultivadas em meio seletivo.

Fonte: elaborada pelo autor.

3.4.5 Análise da expressão e transcrição do gene *CpOsm* em plantas transformadas

No intuito de confirmar a eficiência da transformação, a etapa seguinte de confirmação da transformação consistiu na extração de DNA genômico dos clones enraizados em meio seletivo e as plantas do grupo controle não transformada. 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 1% resultando em bandas correspondentes ao tamanho do fragmento do gene *CpOsm* (609 pb). Os clones do tratamento controle não tiveram seu DNA amplificado com os iniciadores específicos para *CpOsm* como já era esperado (Figura 26). Foram produzidas três linhagens de plantas transformadas confirmadas por PCR que foram chamadas de T4-B-7, T4-C-3 e T4-C-8.

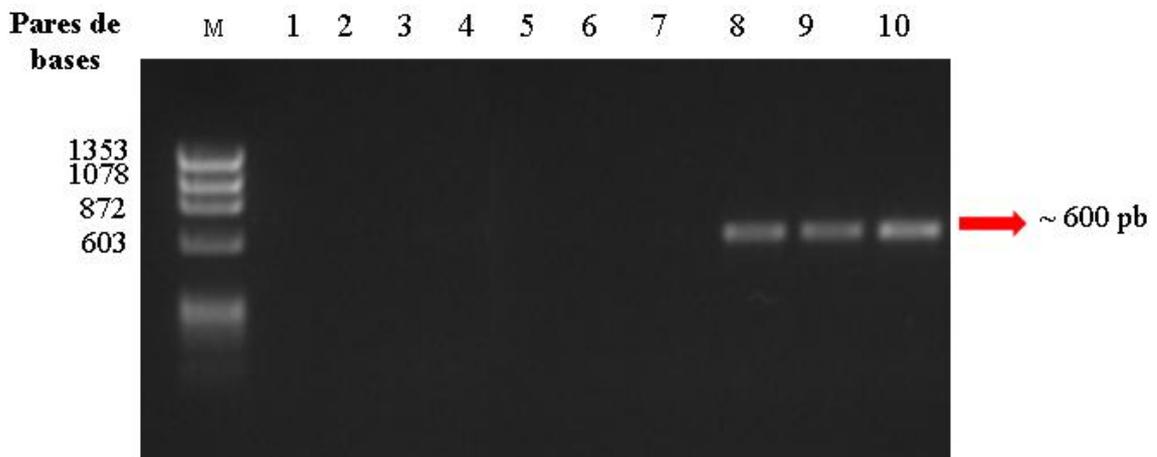
Figura 26 – Confirmação da presença do gene *CpOsm* em plantas de *N. tabacum* transformadas. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR amplificados a partir do DNA genômico extraído de plantas de fumo transformadas com pBINPLUS::RBC-1::CpOsm. Poço M: Marcador; Poço 1: controle negativo da reação; Poços 2 ao 4: produtos de clones do tratamento controle (T2-B-1, T2-B-2, T2-C-8), os poços 5-7: produto dos clones do tratados com o vetor pBINPLUS (T3-B-3, T3-B-8, T3-E-1), os poços 8-10: produto dos clones tratados com o recombinante pBINPLUS::RBC-1::CpOsm (T4-B-7, T4-C-3, T4-C-8).



Fonte: elaborada pelo autor.

Após a confirmação da presença do gene CpOsm nos clones T4-B-7, T4-C-3 e T4-C-8, a etapa seguinte consistiu na extração de RNA e síntese de cDNA para avaliar a produção de transcritos do gene CpOsm nas plantas transformadas e controle. O cDNA obtido foi usado como molde em uma reação de amplificação com iniciadores específicos. Os produtos da RT-PCR foram aplicados em eletroforese em gel de agarose 1% resultando em bandas correspondentes ao tamanho do fragmento do gene CpOsm (609 pb). Os clones dos tratamentos controle não apresentaram seu cDNA amplificado com os iniciadores específicos para CpOsm como já era esperado (Figura 27). Dessa forma, foi observado que os clones que passaram pelo processo de confirmação da presença do gene, são capazes de produzir transcritos de RNA.

Figura 27 – Confirmação da transcrição do gene CpOsm em plantas e *N. tabacum* transformadas. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR amplificados a partir do cDNA extraído de plantas de fumo transformadas com pBINPLUS::RBC-1::CpOsm. Poço M: Marcador; Poço 1: controle negativo da reação; Poços 2 ao 4: produtos de clones do tratamento controle (T2-B-1, T2-B-2, T2-C-8), os poços 5-7: produto dos clones do tratados com o vetor pBINPLUS (T3-B-3, T3-B-8, T3-E-1), os poços 8-10: produto dos clones tratados com o recombinante pBINPLUS::RBC-1::CpOsm (T4-B-7, T4-C-3, T4-C-8).



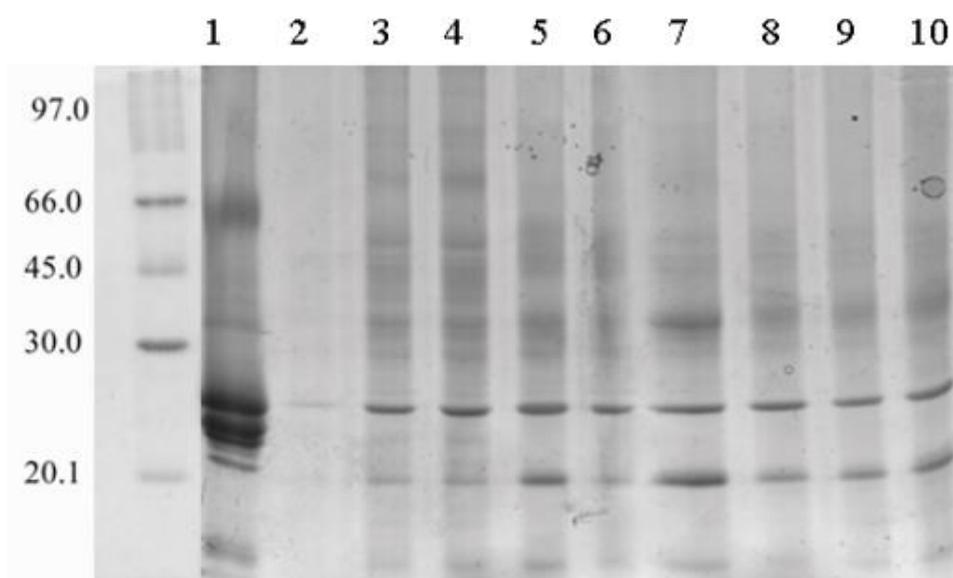
Fonte: elaborada pelo autor.

3.4.6 Avaliar a presença da proteína em plantas transformadas e sua função biológica *in vitro*

3.4.6.1 Avaliação da presença da proteína recombinante

Após a confirmação da transformação dos clones *N. tabacum* por PCR e a observação da produção de transcritos do gene CpOsm por RT-PCR, foi realizada uma extração de proteínas das folhas de *N. tabacum*. Essa extração possui o intuito de traçar o perfil proteico por SDS-PAGE (Figura 28). O perfil proteico das plantas transformadas não apresentou uma diferença em relação ao tratamento controle. É válido observar a presença de uma banda na altura aproximada de 20 kDa. As osmotinas são uma família de proteínas que apresentam peso molecular similar, sabe-se que plantas de *N. tabacum* possuem uma osmotina identificada com peso molecular 26 kDa sendo um valor aproximado aos da osmotina de *C. procera* que é de aproximadamente 22 kDa (SINGH et al., 1987; FREITAS et al., 2011a), devido essa aproximação a técnica eletroforese unidimensional não se mostra eficiente para identificar as proteínas.

