

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

SANDRA MARA SERAFIM RIBEIRO

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS DE FUMO (*Nicotiana tabacum* var.
Xanthi) COM A SEQUÊNCIA CV1887 DE *Chromobacterium violaceum***

Fortaleza, 2008

SANDRA MARA SERAFIM RIBEIRO

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS DE FUMO (*Nicotiana tabacum* var. *Xanthi*) COM A SEQUÊNCIA CV1887 DE *Chromobacterium violaceum*

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho.

**Fortaleza
2008**

SANDRA MARA SERAFIM RIBEIRO

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS DE FUMO (*Nicotiana tabacum* var. *Xanthi*) COM A SEQUÊNCIA CV1887 DE *Chromobacterium violaceum*

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. Área de concentração Bioquímica Vegetal.

Aprovada em, 26 / 09 / 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho (Orientadora)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular-UFC

Prof^ª. Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini
Departamento de Fitotecnia-UFC

Prof^ª. Dra. Vânia Marilande Ceccatto
Departamento de Biologia- UECE

À minha amada vovó Maria

Dedico

AGRADECIMENTOS

À FUNCAP e ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À minha orientadora Cristina Paiva da Silveira Carvalho. Pelos esforços visando o meu engrandecimento profissional, pela paciência e amizade.

Ao professor Thalles Barbosa Grangeiro. Pela orientação criteriosa e pela ajuda no meu processo de formação.

À professora Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini. Pela ajuda, pela disponibilidade de participar da banca e amizade.

Ao professor José Tadeu Abreu de Oliveira. Pela ajuda em parte dos experimentos e pela disponibilização do laboratório.

À professora Maria Aparecida Alves. Pela amizade e descontração.

À professora Vânia Melo. Pela disponibilização do laboratório para realização de parte do experimento.

Aos professores do Departamento de Bioquímica da UFC. Pela disponibilização do laboratório e ajuda em problemas pertinentes ao trabalho.

Aos integrantes do laboratório de Genética Molecular, Denise, Tuana, Marina, Wal, Patrícia Geórgia, Julio e Adriana. Pelo companheirismo, pelos vários momentos de descontração no laboratório e grande ajuda nos experimentos.

Aos integrantes do laboratório de Biotecnologia Vegetal, Gabi, Rosa, Ivna, Luis Carlos, Vincenzo, Emmanuel e Edvar. Pela amizade e grande ajuda nos experimentos.

À amiga Ivna Salmito. Pela ajuda na realização do experimento de transformação.

Às amigas Denise e Juliana. Pela amizade, pela ajuda nos experimentos, pela descontração e bom humor em todos os momentos.

Ao amigo Fabio Rossi. Pela ajuda no experimento e pelo bom humor.

Aos amigos da Microbiologia Allisson e Natasha. Pela ajuda em parte dos experimentos.

À pequena Mari. Pelas tardes de alegria.

Aos amigos Marcelo e Valdeana. Pelo companheirismo e amizade desde a graduação.

Aos meus queridos pais que não medem esforços para me ajudar.

Aos irmãos Saulo e Sâmia por serem meus irmãos.

Aos meus primos Bruno, Renata, Raquel e Eduardo. Pela amizade, ajuda e carinho.

Às tias Lucielma e Lucineide. Por serem fundamentais em toda a minha formação e pela grande ajuda.

À minha querida vovó. Por representar tudo na minha vida.

Ao meu marido Marcus. Por estar ao meu lado, pela ajuda nos momentos difíceis e também nos fáceis, pelo amor e companheirismo.

A Deus. Por tudo.

RESUMO

A transformação genética de plantas atualmente representa uma importante ferramenta para investigação da função de genes de diversas origens como plantas, fungos, vírus, nematóides e bactérias, sendo os de origem bacteriana os mais representativos. Dentro desse contexto, seqüências codificando para domínios contendo repetições YD (tirosina-ácido aspártico), que possuem similaridades com proteínas nematocidas, foram previamente detectadas no genoma de *Chromobacterium violaceum* estirpe ATCC 12472. Dentre essas seqüências, a ORF CV1887 (4.155 pb) foi selecionada para clonagem e expressão no sistema heterólogo, objetivando validar a atividade determinada *in silico* na anotação do genoma de *C. violaceum*. A estratégia experimental consistiu em clonar as seqüências completa (4.155 pb) e parcial (2.642 pb) da ORF CV1887 no vetor binário pBI121. Os vetores recombinantes foram introduzidos em células de *Agrobacterium tumefaciens* estirpe LBA4404, por eletroporação. Empregando-se o sistema de agroinfecção, segmentos foliares de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi foram transformados e usados como propágulos para regeneração dos transformantes primários. A confirmação da transformação genética foi feita por reação da polimerase em cadeia (PCR), sendo usado como molde, o DNA genômico extraído de clones selecionados em meio de cultura contendo canamicina. Pela visualização das bandas no gel de agarose, dos 19 clones selecionados de CV1887 parcial, 84% apresentaram bandas no tamanho aproximado de 2.642 pb e dos 13 clones selecionados de CV1887 completo, 78% apresentaram bandas no tamanho aproximado de 4.155 pb. Para a análise da expressão, foram selecionados três clones transformados com a seqüência CV1887 parcial, dois clones transformados com a seqüência CV1887 completa, três clones transformados com o gene repórter *gus*, que codifica para a enzima β -glucoronidase, e dois clones de plantas controle não transformadas. O RNA extraído dos clones selecionados foi utilizado em uma reação de RT-PCR para a síntese do cDNA e amplificação das seqüências correspondentes. Os produtos da amplificação foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose, constatando-se a presença de bandas no tamanho aproximado de 2.642 pb para os três clones transformados com a seqüência CV1887 parcial e no tamanho de 1.812 pb para os três clones transformados com *gus*, confirmando-se a presença dessas seqüências nas células transformadas. Não foi confirmada a presença, nos clones transformados, da seqüência CV1887 completa.

ABSTRACT

The genetic transformation of plants represents today an important tool to investigate the function of genes of diverse origins like plants, fungi, virus, nematodes and bacteria. Those that come from bacteria are the most representative ones. Within this context, sequences coding to domains containing YD (tyrosine-asparatate) repetitions, that have similarities with nematicide proteins, were detected in the *Chromobacterium violaceum* strain ATCC 12472 genome. Among these sequences, the ORF CV1887 (4.155 bp) was selected for cloning and expression in the heterologous system, in the attempt to validate its activity determined *in silico* in the *C. violaceum* genome's annotation. The experimental strategy consisted in cloning the complete (4.155 bp) and the partial sequence (2.642 bp) of the ORF in the binary vector pBI121. The recombinant vectors were introduced in *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 cells by electroporation. By utilizing agroinfection system, leaves segments of *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi* were transformed and used as propagules for regeneration of the firsts transformants. The confirmation of the genetic transformation was achieved by PCR with the genomic DNA extracted from of the selected clones, followed of a PCR reaction. The visualization of bands in the agarose gel electrophoresis showed that from the 19 clones with the partial sequence cv1887 that were selected, 84% showed bands with approximate size of 2.642 bp, and from the 13 clones with the complete sequence CV1887 that were selected, 78% showed bands with approximate size of 4.155 bp. For the expression analysis, the following were selected: three transformed clones with partial sequence CV1887, two transformed clones with complete sequence CV1887, three clones transformed with the reporter gene *gus*, which encodes for the enzyme β - glucuronidase, and two control clones of non-transformed plants. The RNA from the selected clones was used in a RT-PCR reaction for cDNA synthesis and amplification of the corresponding sequences. The products of the amplification were analyzed in an agarose gel electrophoresis, showing the presence of bands with 2.642 bp for the three clones transformed with partial sequence CV1887 and 1.812 bp for the three clones transformed with *gus* and it is confirmed the presence of these sequences in the transformed cells. It was not confirmed the presence in transformed clones, the complete sequence CV1887.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Colônias de <i>Chromobacterium violaceum</i>	27
FIGURA 2: Alinhamento das seqüências consenso das repetições YD da proteína CV1887 de <i>Chromobacterium violaceum</i>	30
FIGURA 3: Seqüência de aminoácidos da proteína codificada pela seqüência CV1887 de <i>Chromobacterium violaceum</i>	31
FIGURA 4: Mapa circular e pontos de referência do vetor de clonagem <i>pGEM-T Easy</i>	36
FIGURA 5: Mapa do vetor de expressão pBI121.....	40
FIGURA 6: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR de CV1887 completo e parcial amplificados a partir do vetor pGEMT-Easy::CV1887.....	50
FIGURA 7: Eletroforese em gel de agarose 0,8% do plasmídeo pGEM-T easy::cv1887 completo.....	51
FIGURA 8: Eletroforese em gel de agarose 0,8% do plasmídeo pGEM-T easy::cv1887 parcial.....	51
FIGURA 9: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR de pGEM::cv1887 completo.....	52
FIGURA 10: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR de pGEM::cv1887 parcial.....	52
FIGURA 11: Eletroforese em gel de agarose 0,6% da digestão de pBI121, pGEM::cv1887 completo e pGEM::cv1887 parcial.....	54
FIGURA 12: Eletroforese em gel de agarose 0,8% da PCR de pBI::cv1887 completo.....	55
FIGURA 13: Eletroforese em gel de agarose 0,8% da PCR de pBI::cv 1887 parcial.....	55
FIGURA 14: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos da digestão dos plasmídeos pBI::cv 1887 completo e parcial com as enzimas <i>Sst I</i> e <i>Xba I</i>	57
FIGURA 15: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos plasmídeos pBI::cv1887 completo e parcial extraídos de células de <i>A. tumefaciens</i>	58
FIGURA 16: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR de pBI 121::cv1887 parcial.....	59
FIGURA 17: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR de pBI 121::cv1887 completo.	59

FIGURA 18: Aspecto dos explantes de fumo (<i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi) controle e transformados após quatro semanas do co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> LBA 4404.....	62
FIGURA 19: Aspecto individual dos explantes de fumo (<i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi) controle e transformados após quatro semanas do co-cultivo com <i>A. tumefaciens</i> LBA 4404.....	63
FIGURA 20: Percentual de explantes com formação de brotos após quatro semanas em meio de indução de brotos.....	65
FIGURA 21: Percentual de explantes com formação de raízes após quatro semanas em meio de indução de brotos.....	66
FIGURA 22: Avaliação do desenvolvimento dos clones de fumo selecionados dos tratamentos C+, pBI, CVparcial e CVcompleto, cultivados por quatro semanas em meio de indução de brotos.....	67
FIGURA 23: Avaliação do desenvolvimento dos clones de fumo selecionados dos tratamentos C+, pBI, CVparcial e CVcompleto, cultivados por quatro semanas em meio de enraizamento.....	71
FIGURA 24: Percentual de explantes com formação de raízes após quatro semanas em meio de enraizamento.....	72
FIGURA 25: Aspecto dos explantes de fumo (<i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi) transformados em meio de enraizamento e utilizados como controle.....	73
FIGURA 26: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR amplificados a partir do DNA genômico extraído de plantas de fumo transformadas com pBI 121::gus.....	74
FIGURA 27: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR amplificados a partir do DNA genômico extraído de plantas de fumo transformadas com pBI 121::cv1887 completo	74
FIGURA 28: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR amplificados a partir do DNA genômico extraído de plantas de fumo transformadas com pBI 121::cv1887 parcial.....	75
FIGURA 29: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR amplificados a partir do DNA genômico extraído de plantas de fumo transformadas com pBI 121::cv1887 parcial.....	75

FIGURA 30: Eletroforese em gel de agarose 1,2% das amostras de RNA total extraídas de plantas de fumo controle e transformadas com <i>gus</i> , cv 1887 parcial e cv 1887 completo.....	77
FIGURA 31: Eletroforese em gel de agarose 1,0% dos produtos de PCR amplificados a partir do cDNA sintetizado a partir de amostras de RNA extraídas de plantas de fumo transformadas CV1887 parcial.....	78
FIGURA 32: Eletroforese em gel de agarose 1,0% dos produtos de PCR amplificados a partir do cDNA sintetizado a partir de amostras de RNA extraídas de plantas de fumo transformadas com <i>gus</i>	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Sequência dos oligonucleotídeos.....34

TABELA 2 - 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).....64

TABELA 3 - Respostas de brotos de fumo (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) originados de explantes co-cultivados com *A.tumefaciens* LBA4404 portando os seguintes plasmídeos: pBI121::gus, pBI121::cv 1887 parcial, pBI121::cv 1887 completo, após quatro semanas de cultivo em meio de enraizamento (sais e vitaminas MS e canamicina 100 mg/L); e os explantes controle não co-cultivados com *A. tumefaciens*.....70

LISTA DE ABREVIATURAS

AS	Acetoseringona
ATCC	American Type Culture Collection
BAP	6-Benzilaminipurina
CaMV	Vírus do Mosaico da Couve-flor
CV1887	ORF 1887 de <i>Chromobacterium violaceum</i>
<i>gus</i>	Gene da β -Glucuronidase
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
MES	ácido morfolino-etanosulfônico
MS	Meio de cultura definido por Murashige & Skoog (1962)
<i>nptII</i>	Gene da neomicina fosfotransferase
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo
YD	Proteínas com repetições tirosina-ácido aspártico
YM	Meio de cultura com extrato de levedura e manitol
35S	Promotor do vírus do mosaico da couve-flor

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
SUMÁRIO.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Transformação genética de plantas como alternativa no controle de pragas e doenças.....	16
1.2. Estratégias no controle de fitonematóides.....	18
1.3. Potencial de bactérias no controle biológico de nematóides.....	21
1.4. Transformação de plantas com genes de origem bacteriana.....	23
1.5. <i>Chromobacterium violaceum</i>	25
2. OBJETIVO.....	32
2.1. Objetivo geral.....	32
2.2. Objetivos Específicos.....	32
3. MATERIAIS.....	33
3.1. Plantas.....	33
3.2. Bactérias.....	33
3.3. Enzimas.....	33
3.4. Plasmídeos.....	33
3.5. Reagentes e outros materiais.....	33
4. MÉTODOS.....	34
4.1. Clonagem das seqüências completa e parcial de CV1887 no vetor pGEM-T Easy.....	34
4.2. Purificação dos produtos de PCR amplificados e ligação no vetor de clonagem.....	35
4.3. Transformação de células de E. coli Top 10 com CV1887.....	37
4.3.1. Extração do DNA plasmidial.....	38
4.4. Subclonagem dos insertos completo e parcial de CV1887 no vetor de expressão pBI121.....	39

4.5. Transformação de células de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404 com CV1887.....	41
4.6. Transformação de segmentos foliares de fumo (<i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi) com insertos CV1887.....	43
4.7. Propagação <i>in vitro</i> e seleção dos clones de fumo transformados com o inserto CV1887.....	45
4.8. Delineamento experimental e análise estatística.....	46
4.9. Extração de RNA.....	47
4.10. RT-PCR.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1. Clonagem das seqüências completa e parcial de CV1887 e ligação dos insertos no vetor de clonagem pGEM-T Easy.....	49
5.2. Subclonagem dos insertos de CV1887 no vetor binário pBI121.....	53
5.3. Confirmação da transformação de células de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404 com insertos CV1887.....	56
5.4. Confirmação da transformação de plantas de fumo (<i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi) com insertos CV1887.....	60
5.5. Extração de RNA e RT-PCR.....	76
6. CONCLUSÃO.....	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transformação genética de plantas como alternativa no controle de pragas e doenças

O uso da biotecnologia, como ferramenta para controle de doenças, oferece grandes benefícios ao produtor, ao consumidor e ao ambiente. Além disso, a engenharia genética de plantas representa, atualmente, uma importante alternativa para investigação da função de genes de diversas origens e promovido uma alternativa para o controle de pragas e doenças com o desenvolvimento de variedades resistentes a insetos, fungos, vírus, bactérias e nematóides (BHAT; SRINIVASAN, 2002). Entretanto, apesar dos enormes custos associados ao desenvolvimento de organismos geneticamente modificados, poucas variedades comerciais resistentes estão disponíveis no mercado. Entre as plantas transgênicas cultivadas, as tolerantes a herbicidas são as mais produzidas, seguidas das variedades resistentes a insetos, transformadas com genes da bactéria *Bacillus thuringiensis*. (COLLINGE et al., 2008; DALAL et al., 2006).