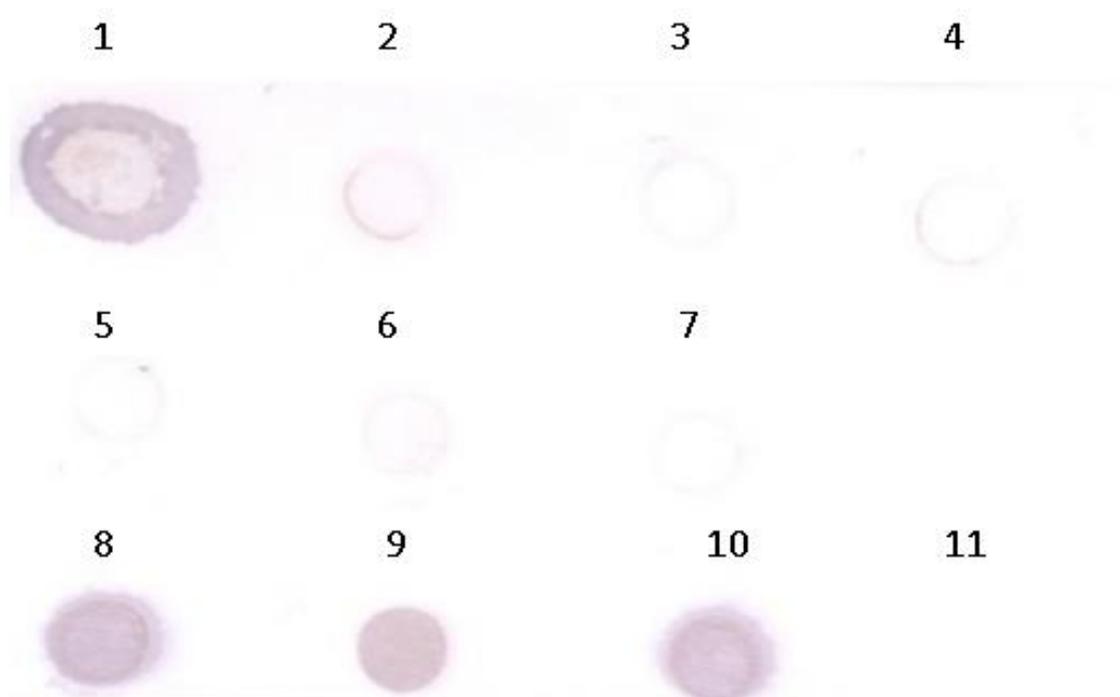
Figura 28 – Perfil proteico de plantas e *N. tabacum* transformadas. Eletroforese em gel de acrilamida das proteínas totais extraídas de plantas de fumo transformadas com pBINPLUS::RBC-1::CpOsm. Poço 1: proteínas do látex de *Calotropis procera*; Poços 2 ao 4: produtos de clones do tratamento controle (T2-B-1, T2-B-2, T2-C-8), os poços 5-7: produto dos clones do tratados com o vetor pBINPLUS (T3-B-3, T3-B-8, T3-E-1), os poços 8-10: produto dos clones tratados com o recombinante pBINPLUS::RBC-1::CpOsm (T4-B-7, T4-C-3, T4-C-8).



Fonte: elaborada pelo autor.

Em busca de obter um resultado consistente sobre a presença da osmotina de *C. procera*, foram realizados ensaios de imunodeteção. Para esses ensaios, foi utilizado um anticorpo policlonal anti-CpOsm produzidos em coelho. As técnicas realizadas foram o *Dot blotting* e *Western blotting*. Os resultados apontam uma pequena discordância, já que na técnica de *Dot blotting* houve um forte reconhecimento do anticorpo nos três clones confirmados pelas técnicas moleculares (T4-B-7, T4-C-3, T4-C-8). No ensaio de *Western blotting* apenas o clone T4-B-7 foi reconhecido pelo anticorpo.

Figura 29 – Confirmação da presença da proteína CpOsm em plantas e *N. tabacum* transformadas. Dot blotting para a detecção da proteína CpOsm utilizando o anticorpo policlonal anti-CpOsm. Amostra 1: proteínas do látex de *Calotropis procera*; Amostras 2 ao 4: produtos de clones do tratamento controle (T2-B-1, T2-B-2, T2-C-8); amostras 5-7: produto dos clones do tratados com o vetor pBINPLUS (T3-B-3, T3-B-8, T3-E-1), amostra 8-10: produto dos clones tratados com o recombinante pBINPLUS::RBC-1::CpOsm (T4-B-7, T4-C-3, T4-C-8), amostra 11: apenas tampão acetato de sódio 50 mM.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 30 – Confirmação da presença da proteína CpOsm em plantas e *N. tabacum* transformadas. Western blotting para a detecção da proteína CpOsm utilizando o anticorpo policlonal anti-CpOsm. Amostra 1: proteínas do látex de *Calotropis procera*; Amostras 2 ao 4: produto dos clones tratados com o recombinante pBINPLUS::RBC-1::CpOsm (T4-B-7, T4-C-3, T4-C-8); amostras 5-7: produto dos clones do tratados com o vetor pBINPLUS (T3-B-3, T3-B-8, T3-E-1), amostra 8-10: produtos de clones do tratamento controle (T2-B-1, T2-B-2, T2-C-8).



Fonte: elaborada pelo autor.

3.4.6 2 Avaliação do potencial antifúngico das proteínas totais extraídas das folhas de plantas de tabaco

Para avaliar o efeito das proteínas do *N. tabacum* transformadas e controle sob fungos fitopatogênicos foram abordadas duas metodologias. Uma metodologia qualitativa, na qual foi observada a ação sobre a germinação dos esporos após a incubação de 14 horas com os extratos proteicos. E uma metodologia quantitativa através da turbidimetria, realizando um acompanhamento do crescimento micelial dos fungos quando incubado por 48 horas em contato

com o extrato proteico. Para os ensaios, foram testados dois fungos do gênero *Fusarium*: o *F. tuiense* e o *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

Os resultados mostram que todas as amostras possuíram um efeito sobre a germinação e o crescimento micelial dos fungos testados (Figura 19 e Figura 20). Porém as amostras das plantas transformadas com o gene CpOsm, apresentaram uma porcentagem significativamente maior na inibição de crescimento micelial dos fungos, quando comparada com as proteínas extraídas do tratamento controle não transformadas e pBINPLUS. O incremento na porcentagem de inibição de crescimento foi de 13% para o fungo *F. tuiense* e de 11% para *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

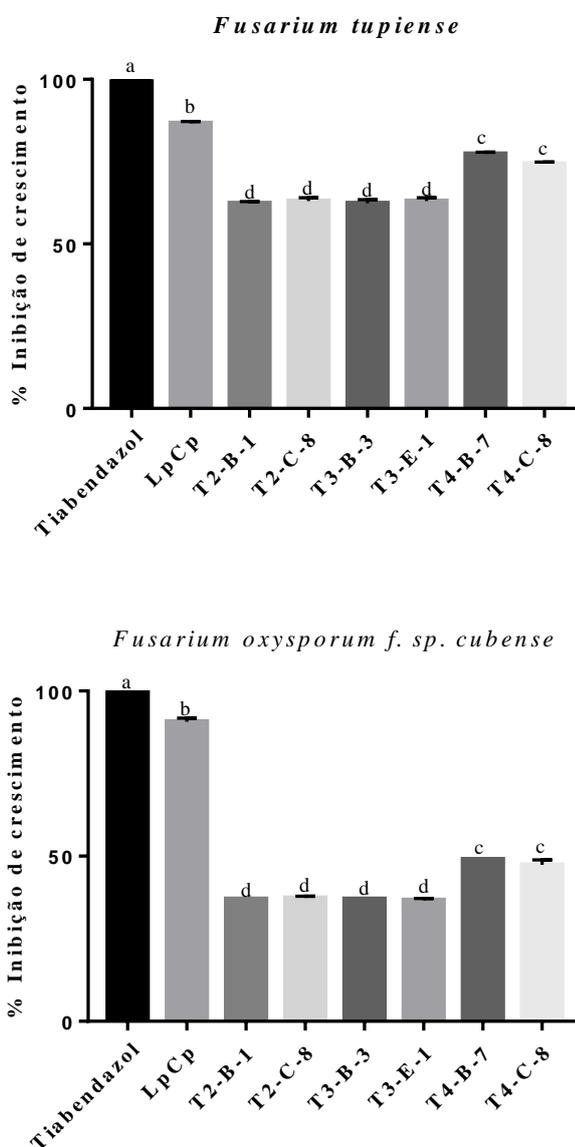
As osmotinas são classificadas como proteínas relacionadas a defesa vegetal e existem relatos na literatura sobre a função dessa proteína na proteção contra fungos fitopatogênicos. Em relação ao efeito da osmotina de *C. procera* sobre fitopatôgenos, sabe-se que ela possui a capacidade de inibir o crescimento micelial e a germinação de vários fungos como *Fusarium solani*, *Neurospora* sp. e *Colletotrichum gloeosporioides* (FREITAS et al., 2011a). Trabalho realizado por Ramos e colaboradores (2015), observou-se o efeito da CpOsm sobre o fungo *Fusarium solani* mostrando que essa proteína causa alterações morfológicas marcantes, causando a redução de cerca de 80% do tamanho do esporo do fungo.

De forma geral, a elucidação do mecanismo de ação das osmotinas sobre os fungos ainda é alvo de muitos estudos. Um provável mecanismo de ação dá-se pela interação da osmotina com proteínas específicas da membrana plasmática dos microrganismos e, por meio de transdução de sinais, levam à morte celular programada por induzir acúmulo de espécies reativas de oxigênio (NARASIMHAN et al., 2005), ou podem hidrolisar β -1,3-glucano (LAURENCE et al., 2003), componente da parede celular dos fungos. A capacidade das osmotinas em inibir o crescimento de hifas e a germinação de esporos é diretamente relacionada com o aumento da permeabilidade da membrana plasmática pela incapacidade das células manterem o gradiente de pH (VIKTOROVA et al., 2012).

Dessa forma, o aumento na atividade de inibição de crescimento micelial em amostras transformadas com a proteína recombinante, sugere um possível envolvimento da CpOsm no controle de fitopatógenos.

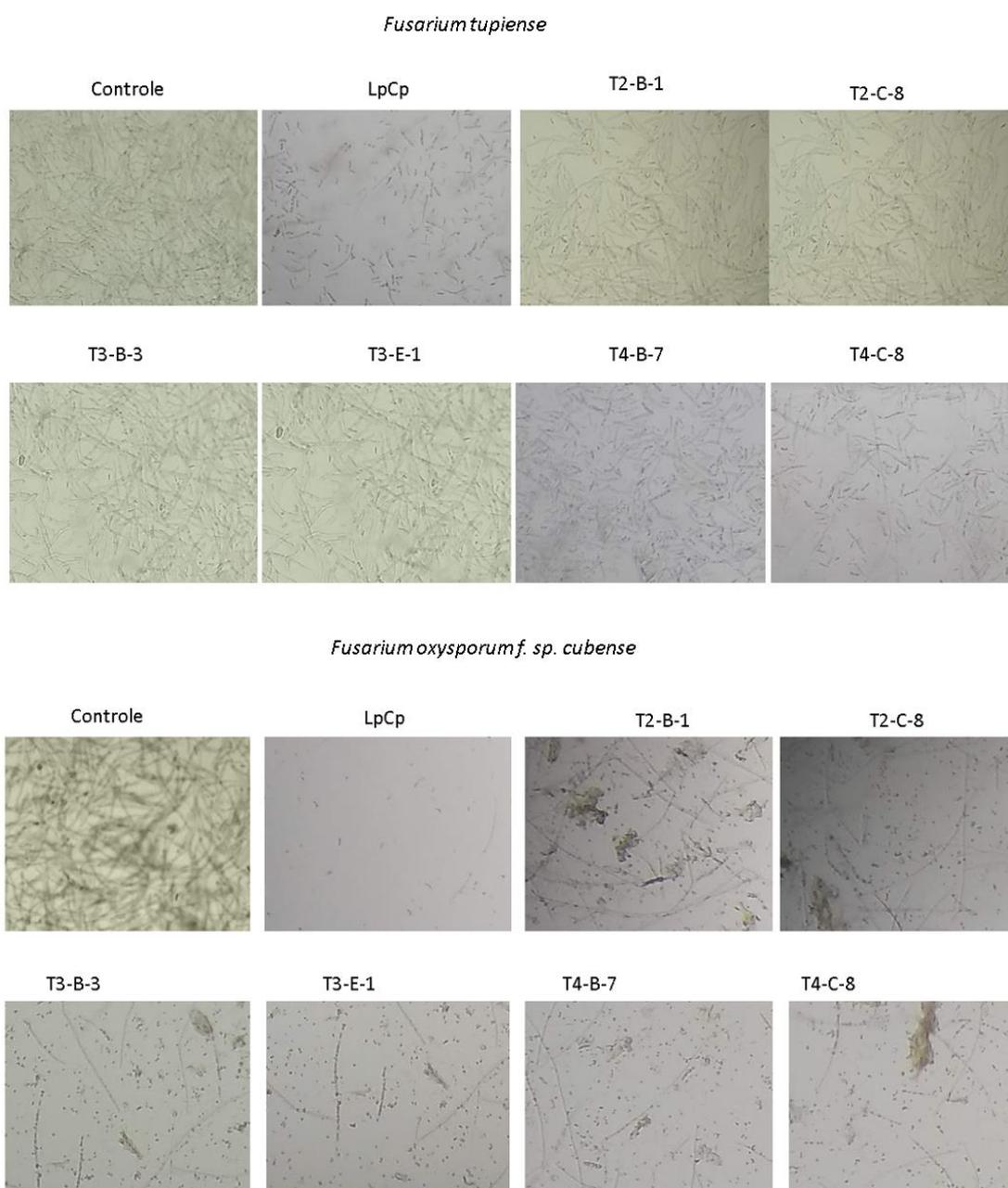
Figura 31 – Atividade antifúngica dos extratos proteicos de folhas de plantas de fumo. Controles do ensaio: tampão acetato de sódio 50 mM e peróxido de hidrogênio 500 mM. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de três determinações independentes.

Significância estatística foi avaliada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Legenda: CpLP, proteínas do látex de *C. procera*; T2-B-1 e T2-C-8, proteínas extraídas de plantas não transformadas; T3-B-3 e T3-E-1 proteínas extraídas de plantas transformadas com o vetor pBINPLUS; T4-B-7 e T4-C-8, proteínas extraídas de plantas transformadas com o vetor pBINPLUS::RBC-1::CpOsm



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 32 – Atividade antifúngica dos extratos proteicos de folhas de plantas de fumo. Controles do ensaio: tampão acetato de sódio 50 mM. Legenda: CpLP, proteínas do látex de *C. procera*; T2-B-1 e T2-C-8, proteínas extraídas de plantas não transformadas; T3-B-3 e T3-E-1 proteínas extraídas de plantas transformadas com o vetor pBINPLUS; T4-B-7 e T4-C-8, proteínas extraídas de plantas transformadas com o vetor pBINPLUS::RBC-1::CpOsm



Fonte: elaborada pelo autor.

3.4.6 3 Avaliação do estresse salino em plantas de fumo

Plantas *in vitro* transformadas com os vetores pBINPLUS, RBC-1::CpOsm::pBINPLUS e o tratamento controle foram usadas para o experimento. Elas foram padronizadas por idade (15 dias após o subcultivo), tamanho médio (3 cm de altura) e por número de folhas (média de 3 folhas por planta). Para a indução do estresse salino, as plantas foram cultivadas em meio MS suplementado com 3% de sacarose e 300 mM de NaCl, meio MS sem a adição de 300 mM de NaCl foi utilizado como grupo controle para todos os tratamentos.

Após uma semana de contato com o meio foi avaliado os seguintes fatores: tamanho da planta, número de folhas e a quantificação de prolina livre. Dos fatores avaliados, apenas a prolina mostrou diferença significativa entre os tratamentos testados, sendo que as plantas transformadas com o gene CpOsm produziram em maior quantidade quando comparada com as outras plantas. A Figura 21 mostra as plantas de *N. tabacum* após uma semana de contato com o meio MS + 300 mM de NaCl. A Figura 33 expõem os dados das análises realizadas com as plantas após o tratamento.

Em plantas o acúmulo de prolina ocorre em várias espécies em resposta ao estresse salino (COSTA *et al.*, 2003). Padrões semelhantes de produção de prolina foram encontrados em plantas de *N. tabacum* expostos a salinidade em trabalho realizado por Chen e colaboradores (2018).

A relação da osmotina com o estresse salino também é bastante estudada. A tolerância à salinidade conferida pela osmotina está ligada a sua ação como soluto compatível, sendo bastante útil para aumentar o potencial osmótico das células (VIKTOROVA *et al.*, 2012), fazendo dela um eficiente agente osmoprotetor.

A osmotina está associada ao aumento do acúmulo do aminoácido prolina (BARTHAKUR *et al.*, 2001). A prolina é considerada um soluto orgânico compatível associado a proteção das plantas a estresse salino. Estudo realizado com o tomate transformado com o gene codificador da osmotina do tabaco revelou um aumento no teor de prolina de 4 a 6 vezes em plantas transformadas, quando comparadas com as plantas do tipo selvagem.

O acúmulo de prolina induzida pela osmotina é um mecanismo de tolerância a estresses abióticos, porém este mecanismo ainda é alvo de muitos estudos. Acredita-se que a osmotina não seja um fator de transcrição, já que estudos da sequência de genes dessa proteína em várias espécies mostram que não existem motivos de ligação ao DNA. Assim, supõe-se que a osmotina

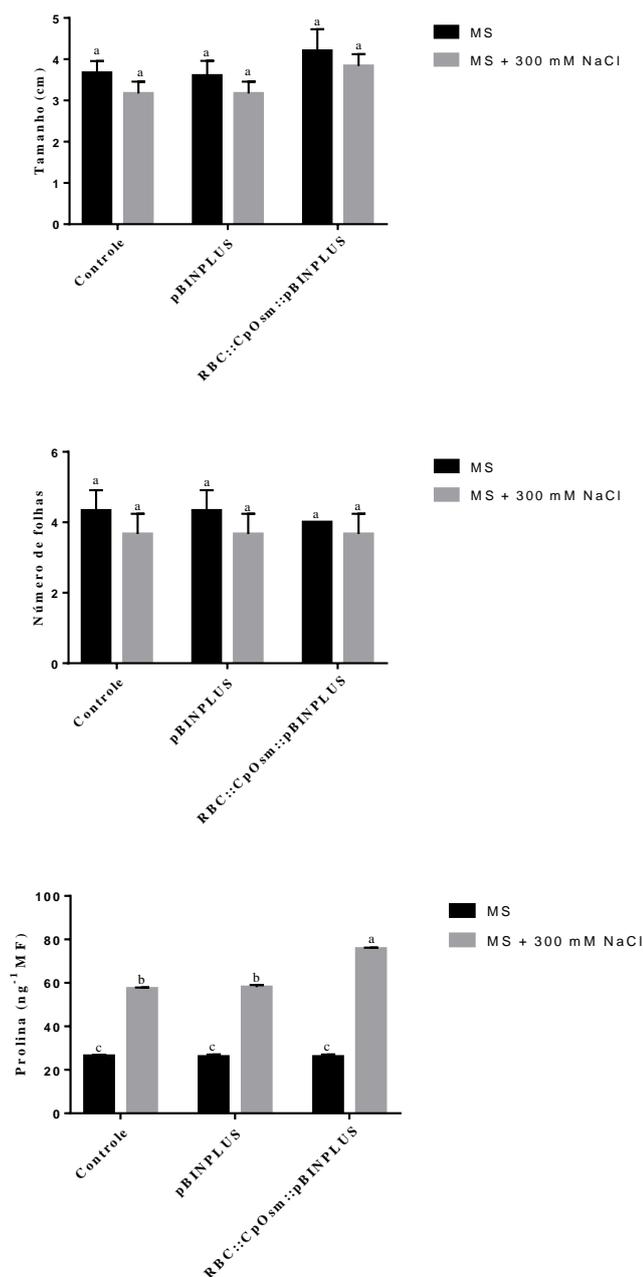
induza a produção de prolina através de sinalização celular, porém o mecanismo preciso ainda não relatado na literatura (VIKTOROVA *et al.*, 2012).