Nelsen (2003) propõe uma nova classificação para os organismos geneticamente modificados dividindo-os em categorias. A divisão tem como objetivo ajudar a manter os valores culturais, a percepção e a identidade dos produtos derivados desses organismos, bem como uma informação mais precisa das origens da variabilidade genética nos organismos transformados. Dentro desta nova abordagem, Rommens et al. (2007) definem uma planta transgênica como aquela transformada com genes de espécies não relacionadas; plantas famigênicas como aquelas transformadas com genes provenientes de organismos pertencentes a mesma família; plantas intragênicas, como aquelas que contém elementos genéticos derivados de um mesmo grupo de compatibilidade sexual e uma planta xenogênica, a transformada com genes sintéticos.

As estratégias transgênicas e xenogênicas vêm sendo, atualmente, uma realidade para o melhoramento de culturas. O uso dessas plantas e suas peculiaridades tornam possível um aumento na eficiência da agricultura, a redução no uso de pesticidas e um aumento na produção, pela eliminação de traços indesejáveis e a introdução de genes responsáveis pelo desenvolvimento de cultivares resistentes a pragas e doenças (ROMMENS et al., 2007).

Os benefícios de culturas transgênicas resistente a insetos, por exemplo, são inúmeros, tanto no ponto de vista econômico quanto ambiental. Nos Estados Unidos, seis culturas geneticamente modificadas (canola, milho, algodão, mamão, abóbora e soja) cultivadas no ano de 2003, foram responsáveis por um aumento substancial na produção de

alimentos e fibras no país e uma grande redução no uso de pesticidas. No Brasil, variedades transgênicas expressando toxinas Bt como, o algodão, o milho e a cana-de-açúcar ainda estão em fase de pesquisa no campo (CHRISTOU et al., 2006; FONTES., 2003).

A engenharia genética de culturas com genes conferindo resistência a fungos também tem sido bastante documentada, pois representa uma estratégia promissora para o manejo de doenças causadas por fungos. No trabalho de Kalpana et al. (2006), foi demonstrado que linhagens de arroz superexpressando constitutivamente o gene *t1p* de arroz, que codifica para uma proteína similar a taumatina, com propriedades antifúngicas, tornaram-se resistentes ao fungo *Rhizoctonia solani*. Da mesma forma, Cober et al. (2003), relataram sobre a expressão de uma oxidase em plantas de soja. Essas plantas transformadas com o gene *OxO*, de germe de trigo, reduziram significativamente a progressão da doença causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

Diversos trabalhos reportam sobre a resistência de plantas transgênicas aos vírus. Powell-Abel et al. (1986) foram os primeiros a demonstrar que a expressão constitutiva de uma proteína do vírus do mosaico do tabaco (TMV) em plantas de fumo promoveu um nível de proteção significativo contra este vírus (FUCHS et al. 1996). Uma outra estratégia que atualmente vem sendo bastante difundida, está relacionada com o silenciamento gênico mediada pelo RNA. Qu et al. (2007), produziram plantas de fumo expressando um micro-RNA responsável por reduzir a multiplicação do vírus do mosaico do pepino (CMV), inibindo suas funções. Este vírus é um dos mais importantes que atacam vegetais, sendo também de difícil controle.

O desenvolvimento de cultivares transgênicas resistentes tem proporcionado uma nova estratégia para o controle de doenças de origem bacterianas. Segundo Qiu et al. (2008), plantas de arroz superexpressando *OsWRKY13* desenvolvem resistência à bactéria *Xanthomonas oryzae*, pela ativação das vias de defesa na planta e regulação de mais de 500 genes relacionados à resistência.

Plantas transgênicas resistentes ao ataque por nematóides fitopatogênicos também já foram desenvolvidas com sucesso, porém, nenhuma variedade comercial com essa característica está disponível ainda (ATKINSON et al., 2003). É necessário ressaltar que as perdas na produtividade das plantas causadas pelos nematóides chegam em cerca de 12,3% ao ano. Em algumas culturas, podem chegar a 20%, como, por exemplo, na banana (BIRD et al., 2003).

1.2. Estratégias no controle de fitonematóides

Os fitonematóides afetam todos os tipos de cultura, principalmente em regiões quentes. São responsáveis por causar grandes perdas na agricultura, superiores a 70 bilhões de dólares por ano (ZINOV'EVA *et al*, 2003; LI *et al*, 2007). A maioria destas perdas são atribuídas aos nematóides do gênero *Meloidogyne*, os nematóides de galhas, que invadem as raízes causando alterações morfológicas que permitem o desenvolvimento e a reprodução dos juvenis. A doença tem início quando juvenis do segundo estágio (J2), estágio infectivo, são atraídos por exsudatos radiculares, penetram na zona de alongação, migram intercelularmente pela lamela média até a zona meristemática alcançando o cilindro vascular. Neste local, eles se estabelecem formando sítios de alimentação com o desenvolvimento de células gigantes multinucleadas e adotam um estilo de vida sedentário (RIPOLL *et al.*, 2003; WILLIAMSON; KUMAR, 2006). Nematóides são fatores de estresse que se assemelham muito com agentes abióticos como frio, calor, seca. A infestação com espécies do gênero *Meloidogyne* resultam no aparecimento de espécies reativas de oxigênio nas raízes das plantas, a formação de intermediários tóxicos que induzem o estresse oxidativo, supressão do processo fotossintético e da respiração (KOENNING *et al.*, 1999).

A maior incidência de nematóides formadores de galhas ocorre em regiões tropicais. O representante deste gênero, causador de maiores danos econômicos, *Meloidogyne incognita*, é capaz de infestar mais de 2000 espécies de plantas (JUNG; WYSS, 1999). Esses endoparasitas causam perdas significativas na produtividade de diversas culturas, como por exemplo banana, soja e feijão. Algumas espécies são empregadas como modelos para o estudo de nematóides, como é o caso da leguminosa *Medicago truncatula* e da solanácea *Nicotiana tabacum* (ATKINSON *et al.*, 2004; DAVIS; MITCHUM, 2005).

O controle mais comum de nematóides é inadequado e muito dependente de nematicidas químicos prejudiciais ao ambiente. Um dos principais compostos nematicidas, o metilbrometo, causa danos à camada de ozônio. Além disso, o tratamento com nematicidas aumenta substancialmente os custos na agricultura. Giannakou *et al.* (2004), demonstraram a eficácia de um bio-nematicida baseado na bactéria *Bacillus firmus* e em outros aditivos não-químicos, sobre os nematóides de galhas. O bio-nematicida atua tanto sobre os juvenis de segundo estágio (J2), como também destruindo os ovos nas massas de ovos. O modo de ação mostrou-se tão eficaz quanto outros nematicidas já largamente usados na agricultura, como também quando comparado ao agente de bio-controle *Pasteuria penetrans*. Uma outra forma de controle, baseia-se no conhecimento de genes de resistência naturais (ATKINSON *et al*,

2003; RISTAINO; THOMAS, 1997). A resistência natural é definida pela habilidade das plantas em restringir ou prevenir a multiplicação de nematóides, não sendo capaz de protegê-las contra a invasão, mas somente de inibir o estabelecimento dos sítios de alimentação. No tomate, a formação de células gigantes é controlada pela atividade do gene *Mi* que induz uma resposta hipersensitiva na proximidade do sítio de infecção (MILLIGAN et al, 1998). Recentemente a busca por genes de resistência (genes R) tem sido grande e novas estratégias têm sido desenvolvidas. A partir de seqüências conhecidas de genes R são desenhados iniciadores para a amplificação de DNAs de diversas espécies de plantas, como por exemplo, batata, alface, arroz, *Arabidopsis*, milho, mandioca e outras espécies de angiospermas. As seqüências identificadas nestas plantas são denominadas genes de resistência candidatos (CHEN et al, 2007).

Dentro das estratégias de controle de nematóides, alguns estudos se baseiam na ação de inibidores de proteases sobre estas pragas (RYAN, 1990). Seu potencial contra nematóides foi primeiro explorado com a protease serínica do caupi. Plantas de batata expressando a protease do caupi, levaram a uma diminuição na quantidade e no tamanho de fêmeas de *Globodera pallida* e a uma redução na fecundidade de fêmeas de *M. incognita* (ATKINSON et al., 2003). Atualmente uma das melhores abordagens para o controle de nematóides, envolve estratégias antinutricionais com a expressão desses inibidores (HAQ et al., 2004). O potencial de inibidores de proteases cisteínicas, as cistatinas, para o controle de nematóides parasitas de plantas, tem sido demonstrado para uma variedade de espécies, como por exemplo, *Arabidopsis*, arroz e batata. Urwin et al. (1995) demonstraram que a orizocistatina, um inibidor de protease cisteínica, quando expressa em *hairy-roots* de tomate promoveu um efeito danoso no crescimento e desenvolvimento de *G. pallida*, levando a uma redução no tamanho das fêmeas afetando também a fecundidade. Em outra abordagem, Lilley et al. (2004) reportaram sobre a atividade de uma cistatina vegetal (OclΔD86) expressa em plantas de batata. As plantas transformadas exibiram $70 \pm 4\%$ de resistência ao ataque do nematóide *Globodera sp.* sob o controle do promotor ARSK1 e $67 \pm 9\%$ contra o *M. incognita*.

No trabalho conduzido por Atkinson et al. (2004), ficou demonstrado que plantas de banana expressando a cistatina de arroz são resistentes ao ataque do nematóide *Radopholus similis*, um importante patógeno desta cultura.

Dentre outros agentes que possuem um potencial na defesa de plantas contra nematóides, estão as lectinas. Elas são proteínas carboidrato-ligantes que contém pelo menos

um domínio não-catalítico que se ligam reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos. Atualmente tem sido visto que lectinas vegetais possuem propriedades citotóxicas, fungitóxicas, inseticida e nematicida, *in vitro* ou *in vivo* (LANNOO et al, 2007). Uma abordagem para o controle de nematóides é pela atuação da lectina nos receptores de manose na cutícula dos nematóides. Um significativo controle de *Meloidogyne incognita* foi conseguido no tomate, pela aplicação da lectina manose específica, a Concanavalina A (Con A) e da aglutinina *Limax flavus*, no campo (GRIFFITHS et al, 2000).

A avaliação de uma lectina recombinante como potencial agente nematicida foi feito por Ripoll et al. (2003). Nesse trabalho, plantas de *Arabidopsis thaliana* expressando a lectina de *Galanthus nivalis* (GNA), sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S, apresentaram-se fortemente resistente ao ataque do nematóide *M. incognita*.

Nos últimos anos o RNA de interferência (RNAi), é um dos tópicos mais estudados dentro da biologia molecular como uma alternativa para controle de doenças e pragas. Inicialmente descoberto em *Caenorhabditis elegans* por Fire et al. (1998), foi descrito em plantas como um mecanismo pós-traducional de silenciamento gênico e atualmente representa uma nova ferramenta para investigar e entender o funcionamento de genes em diversos organismos, incluindo os nematóides (GHEYSEN; VANHOLME, 2007; LILLEY, 2007). Em nematóides, RNAs dupla-fita de mais de 100 pb são capazes de induzir silenciamento. Os genes alvo para os RNAi são expressos em diferentes tecidos e tipos celulares, a ingestão destes RNAs pelos nematóides pode levar ao silenciamento de genes no intestino, no sistema reprodutor feminino e nas glândulas do parasita (LILLEY et al., 2005; BAKHETIA et al., 2005). O controle de nematóides parasitas de plantas por esta técnica vêm sendo intensamente investigado. Plantas podem ser transformadas, induzidas a produzir RNAs dupla-fita responsáveis por silenciar genes essenciais no nematóide.

Plantas de fumo expressando RNAs dupla-fita com alvo para o nematóide *Meloidogyne javanica* foram responsáveis por induzir o silenciamento do fator de transcrição MjTis11. Os resultados demonstraram que as plantas podem ser usadas como um sistema de entrega capaz de induzir o silenciamento em parasitas como os nematóides de galhas (FAIRBAIRN et al., 2007)

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um inibidor neurosináptico que pode atuar interferindo no sistema nervoso de invertebrados. Os níveis desta substância nas plantas é baixo, mas aumenta em resposta a diversos estímulos. A superexpressão de enzimas chave na síntese de GABA, em plantas de fumo, permitiu que as plantas apresentassem uma resistência aos nematóides de galhas. Houve uma grande redução no número de massas de

ovos nas plantas transformadas quando comparadas às plantas controle (MCLEAN et al, 2003). Além das várias estratégias disponíveis no controle de nematóides, muitos trabalhos mostram que algumas bactérias possuem um papel no controle destes parasitas.

1.3. Potencial de bactérias no controle biológico de nematóides

Nematóides são organismos susceptíveis ao ataque por algumas bactérias. As bactérias representam numericamente os organismos mais abundantes no solo e algumas delas, membros dos gêneros *Pasteuria*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, têm mostrado um grande potencial na defesa de plantas contra o ataque de nematóides fitopatogênicos (TIAN et al., 2007; EMMERT; HANDELSMAN, 1999).

Bactérias usadas no biocontrole de nematóides podem ser agrupadas em bactérias parasitas e em rizobactérias não-parasitas. O mecanismo de ação destas bactérias sobre os nematóides pode ser dado de diversas formas, como por exemplo: pelo parasitismo, produção de toxinas, antibióticos ou enzimas, reconhecimento patógeno-hospedeiro, competição por nutrientes, indução da resistência sistêmica das plantas ou promoção da saúde vegetal (SIDDIQUI; MAHMOOD, 1999).

Os membros do gênero *Pasteuria* são bactérias parasitas obrigatórias de fitonematóides (BEKAL et al., 2001). Esporos de *Pasteuria* se fixam na cutícula de juvenis de segundo estágio, germinam e degeneram o sistema reprodutivo das fêmeas dos nematóides, representando o primeiro passo no processo de infecção (DAVIES et al., 2000). Experimentos visando o controle de nematóides de cisto e de galhas por meio da aplicação de *Pasteuria penetrans* indicaram que esta bactéria é eficaz na redução da multiplicação do nematóide. Além de ser um bom agente de biocontrole, esta bactéria também permite a redução da infectividade de juvenis (SIDDIQUI; MAHMOOD, 1999).

Outros gêneros de bactérias parasitas oportunistas também são capazes de penetrar a barreira de cutícula para infectar e matar os nematóides. *Brevibacillus laterosporus*, por exemplo, apresenta um largo espectro de atividades biológicas, sendo capaz de matar nematóides dos gêneros *Heterodera*, *Trichostrongylus*, *Bursaphelenchus* e *Panagrellus*. O mecanismo de ação desta bactéria está envolvido com a degradação de todos os componentes da cutícula do nematóide, sugerindo o envolvimento de enzimas hidrolíticas (TIAN et al., 2007; HUANG et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2004).

Rizobactérias também têm sido intensamente estudadas para o controle biológico de nematóides. O mecanismo e ação destas bactérias deve estar envolvido com a ação de

antibióticos produzidos por elas e pela indução da resistência sistêmica (SIDDIQUI; MAHMOOD, 1999; SIDDIQUI; SHAUKAT, 2002; SIDDIQUI; SHAUKAT, 2003). Bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são as mais representativas no solo responsáveis por antagonizar os efeitos dos nematóides (TIAN et al., 2007). Hamid et al. (2003) demonstraram que *Pseudomonas fluorescens* CHA0 possui um efeito significativo na mortalidade de nematóides. O tratamento do solo com esta cepa reduziu a penetração de juvenis de *Meloidogyne javanica* em raízes de *Vigna radiata*, quando adicionou-se molibdato de amônia. O molibdato foi responsável pelo aumento na produção de compostos nematicidas pela bactéria.

Diversos trabalhos também apontam para o potencial nematicida de espécies do gênero *Bacillus* (TIAN et al., 2007). *Bacillus thuringiensis* (Bt) foi identificada como bactéria que produz toxinas Cry que possuem toxicidade a insetos pertencentes às ordens Lepidoptera, Díptera e Coleoptera (MAAGD et al., 2001). As bactérias desse gênero formam endósporos sob condições adversas, e concomitantemente, formam inclusões cristalinas contendo uma ou mais proteínas inseticidas. Essas proteínas são tóxicas para insetos quando ingeridas, usualmente atuando nas células epiteliais do intestino desses organismos (CHARLES; NIELSEN-LEROUX, 2000). Outros estudos demonstram que estas bactérias são tóxicas a nematóides e protozoários. Atualmente existem seis proteínas Cry conhecidas por sua toxicidade às larvas de nematóides parasitas ou de vida livre (TIAN et al., 2007). No estudo de Marroquin et al. (2000) foi demonstrado a atividade da toxina Bt Cry5B contra o nematóide *Caenorhabditis elegans*. O mecanismo de ação destas toxinas Bt está relacionado com a formação de poros na membrana celular das células do epitélio intestinal dos nematóides levando à degradação do intestino do parasita e a uma severa redução na fertilidade. Algumas cepas de *B. thuringiensis israelensis*, *B. thuringiensis kurstaki* e *B. sphaericus* mostraram uma atividade significativa sob ovos e larvas do nematóide *Trichostrongylus columbriformis* (TIAN et al., 2007).

Siddiqui et al. (2007) demonstraram que as bactérias *Pseudomonas putida*, *P. alcaligenes*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus pumilus* e *Rhizobium* sp causaram grande efeito inibitório na eclosão de ovos de *M. javanica* e na penetração de juvenis nas raízes de lentilha resultando em uma redução no número de galhas. Essas espécies de bactérias estão enquadradas em um grupo de rizobactérias responsáveis por promover o desenvolvimento vegetal, melhorando a germinação, o desenvolvimento da raiz, a nutrição mineral e a utilização de água. O uso destas bactérias na agricultura para o biocontrole de patógenos de plantas tem se mostrado uma alternativa promissora (NELSON, 2004).

Outros grupos de bactérias que atuam no controle de nematóides são as bactérias endofíticas, que colonizam o tecido interno da planta mas não exibe nenhum sinal externo de infecção ou efeito negativo na planta. São responsáveis por promover o crescimento vegetal, inibindo o desenvolvimento de doenças e pragas. A prevenção da doença pode ser explicada, pelo fato dessas bactérias apresentarem a capacidade de acelerar o desenvolvimento da planta, promover o estabelecimento sob condições adversas e também pela capacidade de sintetizar *de novo* metabólitos com atividade contra microrganismos. Além disso, certas espécies são responsáveis por desencadear um fenômeno conhecido como resistência sistêmica, ativando os mecanismos de defesa da planta (RYAN et al., 2008; TIAN et al., 2007). As bactérias *Photorhabdus luminescens* e *Xenorhabdus nematophila* vêm sendo intensivamente estudadas, como alternativas ao *B. thuringiensis* (MOAR, 2003). São bactérias simbioses de nematóides entomopatogênicos que promovem a morte de insetos fornecendo nutrientes para a reprodução do nematóide (BOENARE et al., 1997). Alguns trabalhos já mostram efeitos destas bactérias sobre os nematóides, pela produção de compostos de defesa (SAMALIEV et al., 2000).

Cronin et al. (1997), avaliaram o potencial de duas cepas de bactérias, isoladas do solo, em interferir na eclosão de ovos do nematóide *Globodera rostochiensis*. As bactérias foram identificadas como sendo das espécies *Stenotrophomonas maltophilia* e *Chromobacterium sp.*, e são capazes de produzir quitinases, que irão atuar degradando a quitina constituinte da casca dos ovos de nematóides.

1.4. Transformação de plantas com genes de origem bacteriana

O fumo (*Nicotiana tabacum*) é uma planta modelo de transformação genética largamente utilizada na pesquisa por diversas razões: sua genética é bem estabelecida e compreendida, com isso, pode ser facilmente transformada, sobrevive bem em condições adversas tanto *in vitro* como em casa de vegetação e produz uma grande quantidade de biomassa. São, também, modelos ideais para o estudo de interações planta-patógeno, de respostas ambientais, regulação do crescimento e senescência. É a planta mais comumente usada para experimentos de transformação e expressão de genes das mais variadas fontes, principalmente genes de origem bacteriana (JUBE e BORTHAKUR, 2007).

Muitos genes bacterianos envolvidos na patogenicidade têm sido identificados e expressos em fumo. As plantas geneticamente transformadas com esses genes mostram uma ativação espontânea nos mecanismos de defesa, melhorando a habilidade da planta em reagir

à invasão do patógeno (JUBE; BORTHAKUR, 2007). A exemplo disso, plantas de fumo transformadas com gene *argK* de *Pseudomonas syringae*, tornam-se resistentes à ação da toxina desta bactéria em quase 100% (HATZILOUKAS; PANOPOULOS, 1992). Em uma outra abordagem, Mae et al. (2001) demonstraram que o gene *expI*, da bactéria *Erwinia carotovora*, quando expresso em plantas de fumo promove um aumento na resistência da planta ao ataque da bactéria, que é responsável por causar doenças em diversas variedades comerciais como cenoura, batata, alface, tomate e cebola.

Além dos genes envolvidos na patogenicidade uma abordagem que atualmente vem sendo bastante empregada é o uso de toxinas da bactéria *B. thuringiensis* (Bt) como inseticidas naturais na agricultura. Estas toxinas oferecem uma boa alternativa contra o uso de agrotóxicos pois não são tóxicas aos vertebrados, são benignas ao ambiente e podem ser geneticamente transformadas nas culturas, proporcionando uma proteção constante (MARROQUIN et al., 2000).

A maioria das culturas, transformadas com genes de *B. thuringiensis*, portam um único gene *cry*, que é inserido no cromossomo, expressando a proteína Bt constitutivamente. Kota et al. (1999) transformaram plantas de fumo com o gene *cry2Aa2*. A superexpressão da proteína de origem bacteriana na planta foi responsável por causar 100% de mortalidade dos insetos *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea* e *Spodoptera exigua*.

Além das proteínas Cry, diversas outras proteínas recombinantes bacterianas já foram expressas em plantas de fumo como por exemplo: a citocinina isopentenil transferase de *A. tumefaciens* que causa resistência a insetos (SMIGOKI et al., 1993), a redutase do mercúrio de *E. coli* utilizada na degradação do mercúrio (HE et al., 2001), a proteína CTB de *Vibrio cholerae* utilizada como vacina contra cólera (DANIELL et al., 2001), a proteína EPSPS de *E. coli* que causa tolerância ao glifosato (WANG et al., 2003), a proteína PA de *B. anthracis* utilizada como vacina contra o antrax (WATSON et al., 2004).

De acordo com Jube e Borthakur (2007), nenhuma abordagem foi feita relatando a expressão de proteínas de origem bacteriana com potencial contra nematóide em plantas de fumo. Alguns poucos estudos têm mostrado que algumas toxinas Bt podem ter efeitos deletérios em nematóides. Classes específicas de toxinas Bt nematicidas, Cry5 e Cry6, possuem efeitos tóxicos potentes em várias espécies de nematóides, como *Caenorhabditis elegans*, *Panagrellus redivivus* e *Pristionchus pacificus* (HOSS et al., 2008; WEI et al., 2003).

Hoss et al. (2008) produziram plantas de milho expressando a toxina Bt, Cry1Ab. O cultivo do milho transgênico no campo afetou a reprodução e o crescimento do nematóide *Caenorhabditis elegans*. Li et al. (2007), por sua vez, demonstraram que as proteínas Cry5 e

Cry6 de *B. thuringiensis*, expressas em plantas de tomate intoxicam o nematóide *M. incognita*. O mecanismo de ação das proteínas Cry requer que elas sejam ingeridas. No trabalho foi comprovada a capacidade do nematóide em ingerir a proteína Cry6A de 54 kDa.

Muitos genes têm sido identificados codificando proteínas que podem ser utilizadas no controle de nematóides fitopatogênicos. Na anotação do genoma da bactéria *Chromobacterium violaceum* foram identificadas ORFs codificando pra proteínas de grande interesse na agricultura.

1.5. *Chromobacterium violaceum*

C. violaceum é uma bactéria saprófita não-patogênica, Gram-negativa e aeróbica facultativa, encontrada em amostras de solo e água de regiões tropicais e subtropicais de diversos continentes (Figura 1). Essa bactéria está presente em grande quantidade nas águas do Rio Negro, na Amazônia. Ocasionalmente, pode atuar como um patógeno oportunista em animais e homens e causar septicemia fatal a partir de lesões na pele, produzindo abscessos no fígado e pulmão. Verificou-se que essa bactéria poderia causar infecções em animais, como búfalo, porcos, macacos, ovelhas e cães. Alguns casos de infecções sérias e mesmo fatais, em humanos, foram reportados em alguns países, inclusive no Brasil. Aparentemente a incidência de infecção por *C. violaceum* em humanos é baixa (DURÁN et al., 2001).

Os primeiros relatos de atividade biológica da *C. violaceum* foram publicados no final da década de 40, quando os cientistas Kidder e Stuart (1939) e Burbank (1942) reportaram suas observações sobre protozoários ciliados que eram rapidamente mortos quando expostos a culturas de *C. violaceum*, sendo a violaceína considerada a responsável pela ação (DURÁN et al, 2001).

A violaceína é um pigmento indólico, de cor púrpura e derivado do L-triptofano, produzido por essa bactéria. Assim como muitos outros microrganismos do solo, a *C. violaceum* secreta metabólitos secundários – incluindo a violaceína – como substâncias de defesa contra competidores e/ou predadores (STEPHENS, 2003). Durán e Menck (2001), relataram que a violaceína apresenta atividade antifúngica, antiviral, atitumoral e antibiótica. Apesar da variedade de metabólitos de interesse médico (antibióticos, potenciadores de antibióticos, drogas antitumorais e enzimas) produzidos por *C. violaceum*, o potencial biotecnológico dessa bactéria ainda é pouco estudado, e merece estudos mais aprofundados. Dentre os aspectos biológicos interessantes dessa bactéria, está sua capacidade de hidrolisar

filmes plásticos de celulose, devido provavelmente à ação de hidrolases. Processos mais complexos também foram relatados, como a desnitrificação e solubilização do ouro.

Tendo em vista o potencial biotecnológico de *C. violaceum* ATCC 12472, o genoma desta bactéria foi completamente sequenciado por um consórcio de laboratórios, integrantes do Projeto Genoma Brasileiro. Com isso, foi possível obter um panorama mais detalhado da complexidade molecular requerida para se entender a versatilidade desse organismo, assim como um extenso compêndio de ORFs que significativamente aumentou o potencial biotecnológico dessa bactéria (VASCONCELOS *et al.*, 2003; *Brazilian National Genome Project Consortium*: www.brgene.lncc.br).

Alguns trechos do genoma com interesse biotecnológico, já eram conhecidos antes do início das atividades do Projeto Genoma Brasileiro - Rede Nacional de Sequenciamento de DNA. Entre eles estão os genes envolvidos na biossíntese da violaceína, da fenilalanina hidroxilase, da sintetase do ácido polihidroxialquílico, fragmentos genômicos contendo *orfD* (homólogo a SoxR de *Escherichia coli*) e seqüências de genes que codificam RNAs ribossomais 16S e 23S. Entretanto, apesar de alguns trechos do genoma da *C. violaceum* terem sido estudados, esses se basearam no conhecimento de somente uma pequena fração da constituição genética do organismo (AUGUST *et al.*, 2000; VOLNER *et al.*, 2000; KOLIBACHUK *et al.*, 1999; HUISMAN *et al.*, 2000).

Além do *operon* responsável pela síntese do pigmento violaceína, existem muitas outras ORFs codificando produtos de interesse médico e biotecnológico. Por exemplo, a detoxificação ambiental pode ser mediada por uma dehalogenase ácida (CV0864), possivelmente ativo em xenobióticos ou produtos metabólicos e também por um *operon* para resistência a arsênico (CV2438 e CV2440) e enzimas que catalisam a hidrólise de cianato. O cianeto pode ser usado para a solubilização de ouro por meio de um processo livre de mercúrio, que evita a contaminação ambiental, além de estar associado com a supressão de doenças fúngicas de raízes (LAVILLE *et al.*, 1998; JANSSEN *et al.*, 1994; ANDERSON *et al.*, 1990; SMITH e HUNT, 1985; CAMPBELL *et al.*, 2001).