Figura 33 – Análise da resistência de plantas transformadas com o gene CpOsm ao estresse salino. Plantas crescendo durante sete dias em meio MS e meio MS com 300 mM de NaCl.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 34 – Observações fisiológicas de plantas transformadas com o gene CpOsm submetidas a estresse salino. Mensuração do crescimento, número de folhas e teores de prolina em plantas de *N. tabacum* transformadas e controle expostas a tratamento em meio MS e meio MS com 300 mM de NaCl. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), aplicando o teste de Tukey a 0,05% de probabilidade para confirmar a significância do resultado. Letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si.



Fonte: elaborada pelo autor.

3.5 Conclusão

Neste trabalho foram produzidas plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas com um vetor de clonagem binário com o intuito de expressar a osmotina de *Calotropis procera* (CpOsm) nos tecidos das plantas. As plantas transformadas apresentaram a integração do gene CpOsm no seu DNA genômico e possuíam a capacidade de produzir transcritos de RNA. Quando testada a presença da proteína recombinante em tecidos de folhas, mostrou que a osmotina de *C. procera* foi identificada por ensaios de imunodeteção em plantas transformadas. Em relação a morfologia, as plantas transformadas não apresentaram nenhuma diferença fenotípica quando comparada com as plantas não transformadas.

Quando analisado o potencial das proteínas totais das plantas *N. tabacum* sob inibição de crescimento e germinação de esporos de fungos fitopatogênicos, observou-se que proteínas das plantas transformadas possuíam maior capacidade de inibição, sendo essa ação associada ao mecanismo de ação da osmotina recombinantes.

Além disso, as plantas transformadas quando expostas a estresse salino, possuía a capacidade de aumentar a produção do aminoácido prolina, sendo esse considerado um osmólito importante para a sobrevivência das plantas a condições de salinidade, indicando uma possível relação entre a presença de osmotina e produção de compostos de defesa a estresse salino.

REFERÊNCIAS

- ADRANGI, S.; FARAMARZI, M.A.; SHAHVERDI, A.R.; SEPEHRIZADEH, Z. Purification and characterization of two extracellular endochitinases from *Massilia timonae*. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 402–407, 2010.
- ALBUQUERQUE, T.M.; ALENCAR, N.M.N.; FIGUEIREDO, J.G.; FIGUEIREDO, I.S.T.; TEIXEIRA, C.M.; BITENCOURT, F.S.; SECCO, D.D.; ARAUJO, E.S.; LEAO, A.M.C.A.; RAMOS, M.V. Vascular permeability, neutrophil migration and edematogenic effects induced by the latex of *Cryptostegia grandiflora*. **Toxicon**, v. 53, p.15-23, 2009.
- ALENCAR, N.M.N.; OLIVEIRA, J.S.; MESQUITA, R.O.; LIMA, M.W.; VALE, M.R.; ETCHELLS, J.P.; FREITAS, C.D.T.; RAMOS, M.V. Pro- and antiinflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflammation Research**, v. 55, p. 559-564, 2006.
- ANSARI SH, ALI M. New oleanene triterpenes from root bark of *Calotropis procera*. **J Med Aromat Plant Sci**, v. 21, p. 978–981, 1999.
- ARYA, S.; KUMAR, V.L. Anti-inflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators Inflamm**, v. 4, p. 228-232, 2005.
- BALTES, N.J.; VOYTAS, D.F. Enabling plant synthetic biology through genome engineering. **Trends Biotechnol.** V. 33: 120–131, 2015.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B. Illustrated genera of imperfect fungi. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1972.
- BARTHAKUR, S.; BABU, V.; BANSAL, K.C. OVER-expression of osmotina induces proline accumulation and confers tolerance to osmotic stress in transgenic tobacco. **J. Plant Biochem. Biotechnol.**, v.10, p. 31-37, 2001.
- BATES, L.S.; WALDREN, R.P., TEARE, J.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and soil.** V.39, p.205-207,1973.
- BECK, M.; HEARD, W.; MBENGUE, M. & ROBATZEK S. The INs and OUTs of pattern recognition receptors at the cell surface. *Curr. Opin. Plant Biol*, v. 15, p. 367–74, 2012.
- BEERS, R.F.; SIZER, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem*, v. 195, p.133-140, 1952.
- BORGES, A.J.S.; TRINDADE, A.V.; MATOS, A.P.; PEIXOTO, M.F.S. Redução do mal-dopanamá em bananeira-maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 42, p.35-41, 2007.

BOUTRAA, T. Effects of water stress on root growth, water use efficiency, leaf area and chlorophyll content in the desert shrub *Calotropis procera*. **J. Int. Environmental Application & Science**, v. 5, p. 124-132, 2010.

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

BRESSENDORFF, S.; AZEVEDO, R.; KENCHAPPA, C.S.; PONCE DE LEON I.; OLSEN, J.V. An innate immunity pathway in the moss *Physcomitrella patens*. **Plant Cell**, v. 28, p.28-42, 2016.

CANTU, D., VICENTE, A. R., LABAVITCH, J.M., BENNETT, A. B., AND POWELL, A. L. Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. **Trends Plant Sci.**, v. 13, p. 610-617, 2008.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **J. trop. Med.**, v. 24, p. 270-276, 1939.

CHAMBERS, J.L.E.; BERENBAUM, M.R.; ZANGERL, A.R. Benefits of trenching behavior in the context of an inducible defense. **Chemoecology**, v. 17, 125-130, 2007.

CHAUDHARY, P.; AHAMAD, S; KHAN, N.A. A review on medicinal utility of *Calotropis procera*. **World Journal of Pharmaceutical And Medical Research**, v. 3, p. 335-342, 2017.

CHEN, L.; ZOU, W.S; FEI, C.Y.; WU, G. LI, X.Y.; LIN,H.; XI, D. Alfa-Expansin EXPA4 Positively Regulates Abiotic Stress Tolerance but Negatively Regulates Pathogen Resistance in *Nicotiana tabacum*. **Plant cell physiology**. V. 59(11), p. 2317-2330, 2018.

CHOEDON, T., MATHAN, G., ARYA, S., KUMAR, V.L., KUMAR, V. Anticancer and cytotoxic properties of the *Calotropis procera* in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 12, p. 2517-2522, 2006.

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.

COLLIER, R.; THOMSON, J.G.; THILMONY, R. A versatile and robust *Agrobacterium*-based gene stacking system generates high-quality transgenic *Arabidopsis* plants. **The Plant Journal**. V. 95, 573-583, 2018.

COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. The molecular biology of chitin digestion. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, p. 270-277, 1998.

COSTA, P.H.A.; SILVA, J.V.; BEZERRA, M.A.; ENÉAS FILHO, J.; PRISCO, J.T.; GOMES FILHO, E. Crescimento e níveis de solutos orgânicos e inorgânicos em cultivares de *Vigna unguiculata* submetidos à salinidade. **Revista Brasil. Bot.**, v. 26, p. 289-297, 2003.

COSTA T. F. R.; LIMA A. P. C. A. Natural cysteine protease inhibitors in protozoa: Fifteen years of the chagasin family. **Biochimie**, v. 122, p. 197-207. 2016.

CUBETA, M.A.; PORTER, D.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.E. Laboratory exercises with zoospore plant pathogens. In: Trigiano, R.N., Windham, M.T., Windham, A.S. (Eds.). **Plant Pathology Concepts and Laboratory Exercises**, 2004.

CUI, H.T.; TSUDA, K.; PARKER, J.E. Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 66, p. 487–511, 2015.

D'SOUZAA RJ, VARUNA M, MASIHB J, PAUL MS. Identification of *Calotropis procera* L. as a potential phytoaccumulator of heavy metals from contaminated soils in urban North Central India. **J Hazard Mater**, v. 184, p. 457–464, 2010.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDA, G.S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 773-782, 2006.

DAMODARAN, T.; KUMAR, N.; KAVINO, K. Breeding and evaluation of Musa hybrids resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1. **Fruits**, v.64, p.3-16, 2009.

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. 72, 2006.

DAS, M.; CHAUHAN, H.; CHHIBBAR, A.; MOHD, Q.; HAQ, R.; KHURANA, P. High-efficiency transformation and selective tolerance against biotic and abiotic stress in mulberry, *Morus indica* cv. K2, by constitutive and inducible expression of tobacco osmotin. **Transgenic Res.** V. 20, p. 231–246, 2011.

DEWAN, S.; KUMAR, S.; KUMAR, V.L. Antipyretic effect of latex of *Calotropis procera*. **Ind J Pharmacol**, v. 32, p. 247-252, 2000b.

DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V.L. Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. **J Ethnopharmacology**. V: 73, p. 307-311, 2000a.

DITA, M.; BARQUERO, M.; HECK, D.; MIZUBUTI, E.S.G.; STAVER, C.P. Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. **Frontiers in Plant Science**, v.7, p.1468-1489, 2018.

DOMSALLA, A.; MELZIG, M. F. Occurrence and properties of proteases in plant latices. **Planta Medica**, v. 74, p. 699-711, 2008.

DUBEY, V. K.; JAGANNADHAM, M. V. Procerain, a Stable Cysteine Protease from the Latex of *Calotropis Procera*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1057–1071, 2003.

ENT, S.V.D; KOORNNEEF, A.; TON, J.; PIETERSE, C.M.J. Induced Resistance – Orchestrating Defence Mechanisms through Crosstalk and Priming. **Annual Plant Reviews**, v. 34, p 1-18, 2018.

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.

FLOR, H. H. Host-parasite interaction in flax rust: its genetic and other implications **Phytopathology**, v. 45, p. 680-685, 1955.

FORTUNATO, A.A.; Silva,W.L.; Rodrigues, F.A. Phenylpropanoid Pathway Is Potentiated by Silicon in the Roots of Banana Plants During the Infection Process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 104, p.597-602, 2013.

FRALEY, R.T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**.V.227, p. 1229-1231, 1985.

FREITAS, C. D. T.; NOGUEIRA, F. C. S.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; DOMONT, G. B.; RAMOS, M. V. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: Biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 738-743, 2011a.

FREITAS, C. D. T; LOPES, J. L. S.; BELTRAMINI, L. M.; OLIVEIRA, R. S. B.; OLIVEIRA, J. T. A.; RAMOS, M. V. Osmotin from *Calotropis procera* latex: New insights into structure and antifungal properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, p. 2501-2507, 2011b.

FREITAS, C.D.T. ; VIANA, C.A. ; VASCONCELOS, I.M. ; MORENO, F.B.B.; FILHO, J.V.L.; OLIVEIRA, H.D.; MOREIRA,R.A. ; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O. ; RAMOS, M.V. First insights into the diversity and functional properties of chitinases of the latex of *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry (Paris)**, v. 108, p. 361-371, 2016.

Freitas, C.D.T. ; Viana, C.A. ; VASCONCELOS, I.M. ; MORENO, F.B.B. ; FILHO, J.V.L. ; OLIVEIRA, H.D. ; MOREIRA, R.A. ; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O. ; Ramos, M.V. First insights into the diversity and functional properties of chitinases of the latex of *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 108, p. 361-371, 2016.

GAI, Y.P.; ZHAO, Y.N.; ZHAO, H.N.; YUAN, C.Z.; YUAN, S.S.; LI, S.; ZHU, B.S.; JI, X.L. The Latex Protein MLX56 from Mulberry (*Morus multicaulis*) Protects Plants against Insect Pests and Pathogens. **Front Plant Sci**. V.23, p.1-11, 2017.

GETHA, K.; VIKINESWARY, S.; WONG, W. H.; SEKI, T.; WARD, A.; GOODFELLOW, M. Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p.24–32, 2005.

GIANNIKIS, C.; BUCHELI, C.S.; SKENE, K.G.M.; ROBINSON, S.P.; STEELE, S.N.; AUST, J. Chitinase and β -1,3-glucanase in grapevine leaves: a possible defense against powdery mildew infection. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 4, p. 14-20, 1998.

GOMES, S.M. Morfo-anatomia de frutos secos em espécies de Apocynaceae: significado ecológico e evolutivo. **Acta bot. bras.**, v. 22, p. 521-534, 2008.

GRANT, M. & LAMB, C. Systemic immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 414-420, 2006.

GUO, L., YANG, L., LIANG, C., WANG, G., DAI, Q., AND HUANG, J. Differential colonization patterns of bananas (*Musa* spp.) by physiological race 1 and race 4 isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **J. Phytopathol.**, v. 163, p. 807–817, 2015.

HAMEL, F.; BELLEMARE, G. Characterization of a class I chitinase gene and of wound-inducible, root and flower-specific chitinase expression in *Brassica napus*. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1263, p. 212-220, 1995.

HANFREY, C.; FIFE, M.; BUCHANAN-WOLLASTON, V. Leaf senescence in *Brassica napus*: expression of genes encoding pathogenesis-related protein. **Plant Molecular Biology**, v. 30, p.597-609, 1996.

HASSAN, L.M.; GALAL, T.M.; FARAHAT, E.A.; EL-MIDANY, M.M. The biology of *Calotropis procera* (Aiton) W.T. **Trees**, v. 29, p.311–320, 2015.

HIRAYAMA, C.; KONNO, K.; WASANO, N.; NAKAMURA, M. Characterization of P69E and P69F, two differentially regulated genes encoding new members of the subtilisin-like proteinase family from tomato plants. **Plant Physiol.**, v.122:67–73, 2007.

HONG, J. K.; JUNG, H. W.; LEE, B. K.; LEE, S. C.; LEE, Y. K.; HWANG, B. K. An osmotin-like protein gene, *caosm1*, from pepper: differential expression and in situ localization of its mRNA during pathogen infection and abiotic stress. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 64, p. 301-310, 2004.

HORSCH, R.B., FRY, J.E., HOFFMANN, N.L., EICHHOLTZ, D., ROGERS, S.G., L'OEPEZ-CALCAGNO, P.E.; FISK, S.; BROWN, K.L.; BULL, S.E.; SOUTH, P.F.; RAINES, C.A. Overexpressing the H-protein of the glycine cleavage system increases biomass yield in glasshouse and field-grown transgenic tobacco plants. **Plant Biotechnology Journal**. V. 17, 141–151, 2019.

JORDA, L.; CONEJERO, V.; VERA, P. Characterization of P69E and P69F, two differentially regulated genes encoding new members of the subtilisin-like proteinase family from tomato plants. **Plant Physiol.**, v: 122:67–73, 2000.

KABIR, A.R.; RAHMAN, M.D.M; TASNIM, M.; KARIM. M.D.R.; KHATUN, N.; HASAN, M.; AMIN, R.; ISLAM, S.S.; JAMAN, N.; KABIR, A.H.; SANA, N.K.; OZEKI, Y.; ASADUZZAMAN, A.K.M. **Purification and characterization of a novel chitinase from *Trichosanthes dioica* seed with antifungal activity.** International Journal of Biological Macromolecules. V. 84, p. 62-68, 2016.

KHURAIISHI, A.A.; JAYALAKSHM, M.; HARINI, A.P.; KUNDER, A.S.; MAHESH, M. Isolation and purification of anticoagulant enzymes from plant latex. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 11, p. 217-222, 2019.

KITAJIMA, S.; KAMEI, K.; TAKETANI, S.; YAMAGUCHI, M.; KAWAI, F.; KOMATSU, A.; INUKAI, Y. Two chitinase-like proteins abundantly accumulated in latex of mulberry show insecticidal activity. **BMC Biochem**, v.11, 6. 2010.

KITAJIMA, S.; AOKI, W.; SHIBATA, D.; NAKAJIMA, D.; SAKURAI, N.; YAZAKI, K.; MUNAKATA, R.; TOKI TAIRA, R.; KOBAYASHI, M.; ABURAYA, S.; HYRMEYA SAVADOGO, E.; HIBINO, S.; YANO, A. Comparative multi-omics analysis reveals diverse latex-based defense strategies against pests among latex-producing organs of the fig tree (*Ficus carica*). **Planta**, v. 247, p. 1423–1438, 2018.

KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1510–1530, 2011.

KUMAR, H.S.; BASU, N. Anti-inflammatory activity of the latex *Calotropis procera*. **Journal Ethnopharmacology**; v. 44, p. 123-125, 1994.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1976.

LARHSINE, M.; OUMOULID, L.; LAZREK, H.B.; WATALEB, C.S.; BOUSAID, M.; BEKKOUICHE, K. MARKOUK, M.; JANA, M. Screening of antibacterial and antiparasitic activities of six Moroccan medicinal plants. **Therapie**, v. 54, p. 763-765, 1999.

LAURENCE, M. B.; VRIET, C.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; VAN DAMME, E. J. M.; ROUGE, P. A molecular basis for the endo- β -1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits. **Biochimie**, v.85, p.123-131, 2003.

LAZNIEWSKA, J.; MACIOSZEK, V. K.; KONONOWICZ, A. K. Plant-fungus interface: The role of surface structures in plant resistance and susceptibility to pathogenic fungi. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 24-30, 2012.

LE, T.T.T.; BRETT, W.; MUNDREE S.G. An osmotin from the resurrection plant *Tripogon loliiformis* (*TlOsm*) confers tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic rice. **Physiologia plantarum**. V. 162, p. 13-34, 2018.

LEE, H.; DAMSZ, B.; WOLOSHUK, C. P.; BRESSAN, R. A.; NARASIMHAN, M. L. Use of the Plant Defense Protein Osmotin To Identify *Fusarium oxysporum* Genes That Control Cell Wall Properties. **Eukaryote Cell**, v. 9, p. 558-568, 2010.