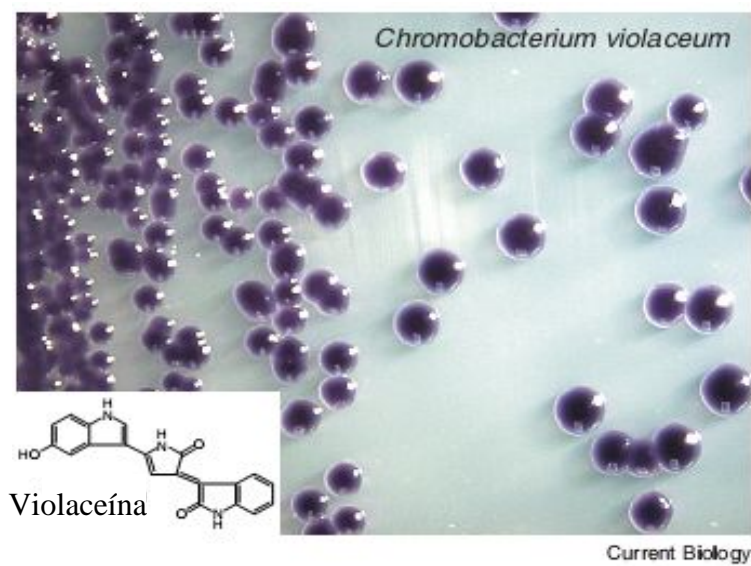


Figura 1: Colônias de *Chromobacterium violaceum* (Fonte: Current Biology, v.14, 2004)

As sequências encontradas em *C. violaceum*, de interesse para a agricultura, são aquelas que codificam para quitinases (CV2935, CV3316 e CV4240). As quitinases são enzimas capazes de hidrolisar a quitina, um polímero linear de N-acetil-D-glucosamina, cujos resíduos são unidos por ligações β -(1-4). A quitina é encontrada na cutícula de insetos e nematóides, na carapaça de crustáceos e na parede celular de muitos fungos. Portanto, pela ação hidrolítica que apresentam sobre a quitina, os efeitos inseticida, fungicida e nematicida de várias quitinases isoladas de diferentes organismos revelam o potencial dessas enzimas para a proteção de plantas (LAMB et al., 1992; FUKAMIZO, 2000; HEIL e BOSTOCK, 2002; CHEN et al., 1996)

A *C. violaceum* apresenta também ORFs para a síntese de compostos relevantes para a medicina, incluindo uma *polyketide synthase* (CV4293) e outras proteínas aplicáveis à síntese de antibióticos, genes para a síntese de *phenazine* (CV0931 e CV2663) com potencial atividade antitumoral e hemolisinas (CV0231, CV0513, CV1918, CV3342 e CV4301) como anticoagulantes. Já está estabelecido que *C. violaceum* tem a capacidade para a síntese de polímeros *polyhydroxyaldanoate*, que têm propriedades físicas similares às do propileno, tornando-os importantes fontes renováveis de plástico biodegradável. Vasconcelos et al. (2003) identificaram ORFs relacionadas à biossíntese de celulose (CV2675, CV2677 e CV2678) diferente daquelas produzidas por plantas; em estrutura tridimensional, grau de polimerização e propriedades físico-químicas (VASCONCELOS et al., 2003; CAMPBELL et al., 2001; FLEISCHMANN et al., 1995; ROMLING, 2002).

Vasconcelos et al. (2003) identificaram a ORF CV1887 de *C. violaceum*, cujo produto apresenta similaridade com a “proteína nematicida 2” de *Xenorhabdus bovienii* (número de acesso no GenBank: CAC19493) e com proteínas contendo repetições YD (tirosina-ácido aspártico) de outras bactérias. Cada repetição YD tem um comprimento de cerca de 20 aminoácidos, com a sequência consenso **Gx3-9YxYDx2GR(L, I ou V)x3-10G**, onde **x** representa qualquer aminoácido (Figura 2). As teneurinas, família de proteínas transmembrana conservadas entre vertebrados e invertebrados, são as únicas proteínas de eucariotos que apresentam tais repetições YD. Nos procariotos, repetições com esse motivo foram inicialmente detectadas nas proteínas codificadas pelos elementos *Rhs* (*rearrangement hot spot*) de *Escherichia coli* e na proteína WAPA (*Wall Associated Protein A*) de *Bacillus subtilis*. A função das proteínas *Rhs* ainda está sendo estabelecida, mas propõe-se que elas são proteínas que promovem a interação com ligantes associados à superfície celular, baseado em sua similaridade com WapA (MINET; CHIQUET-EHRISMANN, 2000; FEULNER et al., 1990; SADOSKY et al., 1991; ZHAO et al., 1993; FOSTER, 1993).

Vasconcelos et al. (2003) verificaram a existência de seqüências codificando proteínas contendo diferentes números da repetição YD, no genoma da *C. violaceum* incluindo: CV1887 (Figura 3) com 10 repetições; CV1238, com 12 repetições; CV1431, com 16 repetições; e CV2776 e CV1429, com 4 e 3 repetições, respectivamente.

Minet et al. (1999) demonstraram que as repetições YD da Teneurina-1 de galinha, ligam-se a heparina. Esses autores então propuseram essa repetição como um novo domínio de ligação a carboidratos. Entretanto, estudos semelhantes ainda não foram realizados em proteínas bacterianas com repetições YD. Se esses motivos são responsáveis pela interação com carboidratos observada para as teneurinas, é possível que o mecanismo de ação das toxinas de TccC, SepC e XptB1, das bactérias *P. luminescens*, *S. entomophila* e *X. nematophyllus*, respectivamente, envolva a ligação dessas proteínas com carboidratos de insetos e nematóides suscetíveis, a exemplo do que se observa com outras classes de proteínas como as lectinas e as quitinases (MURDOCK et al., 1990; HUESING et al., 1991; FUKAMIZO, 2000; HEIL; BOSTOCK, 2002).

```

1      GFSMGGFIKYDRL--RRLILILASG
2      GHALYLSWDS PGAGRLRLKEVRDEEKRT
3      GRSRRESISFE-YDDA--GQLIKQTMSDG
4      GNTVAYG-YDPL--GRLKTQT
5      GWKTVRTHLYDEA--GRQARTT VT
6      GKPVTLSKTTEREWD SW--GQLSVERELETG
7      SVASWG-WDGA--HRLRRAT
8      SHATGYR-YDAW--GRTVEIVLPDG
9      GVETVAGTQKFDGL--GRLKRTESEG
10     GGAQSAWDRWP SGRLREETHDIRSG
11     TVTLAYDGL--QRLCSWTARDG
12     GHALATTLEFDSL--GRETKRTLAAES
13     GKPFCDETFV-YDAR--NRLKDYAASG
14     GYPFAIELKYDQA--GRLERDEAG
15     GRRLSYDAL--GRLARVEG
16     GSASYG-YDAH--DRLVCQRVETSG
          *      * *      * * *

```

G_{x3-9}Yx Y Dx₂ G R (L, I ou V) x₃₋₁₀ G

Figura 2: Alinhamento das seqüências consenso das repetições YD da proteína CV1887 de *Chromobacterium violaceum*.

MADNTGIYSQAFNFSSAVNGGVDPRTGLFSFNFDLGILSANQGLTPALPL
 RIAYFPLAAGESSDGLGK**GFSMGGFIKYDRLRRLILASG**ERYRLLEDSD
 APVFIRQLKLDVVRVHRTVADGVRRYRIVLKNGEIHHLSAPWGPDIYVPE
 KIQSPL**GHALYLSWDS**PGAG**GRLRLKEVRDEEKRTL**FRIDYPNADGERVAI
 TQWPDSDEKVALELYFQNGYLHRIVNKSLSGNGDVEWTLGYETDSKVAD
 AVGGLLLNELTAPTGLAQRVRYEPLCMKLQGERSDFGLPAVVLHSLVPEA
 GQPAINTHYEYSPANYLGYGASFSGSGGGADELFDIQVPYTYQSTEKLLD
 KSLNPAKPIRTTVRKYNFHLVSEEVREGACVFRQETAYPAKVGQSYEA
 QPATFQLPVRQTSWEAA**GRSRRESISFEYDDAGQLIKQTMSDGS**ITVLE
 YPPPAGEPGHCPADAEGFGRYLKSCTVFPVSVAEYGDAMMRTYVFRSI
 RTRPGSAHAEAAILQQTVSHYAGMPGPKARAAMLGGKPSWEAYQPRQLAKE
 S**YD**YLDAPAQKDHGRIKKRIAVVYGEDRTPYEMVQDFVFEPVRSNGNEVA
 LKQTVSVTVKEDPLEKKDGKLQKVSSTRVLSVLTGRLLSETDVL**GNTVAY**
GYDPLGRLKTQTAHPDLKAYRAIARWDYLWPSTKNGTPAMAIHTDALGNQ
 TRTSHDGLGRMIREEACDRDGG**LGWKTVRTHLYDEAGRQARTTVT**DVVHD
 RE**GKPVTL**SKTT**EREWDSWGQLS**VERELET**GLASRQEIDPIAQTVATWQA**
 GTDRCSAKYMNFYSGSHDLERRIVLAYHLESRSWDAEDKPY**SVASWGWD**
GAHRLRRATDEMSHATGYRYDAW**GRTVEIVLPDG**SAVRKQYAPFSQAALP
 TQISVADK**GVETVAGTQKFDGLGRLKR**TES**G**GRPTRFEYASDAASSPRTV
 TGPDGRVQVYAVDDRLGEALKSVAAPDHQGLGVSPIQQTYSYLLPMGLL
 HEAEV**GGAQSAWDRWPSGRL**REETHDIR**S**GKKKAHYRYSLTGNLEGGA
 DIDGAAHARSYETAAAHVGKLIETADAAV**TVTLAYDGLQRLCSWTARDGR**
GHALATTLEFDSLGRETKRTLAAESAEATLSQEWYPNGQLHQKRSE**GG**
 KPFCDETFV**YDARNRLKDYAASG**PGLPKDAYGNAIRGQKFEFDAFNNIRK
 CTTVLDGGSENVGEYLFENPADPCQLTKVTNSALDK**GYPPAIELKYDQAG**
RLERDEAGRRLSYDALGRLARVEGGGGSASYGYDAHDRLVCQRVETS**GMD**
 HRLYYRANRLVNEWMTRSGQAPGADDDRVRLVYAAGSCAAQVNEGDDGSV
 AALMGTDGKGSIVSQAEGGQAKHYAYTPYGHQSSP

Figura 3: Sequência de aminoácidos da proteína codificada pela sequência CV1887 de *Chromobacterium violaceum*. As regiões contendo motivos completos ou parciais da repetição YD estão destacadas, assim como os resíduos conservados dentro de cada repetição em relação à sequência consenso.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Visando validar as propriedades determinadas *in silico*, o presente trabalho tem por objetivo obter plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) transformadas com o gene cv1887.

2.2. Objetivos Específicos

- Clonar o fragmento completo de CV1887 (4.155 pb) e o fragmento parcial, rico em repetições YD (2.642 pb) no vetor binário pBI121.
- Introduzir os vetores binários contendo os insertos em células de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404.
- Transformar geneticamente plantas de fumo com os insertos cv1887.
- Avaliação da expressão de CV1887 pela análise dos transcritos.

3. MATERIAIS

3.1. Plantas

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

3.2. Bactérias

Escherichia coli Top 10 foi usada nos experimentos de clonagem dos insertos CV1887 para expressão em plantas de fumo. *Agrobacterium tumefaciens* estirpe LBA4404 foi utilizada nos experimentos de transformação de plantas de fumo com o inserto CV1887 de *Chromobacterium violaceum* estirpe ATCC 12472.

3.3. Enzimas

As enzimas de restrição *Xba* I (10 U/ μ L), *Sst* I (*Sac* I – 10 U/ μ L), e a DNA ligase T4, acompanhadas dos seus respectivos tampões de reação 10x, foram obtidos da JENA Biosciences e Invitrogen. A Platinum *Taq* DNA polimerase (500 U/mL), acompanhada do tampão de reação 10x, foi adquirida da Invitrogen e a *Go Taq* Hot Start polimerase (500 U/mL) acompanhada do tampão de reação, adquirida da Promega.

3.4. Plasmídeos

O vetor pGEM-T Easy (Promega)::CV1887 foi usado como DNA molde nas reações de PCR para experimentos de clonagem. O plasmídeo pBI121 (14.758 pb), AF485783- Invitrogen, foi usado como vetor de clonagem dos insertos cv1887 em células de *Escherichia coli* e para transformar células de *A. tumefaciens* estirpe LBA4404.

3.5. Reagentes e outros materiais

Oligonucleotídeos iniciadores complementares ao gene cv1887 foram sintetizados pela Prodimol Biotecnologia. Os kits de purificação de DNA (GFX DNA) foram adquiridos da Amersham Biosciences. Meios de cultura utilizados foram: para *E. coli* (2xYT, LB), *A. tumefaciens* (YM) e meio para cultivo *in vitro* de plantas (meio MS, Gibco). Antibióticos (estreptomicina, carbenicilina, estreptomicina, cefotaxina e canamicina) e demais reagentes eram todos de grau analítico.

4. MÉTODOS

4.1. Clonagem das seqüências completa e parcial de CV1887 no vetor pGEM-T Easy

Iniciadores foram desenhados com base na seqüência completa e parcial da ORF CV1887 de *C. violaceum* ATCC 12472 cuja seqüência encontra-se depositada no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov.br) com o número de acesso NC 005085. As seqüências dos iniciadores são mostradas na Tabela 1 e foram desenhadas com sítios de restrição para as endonucleases *Xba* I e *Sst* I. A seqüência completa da ORF CV1887 é constituída de 4.155 pb com 10 repetições YD e a seqüência parcial de 2.642 pb com 8 repetições YD.

TABELA 1 - Seqüência dos oligonucleotídeos usados na amplificação dos insertos CV1887

Insertos	Iniciadores CV1887-for : CV1887-rev	Seqüências Codificadoras
CV1887- seqüência completa	<i>GCTCTAGACCACCATGGCGGATAATACGGGAATT</i> : <i>CGAGCTCTCAGGGCGACGATTGATGGCC</i>	seqüência completa de CV1887
CV1887- seqüência parcial	<i>GCTCTAGACCACCATGGGACGTTCCCGGAGGGA</i> : <i>CGAGCTCTCAGCCGGATGTTTCCACCCTC</i>	seqüência parcial de CV1887

* Os sítios de restrição para as enzimas *Sst* I e *Xba* I estão evidenciados em itálico, enquanto as regiões complementares a seqüência do gene *cv 1887* estão marcadas em negrito; Códon de iniciação (ATG) e terminação (TCA) estão sublinhados.

Os insertos referentes à seqüência completa e parcial de *cv 1887* foram amplificados por PCR, em uma reação de 25 µL contendo: 1,0 µL do DNA plasmidial de *Chromobacterium violaceum*, 2,5 µL do tampão de reação (Tris-HCl 100 mM, pH 9,0; MgCl₂ 15 mM e KCl 500 mM), 5,0 µL da solução de dNTP's (1,0 mM), 2,5 µL de cada iniciador (cada um na concentração 5,0 µM), 1,0 µL de *Taq* DNA polimerase e 10,5 µL de água ultra

pura estéril. Para as reações controle, não foi feita adição do DNA molde, sendo o volume da reação completado com água.