LEWINSOHN, T.M. The geographical distribution of plant latex. **Chemoecology**, v. 2(1):64–68,1991.

LI, C.; CHEN, S.; ZUO, C.; SUN, Q.; YE, Q.; YI, G. The use of GFP-transformed isolates to study infection of banana with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4. **Eur. J. Plant Pathol.**, v.131, p. 327-340, 2011.

LI, C.; YANG, J.; LI, W.; SUN, J.; PENG, M. Direct root penetration and rhizome vascular colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* are the key steps in the successful infection of Brazil Cavendish. **Plant Dis.**, v. 101, p. 2073–2078, 2017.

LI, L.; YI, H. Differential expression of Arabidopsis defense-related genes in response to sulfur dioxide. **Chemosphere**, v. 87, p.718–24, 2012.

LI, Y.; HUANG, F.; LU, Y.; SHI, Y.; ZHANG, M.; FAN, J.; WANG, W. Mechanism of Plant–microbe Interaction and Its Utilization in Disease-Resistance Breeding for Modern Agriculture. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 83, p. 51–58, 2013.

LICÁ, I.C.L.; SOARES, A.M.S.; MESQUITA, L.S.S.; MALIK, S. Biological properties and pharmacological potential of plant exudates. **Food Research International**, v. 105, p.1139-1153, 2018.

LIMA-FILHO, J.V.; PATRIOTA, J.M.; SILVA, A.F.B.; FILHO, N.T.; OLIVEIRA, R.S.B.; ALENCAR, N.M.N.; RAMOS, M.V. Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 327-334, 2010.

LIU, J. J.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. V. 68, 3–13, 2006.

LIU, J. J.; STURROCK, R.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. **Plant Cell Reports**. V. 29, p. 419-436, 2010.

LOBO, M.D.P.; REBELO, L.M.; BRANDÃO-NETO, J.; SOUSA, J.S.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; FREITAS, C.D.T.; GRANGEIRO, T.B. Crystal structure of an antifungal osmotin-like protein from *Calotropis procera* and its effects on *Fusarium solani* spores, as revealed by atomic force microscopy: Insights into the mechanism of action. **Phytochemistry**. V. 119, p.5–18, 2015.

LOKHANDE, V.H.; NIKAM, T.D.; PENNA, S. Biochemical, physiological and growth changes in response to salinity in callus cultures of *Sesuvium portulacastrum* L. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 102, p. 17–25, 2010.

LOTTERMOSER, B.G. Colonisation of the rehabilitated Mary Kathleen uranium mine site (Australia) by *Calotropis procera*: toxicity risk to grazing animals. **J Geochem Explor**, v. 111, p.39–46, 2011.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, p. 405-410, 2002.

MUNUSAMY, U.; MOHD-YUSUF, Y.; BAHARUM, N.A; ZIDI, K.; OTHMAN, Y. RT-qPCR PROFILING OF PATHOGENESIS RELATED GENES IN *MUSA ACUMINATA* CV. ‘BERANGAN’ SEEDLINGS CHALLENGED WITH *Fusarium oxysporum* F. SP. *Cubense* TROPICAL RACE 4. **Pak. J. Agri. Sci.**, v. 56, p. 37-42; 2019

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

MURTI, Y.; YOGI, B.; PATHAK, D. Pharmacognostic standardization of leaves of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Asclepiadaceae). **Int J Ayur Res**, v. 1, p. 14–17, 2010.
 NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidases in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol.**, v. 22, p. 867-880, 1981.

NARASIMHAN, M. L.; COCA, M. A.; JIN, J. B.; YAMAUCHI, T.; ITO, Y.; KADOWAKI, T.; KIM, K. K.; PARDO, J. M.; DAMSZ, B.; HASEGAWA, P. M.; YUN, D. J.; BRESSAN, R. A. Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of mammalian adiponectin receptor. **Molecular Cell**, v. 17, p. 611-611, 2005.

NÁVAROVÁ, H.; BERNSDORFF, F.; DÖRING, A.C.; ZEIERA, J. Pipecolic Acid, an Endogenous Mediator of Defense Amplification and Priming, Is a Critical Regulator of Inducible Plant Immunity. **The Plant Cell**, v. 24, p. 12, 2012.

NOORI, S. A. S.; SOKHANSANJ, A. Wheat plants containing an osmotin gene show enhanced ability to produce roots at high NaCl concentration. **Russian Journal of Plant Physiology**. V. 55, p. 256-258, 2008.

NOVÁKOVÁ, M.; KIM, S.; BURKETOVÁ, J.; VALENTOVÁ, S. Separation and identification of candidate protein elicitors from the cultivation medium of *Leptosphaeria maculans* inducing resistance in *Brassica napus*. **Biotechnol Prog**. Mar 24, 2016.

OBWALD, W.; FLEISCHMANN, F.; RIGLING, D.; COELHO, A. C.; CRAVADOR, A.; DIEZ, J.; DALIO, R. J.; HORTA JUNG M.; PFANZ, H.; ROBIN, C.; SIPOS, G.; SOLLA, A.; CECH, T.; CHAMBERY, A.; DIAMANDIS, S.; HANSEN, E.; JUNG, T.; ORLIKOWSKI, L. B.; PARKE, J.; PROSPERO, S. & WERRES, S. Strategies of attack and defence in woody plant–Phytophthora interactions. **Forest Pathology**, v. 44, p.169-190, 2014.

OLIVEIRA, R.S.B. **Expressão heteróloga, caracterização cristalográfica e análise funcional de uma osmotina antifúngica de *Calotropis procera***. 2014. 127 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

PARIDA, A.K.; DAS, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 324–349, 2005.

PARK, S. W.; VEPACHEDU, R.; SHARMA, N.; VIVANCO, J. M. Ribosome-inactivating proteins in plant biology. **Planta**, v. 219, p. 1093–1096, 2004.

PIETERSE, C.M.J.; SCHALLER, A.; MAUCH-MANI, B.; CONRATH, U. Signaling in Plant Resistance Responses: Divergence and Cross-Talk of Defense Pathways. **Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants**. V. 1, 166-196, 2006.

PONTE, L.F.A.; SILVA, A.L.C.; CARVALHO, F.E.L. ; MAIA, J.M. ; VOIGT, E. L. ; SILVEIRA, J. A. G . Salt-induced delay in cotyledonary globulin mobilization is abolished by induction of proteases and leaf growth sink strength at late seedling establishment in cashew. **Journal of Plant Physiology**, v.171, p. 1362-1371, 2014.

PUNJA, Z. K. Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens - a review of progress and future prospects. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 23, p. 216–235, 2001.

PUSAPATI M, R.; ESWARA RAO, G.; KRISHNAPRIYA, M.; NAGALAKSHMI, V.; SILPA, P.; ANJALI, M. An overview of phytochemical and pharmacological activities of *Calotropis procera*. **F S Journal of Pharm Res.**, v.1, p.17-25, 2012.

QAMAR, Z.; AALIYA, K.; NASIR, I.A.; FAROOQ, A.M.; TABASSUM, B.; ALI, Q.; ALI, A.; AWAN, M.F.; TARIQ, M.; HUSNAIN, T. An overview of genetic transformation of glyphosate resistant gene in *Zea mays*. **Nature and Science**. V. 13, 80-90, 2015.

RAMOS, M. V.; ARAÚJO, E. S.; JUCÁ, T. L.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; VASCONCELOS, I. M.; MOREIRA, R. A.; VIANA, C. A.; BELTRAMINIC, L. M.; PEREIRAA, D. A.; MORENO, F. B. New insights into the complex mixture of latex cysteine peptidases in *Calotropis procera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 211–219, 2013.

RAMOS, M.V.; AGUIAR, V.C.; XAVIER, A.A.S.; NOGUEIRA, N.A.P.; BANDEIRA, G. P.; ALENCAR, N.M.N. Latex proteins from the plant *Calotropis procera* are partially digested upon in vitro enzymatic action and are not immunologically detected in fecal material. **Fitoterapia**, v.77, p.251-256, 2006.

RAMOS, M.V.; BANDEIRA, G.P.; FREITAS, C.D.T.; NOGUEIRA, N.A.P.; ALENCAR, N.M.N.; SOUSA, P.A.S.; CARVALHO, A.F.U. Latex constituents from *Calotropis procera* (R. Br.) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn.). **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**; v. 1001, p. 503-510, 2006.

RAMOS, M.V.; DEMARCO, D.; SOUZA, I.C.C.; FREITAS, C.D.T. Laticifers, Latex and Their Role in Plant Defence. **Trends in Plant Science**. 2019.

RAMOS, M.V.; GRANGEIRO, T.B.; FREIRE, E.A.; SALES, M.P.; SOUZA, D.P.; ARAUJO, E.S.; FREITAS, C.D.T. The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. **Anthropod-plant interactions**, v. 4, p. 57-67, 2010.

RAMOS, M.V.; VIANA, C.A.; SILVA, A.F.B.; FREITAS, C.D.T.; FIGUEIREDO, I.S.T.; OLIVEIRA, R.S.B.; ALENCAR, N.M.N.; LIMA-FILHO, J.V.M.; KUMAR, V.L. Proteins derived from latex of *C. procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, p. 455-463, 2012.