Para a amplificação dos fragmentos foi criado um programa que consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 3 min, uma etapa de anelamento a 65 °C por 15 seg e uma etapa de extensão a 72 °C por 2 min. Esse ciclo foi repetido 29 vezes e ao final da reação uma alíquota de 5 µL de cada reação foi retirada, misturada com 2 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30% em TE pH 8,0) e aplicada em gel de agarose 0,8% para a confirmação da amplificação.

4.2. Purificação dos produtos de PCR amplificados e ligação no vetor de clonagem

Confirmada a amplificação do gene, este foi submetido a uma purificação do gel de agarose, utilizando o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare Life Sciences), de acordo com as especificações do fabricante. Após a leitura da absorbância a 260 nm dos produtos purificados, foram feitas quatro reações de ligação nas proporções inserto: vetor de 3:1 e de 5:1 para CV1887 com a sequência completa e com a sequência parcial.

Os produtos de PCR foram, então, utilizados em uma reação de ligação com o vetor pGEM-T Easy (Promega) – Figura 4. A reação consistiu na adição de 5 µL do tampão *2x rapid ligation* (60mM Tris-HCl-pH 7.8, 20mM MgCl₂, 20mM DTT, 2mM ATP, 10% polietileno glicol) , 1 µL de pGEM-T Easy (50 ng/µL), 1µL de T4 DNA ligase (3U/µL) e 5 µL do produto da PCR.. A reação foi incubada a 4 °C por 16h no termociclador PTC-200 (MJ Research).

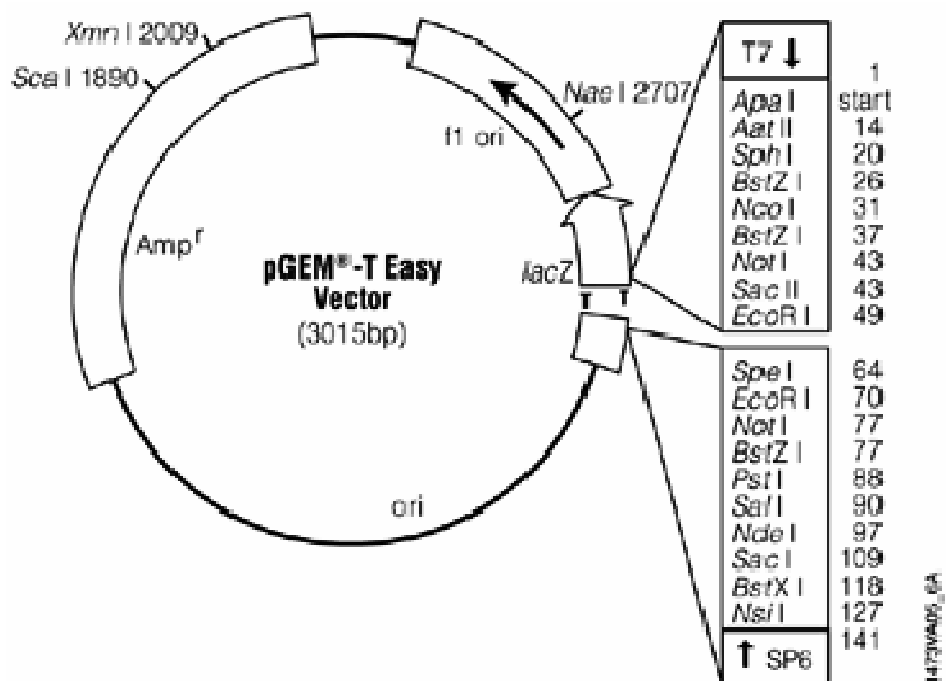


Figura 4: Mapa circular e pontos de referência do vetor de clonagem *pGEM-T Easy Vector Multiple Cloning Sequences*. Fonte: Promega.

4.3. Transformação de células de *E. coli* Top 10 com CV1887

Os produtos das reações de ligação foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* Top 10 por meio de eletroporação. As células foram preparadas de acordo com o protocolo fornecido pelo prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro – UNESP/Jaboticabal – descrito a seguir: uma colônia isolada de *E. coli* Top10 foi inoculada em meio Circle Grow contendo 30 µg/mL de estreptomicina. O inóculo foi incubado a 37 °C, sob agitação constante (250 rpm), por um período de aproximadamente 16 horas. Após este período, uma alíquota de 2,0 mL do pré-inóculo foi transferida, e condições estéreis, para 200 mL de meio Circle Grow. A nova cultura foi incubada nas mesmas condições anteriormente descritas, até que a OD_{600} de 0,6 fosse obtida, quando então o erlenmeyer foi colocado em banho de gelo por 30 minutos. Ao final do período de incubação, a suspensão de células foi centrifugada a $1.500 \times g$, por 5 minutos a 4 °C, para coleta das células. O precipitado foi lavado em solução de glicerol 10% estéril resfriada a -20 °C. Essa etapa de centrifugação e lavagem foi repetida, e então o precipitado foi ressuspensão em 200 µL de meio GYT (glicerol 10 %, extrato de levedura 0,125 %, triptona 0,25 %). As células foram incubadas em banho de gelo até o momento da transformação.

Na eletroporação foram utilizados 10 µL do produto da reação de ligação e 50 µL de uma suspensão celular de *E. coli* Top 10 eletrocompetente. A mistura foi adicionada à cubetas de eletroporação com espaço interno de 2,0 mm (Eppendorf) e no tratamento controle, não foi feita a adição da reação de ligação, sendo o volume da reação completado com água. O procedimento foi realizado em um eletroporador Eppendorf modelo 2510, no qual as cubetas, previamente resfriadas, foram colocadas e submetidas a um pulso de 2,5KV. As células transformadas foram ressuspensas em 1 mL de meio SOC (Triptona, extrato de levedura, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de magnésio e glucose 20%) recém preparado a 37 °C. O conteúdo das cubetas foi transferido para tubos Falcon de 15 mL que foram mantidos na estufa a 37 °C por aproximadamente 1h. As células foram cultivadas em meio LB ágar suplementado com os antibióticos estreptomicina 30 µg/mL e ampicilina 100 µg/mL; com 80 µL/mL de X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil- beta-D-galactopiranosídeo) e 0,5 mM de IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo). O vetor pGEM-T Easy possui o gene para β-lactamase, que confere resistência à ampicilina, e possibilita a seleção de colônias transformadas com o plasmídeo; e gene codificante para a β-galactosidase que confere a habilidade de metabolizar a substância cromogênica X-GAL, produzindo um pigmento azul. Como o fragmento de DNA a ser clonado no pGEM-T Easy irá interromper a sequência

codificadora da β -galactosidase, as bactérias com o plasmídeo recombinante formarão colônias brancas, enquanto as não recombinantes formarão colônias azuis, o que permite a seleção dos clones transformados. Os clones selecionados foram submetidos à extração de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989).

4.3.1. Extração do DNA plasmidial

De cada placa de Petri foram selecionadas 11 colônias brancas putativamente transformadas e 1 colônia azul de *E. coli* Top 10 que foram submetidas à extração de DNA plasmidial por lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989). As colônias foram inoculadas em 5 mL de meio LB suplementado com estreptomicina 30 μ g/mL e ampicilina 100 μ g/mL e cultivadas a 37 °C por 16h. Uma alíquota de 3,0 mL foi coletada de cada tubo e submetida à centrifugação a 12.000 rpm, por 5 minutos (MiniSpin - Eppendorf). Após a centrifugação, as células foram coletadas e ressuspensas em 200 μ L da solução de glucose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0 e EDTA 10 mM. Em seguida, fez-se a adição de 200 μ L da solução de lise, constituída de SDS 10% e NaOH 4,0 M. Após 5 minutos foi adicionado, à mistura, 200 μ L de uma solução de neutralização (acetato de potássio 2,8 M).

Os tubos ficaram mantidos no gelo por aproximadamente 5 minutos e em seguida foram centrifugados a 12.000 rpm, por 5 min (MiniSpin - Eppendorf). O sobrenadante foi cuidadosamente coletado em tubos novos e a este foi adicionado 2/3 do volume de isopropanol para a precipitação do DNA. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por aproximadamente 30 min e em seguida centrifugadas a 12.000 rpm, por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. Após a etapa de lavagem, o DNA extraído foi ressuspenso em 50 μ L de água ultra pura autoclavada, acrescida de 2,0 μ L de RNase (1,0 mg/mL). A presença e qualidade dos plasmídeos foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio 0,5 μ g/mL. As amostras contendo o DNA plasmidial foram quantificadas em espectrofotômetro, medindo-se a absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm para o cálculo da concentração e confirmação da pureza. Depois de verificada a qualidade dos plasmídeos extraídos foi feita uma PCR para a confirmação da transformação. Após confirmada a transformação de células de *E. coli* com os insertos contendo as seqüências completa e parcial de CV1887, cada clone foi mantido em glicerol a -80°C.

Para dar início ao processo de subclonagem, os vetores pGEM-T Easy contendo os insertos de CV1887 extraídos pelo método de lise alcalina a partir dos clones de *E. coli* Top 10 previamente selecionados, foram submetidos a uma reação de digestão com as enzimas *Xba* I e *Sac* I. A primeira reação de 20 µL continha: 2,0 µL de pGEM-T Easy contendo o inserto, 1,0 µL do tampão B1 (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM), 1,0 µL de *Sac* I (10 U/µL), 1,0 µL de BSA 10x e 13,0 µL de água. A reação foi mantida a 37 °C por três horas no termociclador PTC-200. Após este período foi feita a adição de 1,0 µL da enzima *Xba* I (10 U/µL), 1,5 µL de NaCl 1,0 M e 5,5 µL de água, 1,0 µL de BSA 10x e 1,0 µL do tampão B1. Após três horas a 37 °C os plasmídeos digeridos foram submetidos a uma etapa de inativação enzimática por 10 min a 80 °C. O plasmídeo binário pBI121, utilizado para a transformação das plantas, também foi digerido da mesma forma. Todo o conteúdo das reações de digestão foi aplicado em gel de agarose 0,6%. As bandas foram purificadas com o Kit GFX (GE) e em seguida iniciado o processo de subclonagem.

4.4. Subclonagem dos insertos completo e parcial de CV1887 no vetor de expressão pBI121

O vetor de expressão utilizado, o plasmídeo pBI121 (CHEN et al., 2003), é um plasmídeo binário de aproximadamente 15 kb largamente empregado na transformação genética de plantas (Figura 5). É caracterizado pela presença do gene *nptII* que codifica a enzima neomicina fosfotransferase, conferindo resistência à canamicina. Os genes cv1887 clonados neste vetor estão sob controle do promotor de expressão constitutivo CaMV35S.

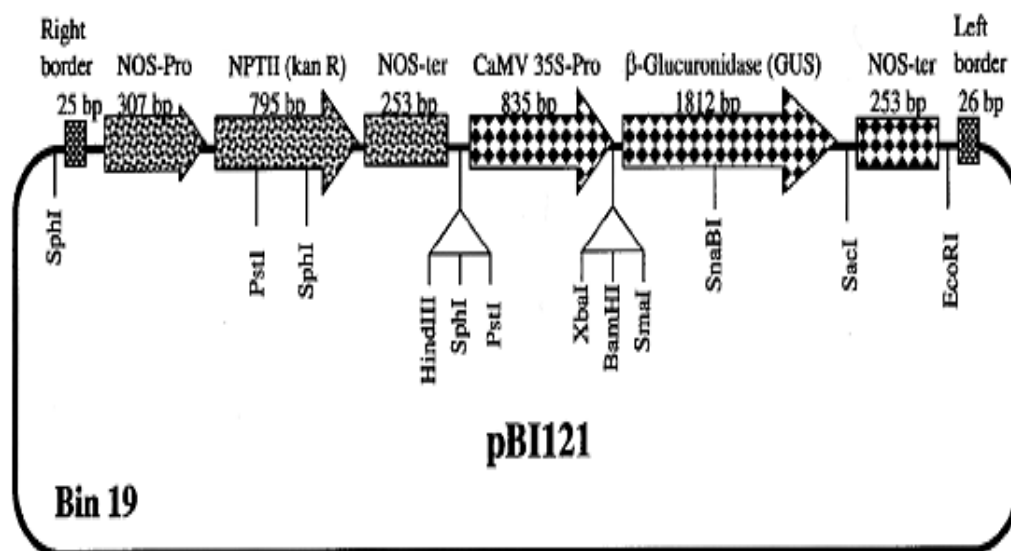


Figura 5: Mapa do vetor de expressão pBI121. Fonte: Po-Yen Chen et al 2003.

Os insertos de CV1887 e o plasmídeo pBI121 digeridos com as enzimas *Sac* I e *Xba* I e purificados com o kit GFX (GE) foram submetidos a uma reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase. Para a reação de ligação foi usada uma razão molar entre inserto: vetor de 3:1. A reação foi incubada a 16 °C no termociclador PTC-200. A eletroporação foi realizada com a adição de 10 µL da solução de plasmídeo em 60 µL de células de *E. coli* TOP10. A suspensão de células misturada à solução de plasmídeo foi transferida para uma cubeta de eletroporação previamente resfriada, com espaço interno de 2,0 mm e submetidas a um pulso de 2,5 kV, em um eletroporador Eppendorf, modelo 2510. Como controle, o mesmo procedimento foi repetido sem a adição do plasmídeo, sendo o volume final completado com água. Imediatamente após o pulso, foi adicionado à suspensão, 1,0 mL do meio SOC e as células foram transferidas para tubos de centrifuga de 15 mL.

As células transformadas foram mantidas sob agitação a 150 rpm por 1h a 37 °C. Após o período de incubação, 100 µL da cultura de células transformadas foram distribuídas, com auxílio da alça de Drigalski, em placas de Petri contendo meio LB ágar acrescido de canamicina (50 µg/mL) e estreptomicina (30 µg/mL). As placas foram mantidas a 37 °C por 24 horas, quando foi possível a visualização de colônias. Foram selecionadas 20 colônias de cada evento de transformação e inoculadas em caldo LB contendo canamicina (50 µg/mL) e estreptomicina (30 µg/mL). Os erlenmeyers foram mantidos a 37 °C sob agitação constante (200 rpm) por 16h.

Para a confirmação da transformação foi feita uma PCR utilizando-se os plasmídeos recombinantes extraídos pelo método de lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989), como molde. Os produtos de PCR resultantes da amplificação dos insertos cv 1887 e os plasmídeos extraídos foram aplicados num gel de agarose 0,8% submerso em tampão TBE (Tris-Borato 45 mM, pH 8,0, EDTA 1,0 mM) em cuba horizontal para a análise da qualidade do DNA.

4.5. Transformação de células de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 com CV1887

Uma alíquota de 2,0 µL de cada plasmídeo extraído foi utilizada para transformação de células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Invitrogen). As células eletrocompetentes de *A. tumefaciens* foram obtidas da mesma maneira das células de *E. coli*, sendo a única diferença o processo de lavagem das células que substitui o glicerol 10% por água Milli-Q estéril.

Para a transformação, 2,0 µL de cada plasmídeo foram adicionados à cubetas de eletroporação previamente resfriadas, juntamente com 40 µL de células de *A. tumefaciens*. A mistura foi submetida a um pulso de 18 KV/cm no eletroporador modelo 2510 (Eppendorf) e logo acrescida de 1 mL de meio YM, mantido à temperatura ambiente. No tratamento controle as células de *A. tumefaciens* foram eletroporadas na presença de água. Após o procedimento as células foram transferidas para tubos de centrífuga de 15 mL mantidas sob agitação constante (200 rpm) a 28 °C por 3h. Após o período de incubação, 100 µL da cultura de células transformadas foram semeadas em placas de Petri (90 mm) contendo meio YM ágar acrescido de canamicina (50 µg/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As placas foram mantidas no escuro à 28 °C por 48h. A resistência à estreptomicina é conferida pelo plasmídeo auxiliar pAL4404 já presente na célula, enquanto que a resistência à canamicina é conferida pelo plasmídeo binário pBI121 inserido por eletroporação. Após 48h as placas contendo as células transformadas foram avaliadas quanto a presença de colônias no meio com antibióticos.

De cada placa foram selecionadas 10 colônias, as quais foram inoculadas em erlenmeyers (50 mL) contendo caldo YM acrescido de canamicina (50 µg/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As culturas foram mantidas sob agitação (200 rpm) a 28 °C por 48h e em seguida foi realizado o processo de extração de plasmídeo pelo método de lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989).

Os plasmídeos extraídos foram utilizados como molde em uma reação de amplificação por PCR para a confirmação da transformação. Os componentes da PCR para amplificação de cada inserto foram os seguintes: 1,0 µL do tampão 10X, 2,0 µL de dNTP's (1,0 mM), 1,0 µL do DNA molde, 0,5 µL de *Taq* polimerase (5,0 U/µL), 1,0 µL de cada iniciador (5µM) e 3,5 µL de água ultra pura. Foi usado como DNA molde os plasmídeos recombinantes extraídos de clones selecionados de *A. tumefaciens*. Como controle, as mesmas condições da reação foram repetidas mas o DNA molde não foi adicionado, sendo o volume completado com água. A reação de amplificação dos fragmentos de CV1887 consistiu inicialmente de um ciclo de 3 minutos a 95 °C, 1 minuto a 65 °C e 2 minutos a 72 °C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 65 °C e 2 minutos a 72 °C.

Os produtos da reação de PCR e os plasmídeos extraídos foram aplicados em um gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio 0,5 µg/mL para a avaliação da qualidade do DNA e a confirmação da transformação. Foi misturado 5,0 µL de cada amostra com 2,0 µL de tampão de amostra (glicerol 30%, azul de bromofenol 0,25% em TE pH 8,0) e aplicados no

gel de agarose. A eletroforese foi conduzida com voltagem constante (80 V), em uma fonte Pharmacia LKB GPS 200/400, em sistema horizontal, com o gel submerso em tampão TBE (Tris-Borato 45 mM pH 8,0, EDTA 1,0 mM). Clones de *A. tumefaciens* confirmados da integração do plasmídeo pBI121 contendo insertos CV1887 foram mantidos em glicerol a -80°C.

4.6. Transformação de segmentos foliares de fumo (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) com insertos CV1887

As plantas de fumo foram transformadas geneticamente pelo método de agroinfecção (HORSCH et al., 1985). Os explantes foliares das plantas de fumo foram expostos a uma suspensão de *A. tumefaciens* transformadas com os vetores pBI121::gus, pBI121::cv1887 completo e pBI121::cv1887 parcial.

O processo de transformação consistiu primeiramente no cultivo da bactéria em caldo YM (Extrato de levedura 0,04 %; NaCl 1,7 mM, manitol 1,0 %, MgSO₄.7H₂O 0,8 mM, K₂HPO₄.3H₂O 2,2mM, pH 7,0) contendo canamicina 50 mg/L e estreptomicina 100 mg/L. A cultura foi mantida sob agitação constante de 200 rpm 30 °C por 48h. Após este período as células foram cultivadas em YM ágar contendo os antibióticos e mantidas na estufa sob a mesma temperatura para o isolamento de colônias. De cada placa foram retiradas três colônias e inoculadas em erlenmeyers de 50 mL contendo 5 mL de YM (pré – inóculo) e incubados a 30 °C por aproximadamente 30h. A segunda etapa do experimento consistiu em inocular 1 mL da pré-cultura em erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio YM suplementado dos antibióticos. Nesta etapa foram adotados os mesmos parâmetros anteriormente descritos.

A verificação da densidade óptica (OD₆₀₀) foi feita 24, 27, 30 e 36 horas após o inóculo. Após este período os valores de densidade óptica variavam entre 0,6 e 0,7. O conteúdo dos erlenmeyers foram distribuídos em seis tubos de centrifuga cada um contendo 30 mL de suspensão bacteriana. As culturas foram centrifugadas a 6.000 rpm por 10 minutos em centrífuga Sorvall modelo RC 5B *plus* rotor GSA. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 20 mL de meio MS acrescido de 0,5 mg/L de MES (ácido morfolino-etanosulfônico) e em seguida centrifugadas novamente sob as mesmas condições. As células foram ressuspensas em meio MS contendo MES 4em um volume em que a concentração final resultasse em 10⁹ células de *Agrobacterium* por mililitro de meio. Para estimar o volume necessário para ressuspender as células admitiu-se que o valor de densidade óptica (OD₆₀₀) igual a 1,0 corresponde a 5,0 x 10⁸ células/mL. Uma vez ressuspensas, as

células foram mantidas a temperatura ambiente até o momento do co-cultivo. O co-cultivo consistiu na exposição dos explantes foliares das plantas de fumo à suspensão de células de *A. tumefaciens*. Os explantes foram retirados de plantas de fumo de aproximadamente 30 dias de idade obtidas a partir de sementes.

Os explantes com 0,5 a 1,0 cm² foram seccionados sobre papel de filtro estéril umedecido e transferidos para erlenmeyers de 50 mL contendo 5 mL de suspensão bacteriana ou meio de cultura. Um total de 200 explantes foram distribuídos em 20 erlenmeyers, cada um com 10 explantes. Os explantes foram submetidos aos seguintes tratamentos: (1) co-cultivo com suspensão de *A. tumefaciens* portando o plasmídeo pBI121::cv1887 completo, (2) co-cultivo com suspensão de *A. tumefaciens* portando o plasmídeo pBI121::cv1887 parcial, (3) co-cultivo com suspensão de *A. tumefaciens* portando o plasmídeo pBI121::gus e (4) explantes inoculados em meio MS contendo MES 0,5 mg/mL como controle da reação. Em todos os tratamentos foi feita a adição de acetoseringona na concentração de 100 µM.

Os explantes foram expostos à suspensão bacteriana ou ao meio de cultura por uma hora. Esse procedimento ocorreu na ausência de luz, sob agitação constante (40 rpm) e a uma temperatura de 30 °C. Ao final do período de incubação, os explantes pertencentes a cada tratamento foram, separadamente, secos em papel de filtro estéril e então transferidos para placas de Petri (90 mm) contendo meio MS acrescido de sacarose 3,0%, e ágar 0,7%. Em cada placa foram dispostos dez explantes com a face adaxial voltada para o meio de cultura. As placas contendo os explantes foram mantidas por 48 horas a uma temperatura de 30 °C na ausência de luz.

Após o período de co-cultivo os explantes foram lavados com água estéril e secos em papel de filtro. Os explantes do tratamento controle foram transferidos para placas de Petri (90 mm) contendo meio MS acrescido de sacarose 3,0 %, ágar 0,7 %, 1,0 mg/L de benzilaminopurina (BAP) e desprovido de antibióticos. Os explantes, submetidos ao co-cultivo com suspensão de *A. tumefaciens* portando os plasmídeos pBI121::gus, pBI121::cv1887 completo e pBI121::cv1887 parcial, foram transferidos para meio seletivo (meio MS acrescido de sacarose 3,0%, ágar 0,7%, 1,0 mg/l de BAP, 500 mg/L de cefotaxima e 100 mg/L de canamicina). A cefotaxima foi usada para conter a proliferação da bactéria, passado o período de co-cultivo, enquanto a canamicina foi usada para selecionar as plantas transformadas, uma vez que a região do T-DNA do plasmídeo pBI121 contém o gene da neomicina fosfotransferase que confere resistência à canamicina.

As placas foram mantidas sob um fotoperíodo de 12 horas a uma temperatura de 25°C por quatro semanas. Ao final de duas semanas de cultivo os explantes foram transferidos para placas contendo meio novo, com a mesma composição. A cada semana, as culturas foram avaliadas quanto ao aspecto dos explantes, quanto à contaminação e desenvolvimento de brotos adventícios.

4.7. Propagação *in vitro* e seleção dos clones de fumo transformados com o inserto CV1887

Os clones das plantas de fumo transformados foram propagados continuamente *in vitro* por meio de segmentos nodais em meio MS (sais e vitaminas MS, sacarose 3,0 %, ágar 0,7%, pH 5,8) acrescido de 100 mg/L de canamicina e as plantas controle em meio MS desprovido de antibióticos. Nesta fase, foi avaliada a capacidade de propagação dos clones selecionados pela análise do comprimento médio dos brotos, o percentual de brotos enraizados e comprimento médio das raízes.

Após cinco semanas, os brotos formados a partir dos explantes de cada tratamento foram destacados e transferidos para frascos contendo meio seletivo (MS sem reguladores de crescimento, contendo sacarose 3,0% e ágar 0,7% e suplementando com 250 mg/L de carbenicilina e 100 mg/L de canamicina, pH 5,8). Os brotos originados do tratamento controle foram transferidos tanto para meio MS desprovido de antibiótico como para o meio seletivo.

Os brotos enraizados em meio seletivo foram selecionados para extração de DNA genômico pelo método descrito por Doyle; Doyle, 1987. Com auxílio de uma tesoura cirúrgica, as folhas foram seccionadas da cada planta e com auxílio de um tubo de microcentrífuga foram obtidos os discos foliares de aproximadamente 1 cm de diâmetro. De cada clone foram selecionados cinco discos foliares e em cada tubo eles foram macerados juntamente com 500 µL de tampão CTAB (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, CTAB 2,0 % p/v), pré-aquecido a 60°C e acrescido de 0,2 % (v/v) de 2-β-mercaptoetanol. As amostras foram mantidas em banho-maria a 60 °C por 1 hora sendo homogeneizadas periodicamente. Em seguida, foi adicionado um volume de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 em cada tubo. Após homogeneizar cada amostra, estas foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos em microcentrífuga (MiniSpin Eppendorf). A fase aquosa foi transferida para tubos limpos, onde foi feita a adição de 1,2 volumes de isopropanol. A fase de precipitação do DNA ocorreu à temperatura ambiente (25 °C) por aproximadamente 3 horas, quando então foram centrifugadas (13.000 rpm, 10 minutos). O

sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70%. Após centrifugação e descarte do sobrenadante o precipitado de DNA genômico foi ressuspensão em 100 µL de água ultra pura estéril acrescida de 2,0 µL de RNase (1,0 mg/mL).

As amostras de DNA genômico de diferentes clones de plantas de fumo foram quantificadas por meio da verificação da absorbância a 260 nm (A_{260}) no espectrofotômetro Nanodrop modelo 1000. O DNA genômico extraído de cada clone foi usado como DNA molde em uma reação de amplificação por PCR. Em uma reação de 10 µL foi feita a adição de: 1,0 µL de tampão, 2,0 µL de dNTP's (1,0 mM), 1,0 µL de cada iniciador para CV1887, 0,2 µL de *Taq* polimerase (5,0 U/µL -Invitrogen) e 1000 ng do DNA molde.

As plantas de fumo obtidas *in vitro* e confirmadas por PCR foram cuidadosamente transferidas para copos plásticos contendo uma mistura autoclavada de areia de rio e vermiculita, na mesma proporção. As plantas foram mantidas sob um fotoperíodo de 12 horas a uma temperatura de 25 °C.

4.8. Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi instalado em blocos ao acaso, havendo quatro repetições para cada um dos cinco tratamentos, que foram; o controle positivo, com explantes de fumo não co-cultivados com *A. tumefaciens* e cultivados e meio não seletivo; o controle negativo, com explantes de fumo não co-cultivados com *A. tumefaciens* e cultivados e meio seletivo; pBI121::gus, pBI121::CV1887 parcial, pBI121::CV1887 completo, com explantes de fumo co-cultivados com *A. tumefaciens* e cultivados e meio seletivo contendo cefotaxima 500 mg/L e canamicina 100 mg/L. Em cada um dos quatro blocos havia uma repetição de cada tratamento e cada repetição correspondeu a uma placa de Petri contendo dez explantes.

Todos os dados quantitativos obtidos foram analisados quanto à variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey onde $P < 0,05$ foi fixado para indicar a significância estatística para comparação entre as médias.

4.9. Extração de RNA

Foram selecionados diferentes clones transformados e pertencentes ao controle para a realização da extração de RNA, que foi realizada utilizando-se o *Plant RNA Reagent* (Invitrogen) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. De cada tratamento foram utilizados 0,1g de folhas, que foram coletadas imediatamente antes da extração.

Para a extração, o material foi macerado com auxílio de nitrogênio líquido até a formação de uma farinha fina. A farinha foi misturada a 0,5 mL de *Plant RNA Reagent* (Invitrogen) gelado. A mistura foi mantida por 5 minutos a temperatura ambiente e em seguida centrifugada a 12.000 x g também a temperatura ambiente. Após a centrifugação, sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a ele adicionado 0,1 mL de NaCl 5M e 0,3 mL de clorofórmio. Em seguida, foi feita uma nova centrifugação por 10 minutos, a 4 °C e 12.000 x g para a separação das fases. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e a ela adicionado 1 volume de álcool isopropílico. A mistura foi deixada sobre a bancada por 10 minutos e em seguida centrifugada por 10 minutos, a 4 °C e 12.000 x g. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 1 mL de etanol 75%. A mistura foi centrifugada a temperatura ambiente por 1 minuto a 12.000 x g e o sobrenadante foi descartado. O pellet resultante foi ressuspensão em 30 µL de água ultra pura estéril. Em seguida, as amostras foram tratadas com a enzima DNase I (Amersham Pharmacia Biotech), livrando-as de contaminações com DNA genômico.

Para checar a qualidade da extração e visualização do RNA total extraído, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,2% em tampão TBE (Tris-Borato 45 mM pH 8,0, EDTA 1,0 mM) em uma cuba horizontal. A quantificação foi feita pela verificação da absorbância a 260 nm.

4.10. RT-PCR

Para analisar a expressão das seqüências CV1887 parcial, CV1887 completo e do gene gus, foi realizada uma reação de RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com a Transcriptase Reversa) com os iniciadores específicos para cada seqüência.