RAMOS, M.V.; AGUIAR, V.C.; XAVIER, A.A.S.; NOGUEIRA, N.A.P.; BANDEIRA, G. P.; ALENCAR, N.M.N. Latex proteins from the plant *Calotropis procera* are partially digested upon in vitro enzymatic action and are not immunologically detected in fecal material. **Fitoterapia**, v.77, p.251-256, 2006.

RASIK, A.M.; RAGHUBIR, R.; GUPTA, A.; SHUKLA, A.; DUBEY, M.P.; SRIVASTAVA, S.; JAIN, H.K.; KULSHRESTHA, D.K. Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 68, p. 261-266, 1999.

REENA, R.; DUSHYANT, S.; MONIKA, C.; PARKASH, Y.J. Phytochemical Analysis, Antibacterial and Antioxidant Activity of *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea*. **The Natural Products Journal**, v. 9, p. 47-60, 2019.

ROMMENS, C.M. Kanamycin resistance in plants: an unexpected trait controlled by a ROUX, F.; VOISIN, D.; BADET, T.; BALAGUÉ, C.; BARLET, X.; HUARD-CHAUVEAU, C.; ROBY, D. & RAFFAELE, S. Resistance to phytopathogens e tutti quanti: placing plant quantitative disease resistance on the map. **Molecular Plant Pathology**, v. 15, p. 427-432, 2014.

RUSTAGI, A.; JAIN, S.; KUMAR, D.; SHEKHAR, S.; JAIN, M.; BHAT, V.; SARIN, N.B. High Efficiency Transformation of Banana [*Musa acuminata* L. cv. *Matti* (AA)] for Enhanced Tolerance to Salt and Drought Stress Through Overexpression of a Peanut *Salinity-Induced Pathogenesis-Related* Class 10 Protein. **Mol Biotechnol.** V. 57:27–35, 2015.

SALGUERO-LINARES, J.; COLL, S.N. Plant proteases in the control of the hypersensitive response. **Journal of Experimental Botany**, v.7, p.1-9, 2019.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, vol. I. 2 edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMREEN, U.; HUSSAIN, F.; SHER, Z. Allelopathic potential of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. **Pak J Pl Sci**, v. 15, p.7–14, 2009.

SANGRAULA, H.; DEWANS, S.; KUMAR, V.L. Evaluation of Antiinflammatory activity of the latex of *Calotropis procera* in different models of inflammation. **Inflammopharmacol**, v. 9, p. 257-264, 2002.

SELITRENNIKOFF, C.P. Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 2883–2894, 2001.

SHAH, J., CHATURVEDI, R., CHOWDHURY, Z., VENABLES, B., PETROS, R.A. Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. *Plant J.* V: 79, p. 645–658, 2014.

SHARMA, G.K. *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea*. **Indian Journal Veterinary Science and Animal Husbandry**, v. 4, p. 63-74, 1934.

SHARMA, P.; DEVI, J.; SHARMA, J. In vitro hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal Ethnopharmacology**; v.74, p 239-243, 2001.

SHIGENAGA, A.M.; ARGUESO C.T. No hormone to rule them all: interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. **Cell Dev. Biol.**, v.73, p.74–89, 2016.

SILVA, M. L.; BEZERRA NETO, F.; LINHARES, P. C. F.; BEZERRA, A. K. H. Produção de cenoura fertilizada com flor-de-seda (*Calotropis procera* (Ait.) R.Br.) **Revista Ciência Agrônômica**, v. 44, p. 732-740, 2013.

SINGH, A. N.; SHUKLA, A. K.; JAGANNADHAM, M. V.; DUBEY, V. K. Purification of a Novel Cysteine Protease, Procerain B, from *Calotropis procera* with Distinct Characteristics Compared to Procerain. **Process Biochemistry**, v.45, p. 399–406, 2010.

SINGH, N. K.; BRACKER, C. A.; HASEGAWA, P. M.; HANDA, A. K.; BUCKEL, S.; HERMODSON, M. A. Characterization of osmotin. A thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. **Plant Physiology**, v.85, p.529-36, 1987.

SOUZA, D. P.; FREITAS, C. D. T.; PEREIRA, D. A.; NOGUEIRA, F. C.; SILVA, F. D. A.; SALAS, C. E.; RAMOS, M. V. Laticifer proteins play a defensive role against hemibiotrophic and necrotrophic phytopathogens. **Planta**, v. 234, p. 183–193, 2011.

SOUZA, I.C.C.; RAMOS, M.V.; COSTA, J.H.; FREITAS, C.D.T.; OLIVEIRA, R.S.B.; MORENO, F.B.; MOREIRA, R.A.; CARVALHO, C.P.S. The osmotin of *Calotropis procera* latex is not expressed in laticifer-free cultivated callus and under salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.119, p. 312-318, 2017.

STINTIZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLUS, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant pathogenesis related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie.**, v..75, p.687-706, 1993.

SUBROTO T.; VRIES, H.; SCH URINGA, J. J.; SOEDJANAATMADJA, U. M. S.; HOFSTEENGED, J.; JEKEL, P. A.; BEINTEMA, J. J. Enzymatic and structural studies on processed proteins from the vacuolar (luteoid-body) fraction of latex of *Hevea brasiliensis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, p.1047-1055, 2001.

SUN, D.; LU, X.; HU, Y.; LI, W.; HONG, K.; MO, Y.; CAHILL, D.M.; XIE, J. Methyl jasmonate induced defense responses increase resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 in banana. **Scientia Horticulturae**, v. 164, p. 484-491, 2013.

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.

TOWBIN, H.; STAEHENLIN, T.; GORDON, J. Electrophorese transfer of proteins from polyacrilamide gel to nitrocellulose sheet: produces and some applications. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA (PNAS)**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. **Biopolymers, Plant Sci.**, v. 13, p. 610–617, 2008.

TURK, B.; TURK, D.; TURK V. Protease signalling: the cutting edge. **The EMBO Journal. European Molecular Biology Organization**, v. 31, p. 1630–164, 2012.

TZOU, Y. M.; HUANG, T. S.; HUGGINS, K. W.; CHIN, B. A.; SIMONNE, A. H.; SINGH, N. K. Expression of truncated tobacco osmotin in *Escherichia coli*: purification and antifungal activity. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 539-543, 2011.

URBANEK,H; HUZNIAK-GEBAROWSKA; HERKA,K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologica Plantarum**, v.13,p. 43-50, 1991.

VAN LOON L. C., VAN STRIEN E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85 – 97, 1999.

VAN LOON L.C.; PIETERSE, C.M.J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 44, p.135–62, 2006.

VELAZHAHAN, R.; DATTA, S. K.; MUTHUKRISHNAN, S. The PR-5 family: thaumatin-like proteins in plants. **In: Datta SK, Muthukrishnan S, editors. Pathogenesis-related proteins in plants**, v. 7, p.107-129, 1999.

VIANA, C. A. **Caracterização bioquímica e atividades biológicas de quitinases laticíferas de *Calotropis Procera***. 2015. 120f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Fortaleza, 2015.

VIANA, C.A.; Ramos, M.V. ; FILHO, J.D.B.M.; LOTUFO, L.V.C.; FIGUEIREDO, I.S.T.; OLIVEIRA, J.S.; MASTROENI, P.; Lima-Filho, J.V. ; ALENCAR, N.M.N. Cytotoxicity against tumor cell lines and anti-inflammatory properties of chitinases from *Calotropis procera* latex. **NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY**, v. 390, p. 1005-1013, 2017.

VIKTOROVA, J.; KRASNY, L.; KAMLAR, M.; NOVAKOVA, M.; MACKOVA, M.; MACEK, M. Osmotin, a Pathogenesis-Related Protein. **Current Protein and Peptide Science**, v. 13, p. 672-681, 2012.

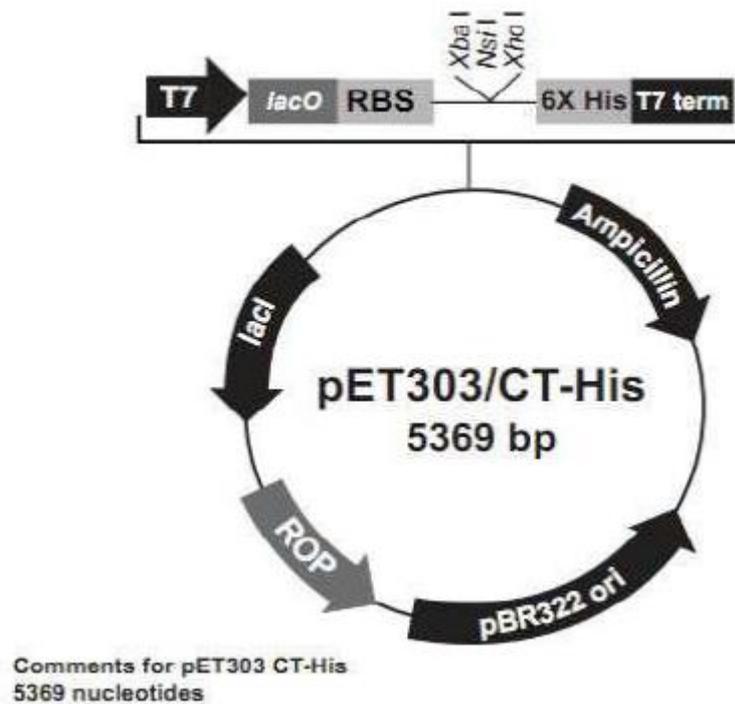
WAHLER, D.; SCHULZE GRONOVER, C.S.; RICHTER, C.; FOUUCU, F.; TWYMAN, R.M.; MOERSCHBACHER, B.M.; FISCHER, R.; MUTH, J.; PRÜFER, D. Polyphenoloxidase silencing affects latex coagulation in *Taraxacum* species. **Plant Physiol.**, v. 151, 334–346, 2009.