Foi feita uma reação de 25 µL, utilizando-se 1 µL da transcriptase reversa - ImProm II (Promega), 5 µL do tampão 5X -ImProm II (Promega), 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM, 1,2 µL de dNTPs 10mM, 1 µL do Oligo(dT)₁₈ (Fementas Life Sciences) e 1 µg do RNA

molde. A reação foi realizada no termociclador Eppendorf por um período de 60 minutos a 42 °C. Em seguida, a transcriptase reversa foi inativada a 70 °C por 15 minutos e a reação mantida a -20 °C até o início da reação de PCR.

O cDNA sintetizado a partir de cada clone foi usado como molde em uma reação de amplificação por PCR. A reação para amplificação dos fragmentos de cv1887, consistiu inicialmente de um ciclo de 4 min. a 94°C, 1 min. a 65°C e 4 min. a 72°C, seguido de 34 ciclos de 2 min. a 94°C, 1 min a 65°C e 4 min. a 72°C e mais uma etapa de 8 min. a 72°C. Em uma reação de 10 µL foi feita a adição de: 1000 ng do cDNA molde, 1,0 µL de tampão, 2,0 µL de dNTP's (1,0 mM), 1,0 µL de cada iniciador para CV1887 e para o gene gus, 0,25 µL da *Go Taq* Hot Start polimerase (500 U/mL) (Promega).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Clonagem das seqüências completa e parcial de CV1887 e ligação dos insertos no vetor de clonagem pGEM-T Easy

Foi realizada uma reação de PCR com iniciadores específicos para a amplificação das seqüências completa e parcial de CV1887, utilizando-se como molde DNA plasmidial transformado com a seqüência de CV1887 extraído de células de *E. coli*. Na figura 6, pode ser observada na eletroforese em gel de agarose 0,8%, a presença duas bandas, uma de aproximadamente 4.155 pb e outra de 2.642 pb.

Os fragmentos correspondentes às seqüências completa e parcial foram clonados no vetor pGEM-T e os vetores recombinantes eletroporados em células de *E. coli* Top 10. Foram selecionadas colônias brancas e azuis dos dois eventos de transformação para extração de plasmídeos e confirmação da transformação. Nas figuras 7 e 8, observamos diferenças entre o tamanho dos vetores íntegros e transformados extraídos, o que indica a eficiência da clonagem. O vetor pGEM-T Easy íntegro possui um tamanho de 3.015 pb. A extração feita a partir de colônias azuis, não transformadas, resultou em fragmentos condizentes com o tamanho do vetor, ao contrário do que aconteceu na extração feita a partir de colônias brancas, putativamente transformadas com os insertos parcial e completo de CV1887. Neste caso, foi possível observar bandas com tamanho aproximado de 7 kb para os clones de CV1887 completo e de aproximadamente 5 kb para os clones de CV1887 parcial. Os plasmídeos extraídos foram utilizados como molde para reação de PCR para amplificação dos fragmentos correspondentes ao CV1887 completo e parcial com os iniciadores específicos. Nas Figuras 7 e 8, foram observadas bandas do tamanho esperado para os dois fragmentos (4.155 pb e 2.642 pb), confirmando a eficiência da ligação do inserto no vetor de clonagem.

Na Figura 9, podemos observar a amplificação de fragmentos com 4.155 pb nos poços 4, 7 e 8, sugerindo que os respectivos clones foram transformados com o fragmento completo de cv 1887. Já na Figura 10, todos os clones apresentaram o mesmo padrão de amplificação no tamanho correspondente ao fragmento parcial com 2.642 pb. A partir dos clones transformados e confirmados foram selecionados dois clones, um de cada transformação, para a realização da reação de digestão com as enzimas específicas para a subclonagem no vetor de expressão pBI121. Os clones de *E. coli* transformados com os plasmídeos recombinantes pGEM-T Easy::CV1887 completo e parcial confirmados por PCR foram mantidos em glicerol a -80 °C.

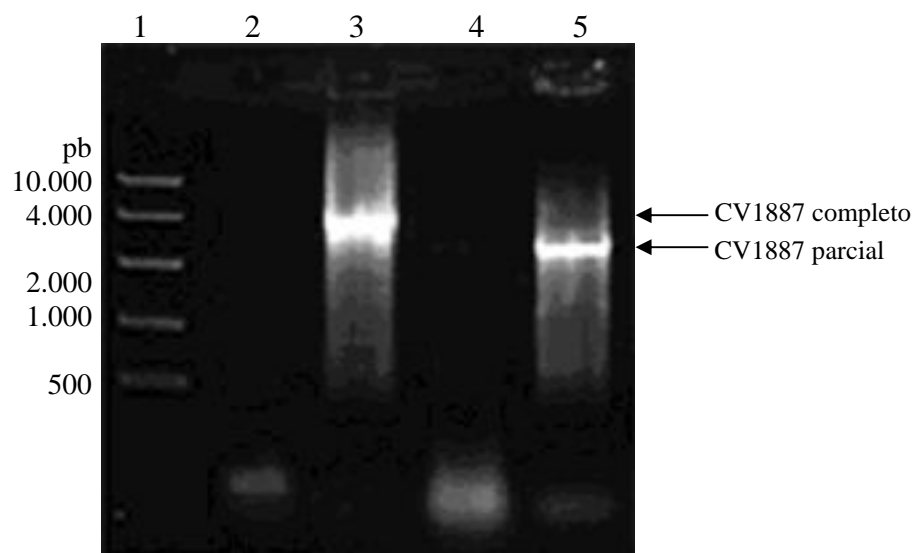


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR de CV1887 completo e parcial amplificados a partir do vetor pGEMT-Easy::CV1887. Poço 1: Marcador Fast Ruler DNA Ladder High (150 ng); Poço 2 e 4: controle negativo, Poço 3: CV1887 completo e Poço 5: CV1887 parcial.

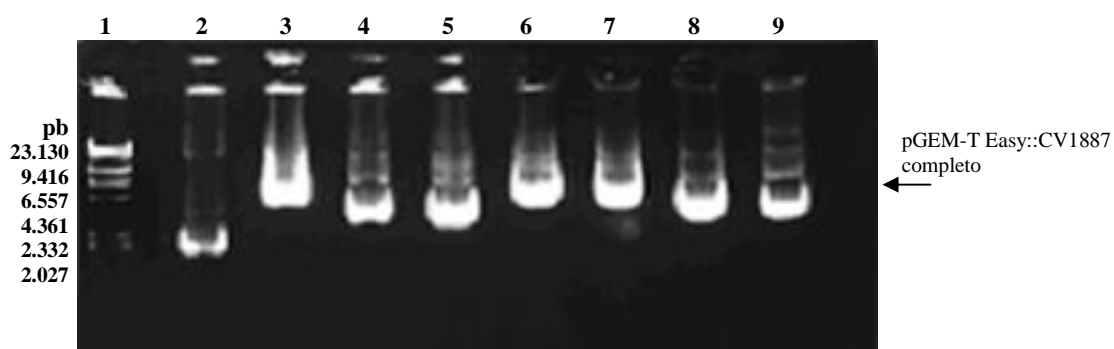


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 0,8% do plasmídeo pGEM-T easy :: CV1887 completo. Poço 1: Marcador λ DNA/Hind III 250 ng; Poço 2: fragmento extraído a partir de colônia azul (não transformada), Poços 3 ao 9: fragmentos extraídos a partir de colônias brancas (transformadas). Em cada poço foram aplicados 5 μ L de amostra

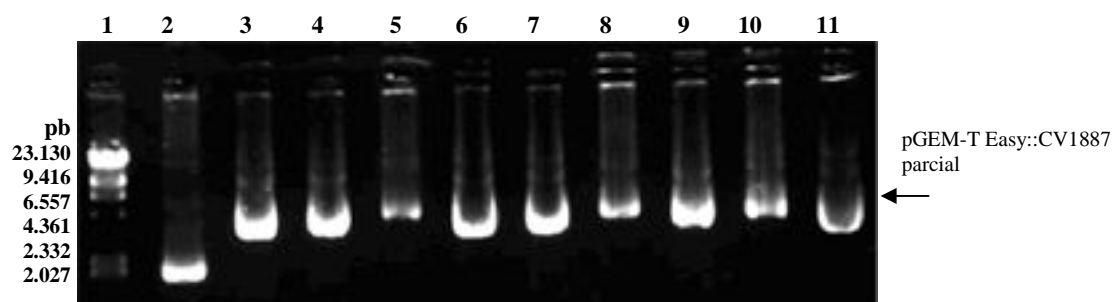


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 0,8% do plasmídeo pGEM-T easy :: CV1887 parcial. Poço 1: Marcador λ DNA/Hind III 250 ng; Poço 2: fragmento extraído a partir de colônia azul (não transformada), Poços 3 ao 11: fragmentos extraídos a partir de colônias brancas (transformadas). Em cada poço foram aplicados 5 μ L de amostra.

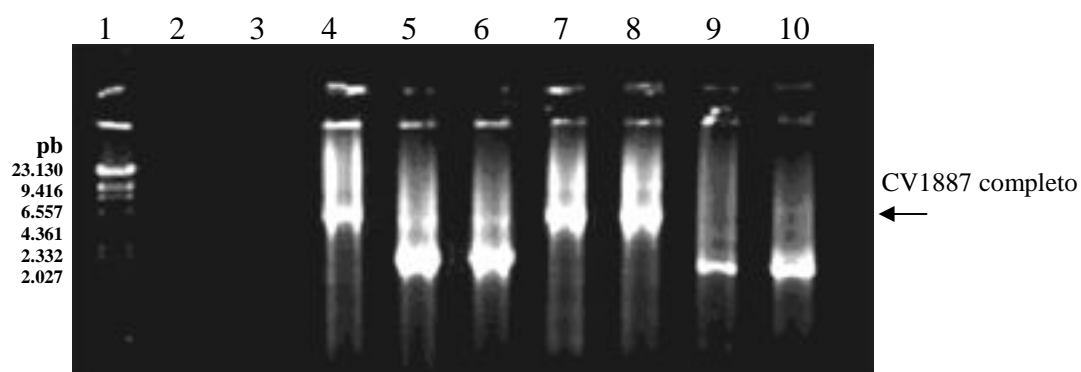


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR a partir do vetor pGEM::CV1887 completo. Em cada poço foram aplicados 5 μ L de cada reação. Poço 1: Marcador λ DNA/*HindIII* 250 ng; Poço 2: controle negativo da reação; Poço 3: produto da colônia azul (controle); Poço 4 ao 10: produtos amplificados a partir dos fragmentos extraídos de colônias brancas (transformadas). Em cada poço foram aplicados 5 μ L de amostra.

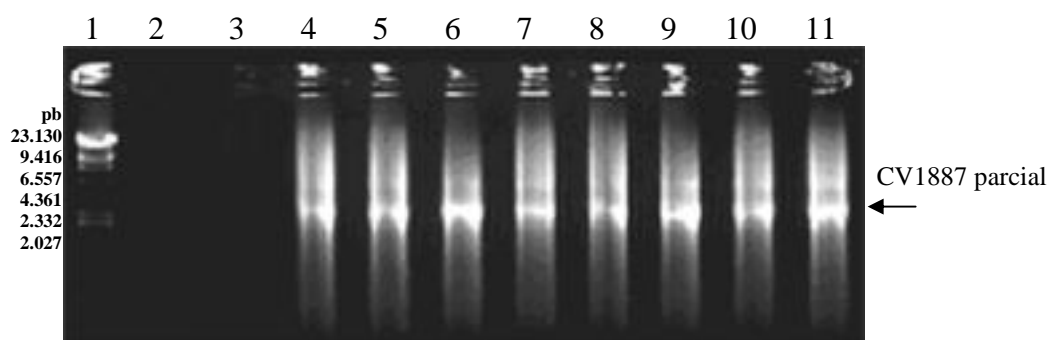


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR a partir do vetor pGEM::CV1887 parcial. Poço 1: Marcador λ DNA/*HindIII* 250 ng; Poço 2: controle negativo da reação; Poço 3: produto da colônia azul (controle); Poço 4 ao 11: produtos amplificados a partir dos fragmentos extraídos de colônias brancas (transformadas). Em cada poço foram aplicados 5 μ L de amostra

5.2. Subclonagem dos insertos de CV1887 no vetor binário pBI121

Para a subclonagem dos insertos no vetor binário, dois clones transformados e confirmados foram selecionados para serem digeridos com as endonucleases de restrição *Xba* I e *Sst* I. Os clones escolhidos correspondem aos poços 4 das Figuras 9 e 10. O plasmídeo pBI 121 também foi submetido à reação de digestão seguindo os parâmetros previamente descritos. As bandas correspondentes ao plasmídeo binário pBI121 e aos insertos CV1887 foram isoladas do gel, purificadas e foi feita uma reação de ligação, na presença da enzima T4 DNA ligase. Na Figura 11 observou-se as bandas correspondentes aos insertos digeridos.

Os insertos cv1887 completo e parcial foram subclonados no plasmídeo binário. Os produtos da reação de ligação (pBI121::CV1887 completo e pBI121::CV1887 parcial) foram inseridos em células de *E. coli* Top 10 por eletroporação. A suspensão de células eletroporadas ao ser inoculada em placas de Petri contendo meio seletivo (LB contendo 50 µg/mL de canamicina) resultou na formação de colônias após 16 horas de incubação a 37 °C. De cada placa das transformações (pBI12::CV1887 completo e pBI121:: CV1887 parcial) foram selecionadas 24 colônias para extração de DNA plasmidial e verificação da transformação. A qualidade dos plasmídeos extraídos foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 0,8 %. As bandas obtidas no gel corresponderam ao tamanho aproximado do plasmídeo pBI121 (14.758 pb) contendo insertos CV1887.

A partir do DNA plasmidial extraído dos clones selecionados de *E. coli* foi feita uma reação de amplificação usando iniciadores para os insertos de cv 1887. Os produtos da reação de amplificação, aplicados em gel de agarose 0,8 %, resultaram em bandas de aproximadamente 4.155 pb e 2.642 pb, correspondentes ao tamanho do insertos. Dos 24 clones selecionados da placa de pBI121::CV1887 completo, somente 4 não tiveram a inserção do fragmento confirmada, já dos 24 clones de CV1887 parcial, 12 clones não foram confirmados (Figuras 12 e 13).