XIAO, R. F.; ZHU, Y.J.; LI, Y.D.; LIU, B. Studies on vascular infection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 in banana by field survey and green fluorescent protein reporter. **J. Plant Pathol**. v. 2, p. 44–51, 2013.

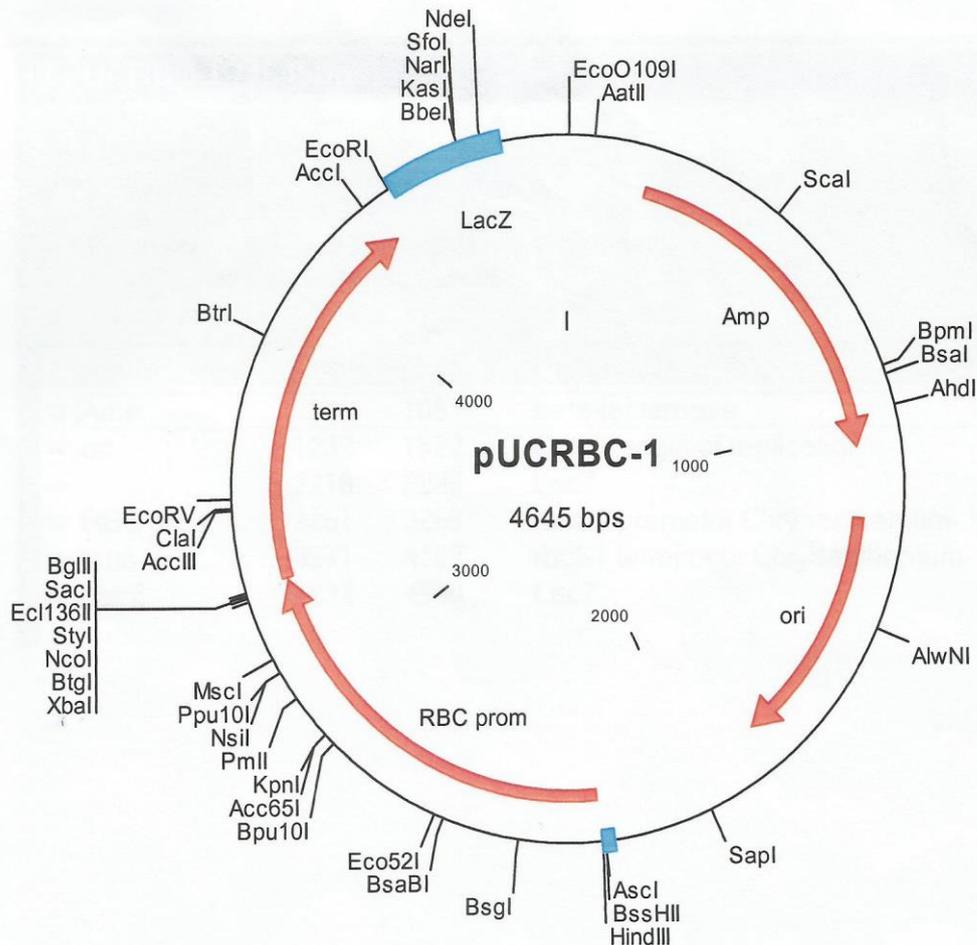
YANIV, Z.; KOLTAI, H. *Calotropis procera*, Apple of Sodom. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 65, p. 55-61, 2018.

**ANEXO A – VETOR DE CLONAGEM UTILIZADO COMO MOLDE PARA
OBTENÇÃO DO FRAGMENTO DA CpOsm.**

O vetor recombinantes pET303::CpOsm foi produzido e cedido por Oliveira (2014).



**ANEXO B – VETOR DE CLONAGEM UTILIZADO COMO FONTE PARA
OBTENÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO DA RuBisCo.**



All sites listed in this figure are unique.

multiple cloning site between RBC-promotor and terminator

Prom----AAG TAT CTA GAA ACC ATG GGA GCT CAG ATC TCA TA----Term
XbaI NcoI StyI SacI BglII

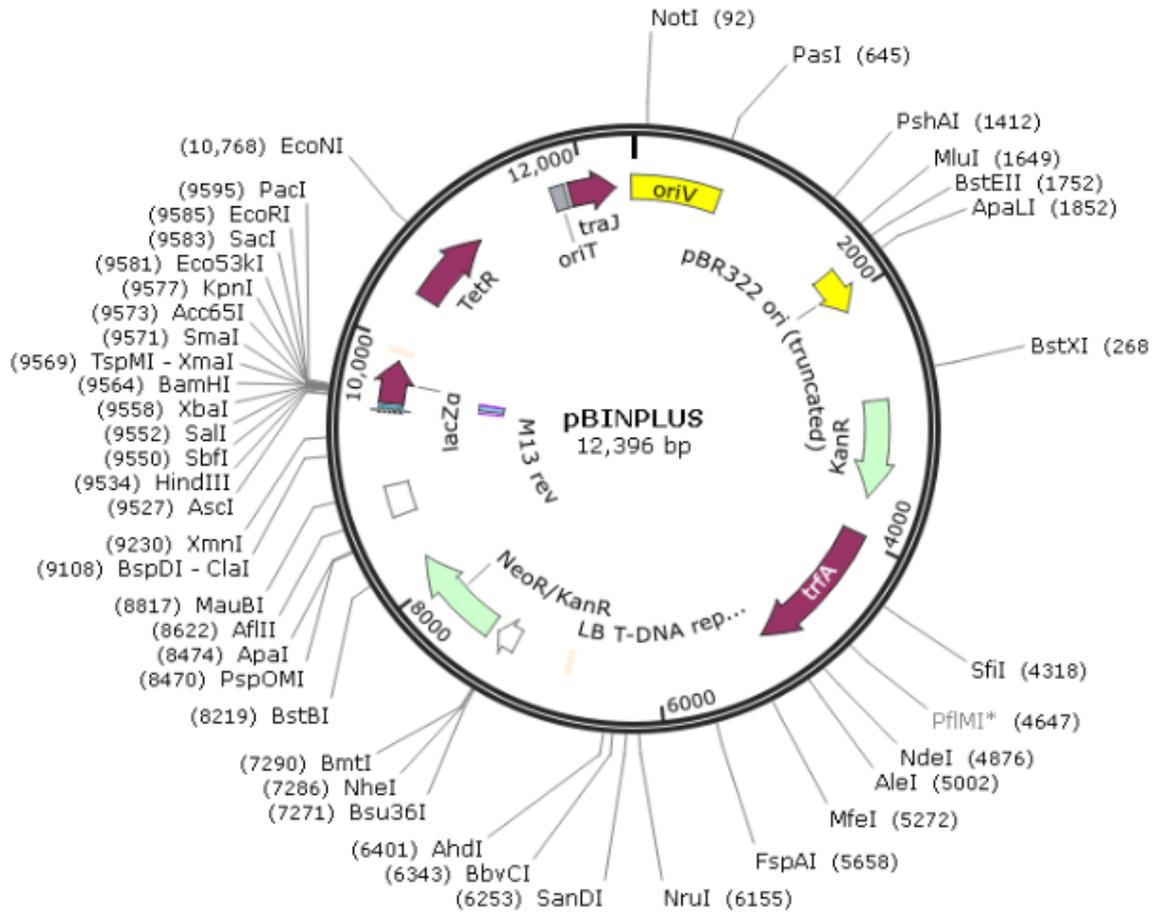
Construction of plasmid:

The RBC promoter with its terminator was cloned into the pUCAP vector, which is a modified pUC19 vector (Engelen et al. (1995) *Transgenic Research* 4, 288-290).

It was inserted into the HindIII site of the pUCAP vector, creating pUCRBC-2 and from this vector the mcs between the EcoRI sites was removed, resulting in the pUCRBC-1 plasmid.

Outchkourov (2003); The promoter-terminator of chrysanthemum rbcS1 directs very high expression levels in plants. *Planta* 216: 1003-1012

ANEXO C – VETOR BINÁRIO DE CLONAGEM UTILIZADO NA TRANSFORMAÇÃO DAS PLANTAS DE TABACO.



**ANEXO D - SEQUENCIAS DOS INDICADORES (PRIMERS) PARA
AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE DNA CODIFICANDO CpOsm**

Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para amplificação da sequência de DNA codificando CpOsm

Primer senso (com sítio de restrição para XbaI)

5'-CCGGTCTAGAAAAAUGGCCACGTTCACTATCCGG

Primer anti-senso 1 (com sítio de restrição para BglII)

5'-CCGGAGATCTTCAGGGACAAAAGATAACTC