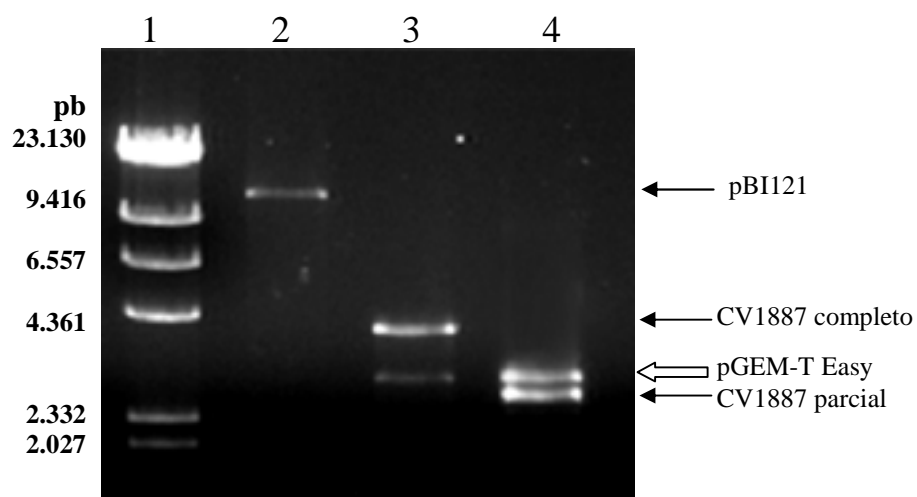


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 0,6% dos produtos da digestão dos vetores pBI121, pGEM::CV1887 completo e pGEM::CV1887 parcial com as enzimas *Sst*I (10 U/mL) e *Xba*I (10 U/mL) (JENA Biosciences). Poço 1: Marcador λ DNA/Hind III 250 ng, Poço 2: pBI 121, Poço 3: pGEM::CV1887 completo e Poço 4: pGEM::CV1887 parcial. (pBI 121: 14.758 pb, pGEM:3015 pb; CV1887 completo: 4.155 pb, CV1887 parcial: 2.642 pb). Em cada poço foram aplicados 5 μ L de amostra

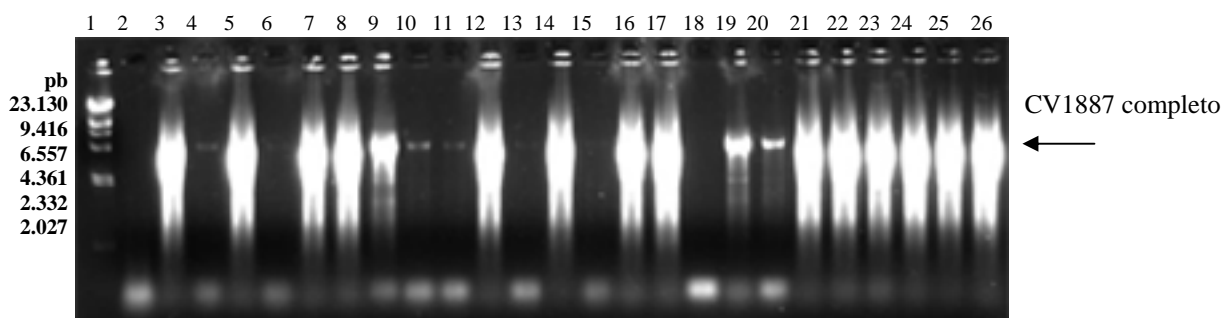


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos da PCR de pBI::cv1887 completo. A reação foi feita aplicando-se 1 μ L do DNA molde diluído 1:10. Poço 1: Marcador λ DNA/*Hind* III 250 ng; Poço 2: controle negativo da reação; Poços 3 ao 26: clones 1 ao 24 de pBI121:: cv 1887 completo. Em cada poço foram aplicados 5 μ L de cada amostra.

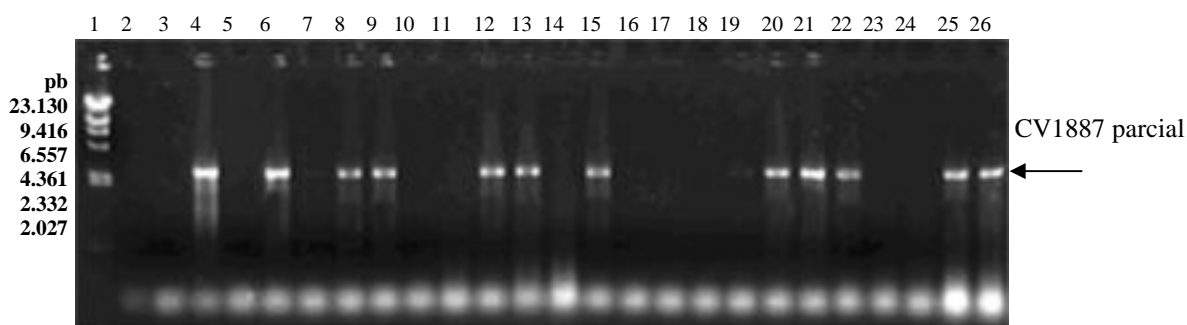


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos da PCR de pBI::cv 1887 parcial. A reação foi feita aplicando-se 1 μ L do DNA molde diluído 1:10. Poço 1: Marcador λ DNA/*Hind* III 250 ng; Poço 2: controle negativo da reação; Poços 3 ao 26: clones 1 ao 24 de pBI121:: cv 1887 parcial. Em cada poço foram aplicados 5 μ L de cada amostra.

A partir dos clones confirmados pela reação de PCR foram selecionados dois clones de CV1887 completo e 2 de CV1887 parcial para serem submetidos a uma reação de digestão com as enzimas *Sst* I e *Xba* I para uma confirmação precisa da transformação. Os clones selecionados correspondem aos poços 17 e 20 (clones 15 e 18) da Figura 12 e os poços 4 e 21 (clones 2 e 19) da Figura 13. Dos dois clones de cv1887 completo, um apresentou a banda correspondente a 4.155 pb no poço 2; já nos clones de CV1887 parcial, foi possível visualizar as bandas no tamanho correto de aproximadamente 2.642 pb (Figura 14).

Os clones de *E. coli* transformados com o plasmídeo pBI121::CV1887 confirmados por PCR foram mantidos em glicerol a -80°C. Os clones confirmados pela reação de digestão foram utilizados para a transformação de células de *A. tumefaciens* LBA4404 eletrocompetentes.

5.3. Confirmação da transformação de células de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 com insertos CV1887

Plasmídeos pBI121::gus, pBI121::cv1887 completo e pBI121::cv1887 parcial extraídos a partir de culturas de *E. coli* Top 10 foram inseridos individualmente em células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 por eletroporação, conforme já descrito. As células eletroporadas de *A. tumefaciens* quando inoculadas em meio YM contendo 100 µg/mL de estreptomicina e 50 µg/mL de canamicina resultaram em colônias após aproximadamente 48 horas de incubação. No controle da transformação onde as células foram eletroporadas apenas na presença de água, não foi observada a formação de colônias.

De cada placa foram selecionadas 5 colônias e inoculadas em meio YM contendo antibióticos para a extração de DNA plasmidial. Na Figura 15, observamos a eletroforese em gel de agarose 0,8% dos plasmídeos transformados extraídos de células de *A. tumefaciens*.

A partir do DNA plasmidial extraído dos clones selecionados de *Agrobacterium tumefaciens* foi feita uma reação de amplificação usando iniciadores para os insertos de CV 1887. Os produtos da reação de amplificação, ao serem aplicados em gel de agarose 0,8%, resultaram em bandas de aproximadamente 4.155 pb e 2.642 pb, correspondentes ao tamanho dos insertos completo e parcial, respectivamente (Figuras 16 e 17).

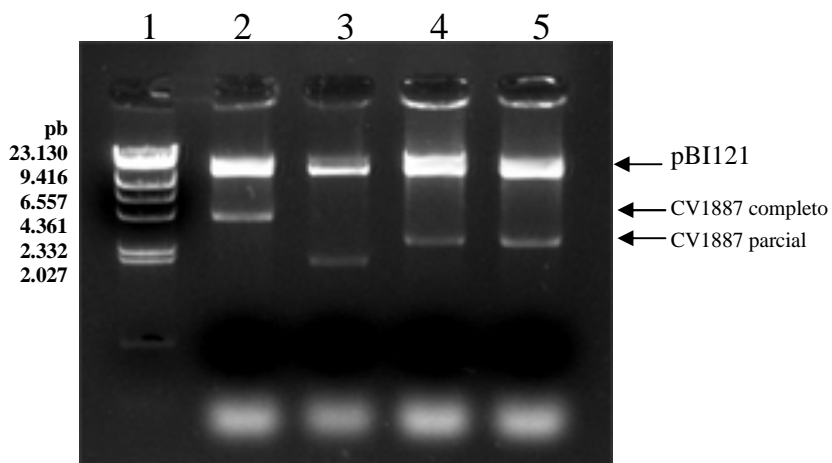


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos da digestão dos plasmídeos pBI::CV1887 completo e parcial com as enzimas *Sst* I e *Xba* I. Poço 1: Marcador λ DNA/*Hind* III 250 ng; Poços 2 e 3: clones 15 e 18 de pBI121::CV1887 completo; Poços 4 e 5: clones 2 e 19 de pBI121:: CV1887 parcial. Em cada poço foram aplicados 5 μ L de cada amostra.

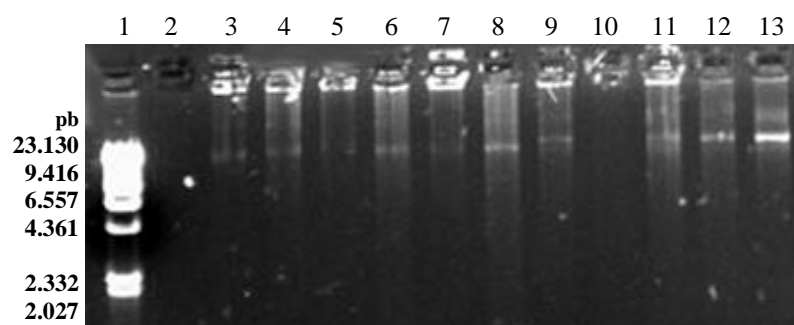


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos plasmídeos pBI::CV1887 completo e parcial extraídos de células de *A. tumefaciens*. Poço 1: Marcador λ DNA/Hind III 250 ng; Poço 2: vazio; Poços 3 ao 8: clones de pBI121::CV1887 parcial; Poços 9 ao 13: clones de pBI121:: CV1887 completo. Em cada poço foram aplicados 5 μ L de cada amostra.

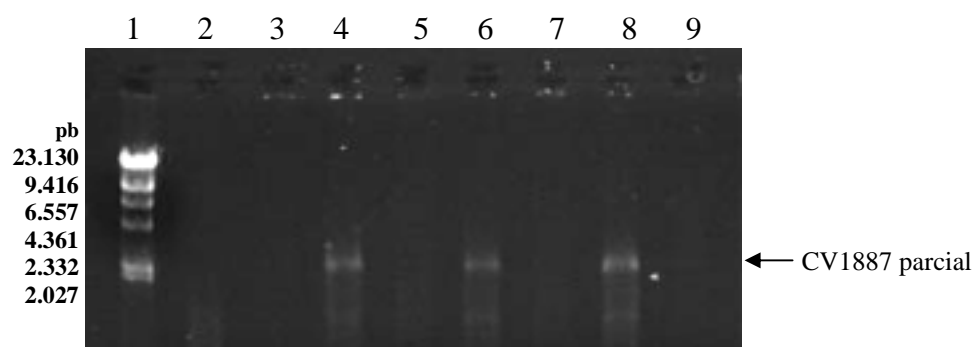


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR amplificados a partir do vetor pBI 121::CV1887 parcial. Poço 1: Marcador λ DNA *Hind* III 250 ng; Poço 2: controle negativo da reação; Poços 3 ao 9: produtos de clones de pBI 121::CV1887 parcial. Em cada poço foram aplicados 5 μ L de amostra.

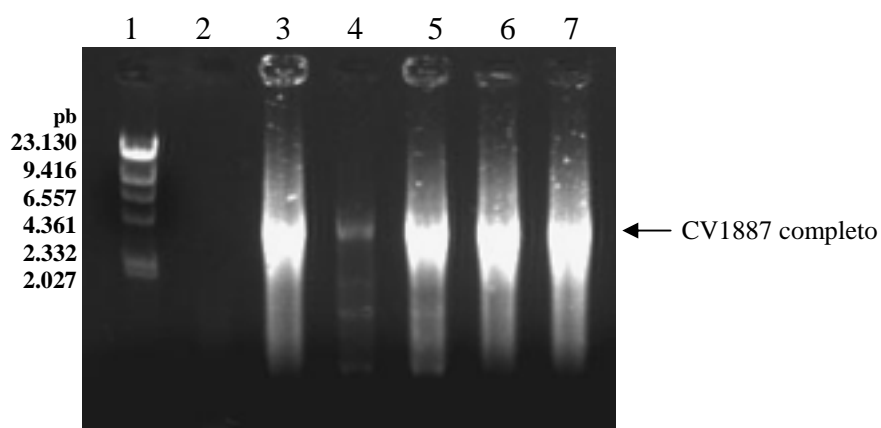


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR amplificados a partir do vetor pBI 121::CV1887 completo. Poço 1: Marcador λ DNA *Hind* III 250 ng; Poço 2: controle negativo da reação; Poços 3 ao 7: produtos de clones de pBI 121::CV1887 completo. Em cada poço foram aplicados 5 μ L de amostra.

5.4. Confirmação da transformação de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) com insertos CV1887

Segmentos foliares de fumo (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens* portando os plasmídeos: pBI121::gus, pBI121::CV1887 completo e pBI121::CV1887 parcial e cultivados em meio MS seletivo (sais e vitaminas MS, sacarose 3,0 %, ágar 0,7 %, 1,0 mg/L de BAP, 500 mg/L de cefotaxima, 100 mg/L de canamicina, MES e acetoseringona, pH 5,8) foram avaliados por um período de quatro semanas quanto a formação de calos, primórdios, brotos adventícios e raízes.

Após uma semana de cultivo, nenhum explante dos cinco tratamentos desenvolveu brotos. Somente a partir da segunda semana, os explantes do tratamento controle positivo e os do tratamento pBI121::gus, começaram a desenvolver brotos adventícios. Brotos formados a partir de explantes co-cultivados com *Agrobacterium* portando os plasmídeos, pBI121::CV1887 completo e pBI121::CV1887 parcial apresentaram o desenvolvimento mais lento, sendo observados após quatro semanas de cultivo. Os explantes do tratamento controle negativo, não desenvolveram brotos por estarem submetidos à seleção pelo antibiótico.

Após quatro semanas de cultivo o percentual de formação de brotos e raízes diferiu entre os explantes co-cultivados com *A. tumefaciens* e os tratamentos controle (Figura 18). Os explantes do tratamento controle cultivados em meio seletivo, ao final de quatro semanas não emitiram nenhum broto, permanecendo cloróticos, enquanto os explantes pertencentes ao tratamento controle, mas cultivados em meio suplementado apenas com a citocinina, apresentaram, no mesmo período, uma grande proliferação de brotos clorofilados e vigorosos (Figura 19). Dos explantes submetidos ao co-cultivo com *Agrobacterium* o percentual de formação de brotos foi semelhante para os segmentos foliares transformados com CV1887 parcial e com CV1887 completo, no entanto, houve variação quanto ao tamanho dos brotos entre estes tratamentos (Tabela 2, Figuras 20, 21 e 22). Também foi observado, entre os tratamentos, um elevado índice de explantes oxidados, cloróticos e necrosados dentre as quatro primeiras semanas de regeneração.

A transformação mediada por *Agrobacterium* envolve a interação entre dois sistemas biológicos e é afetada por várias condições biológicas. A eficiência da transferência do T-DNA mediada pela bactéria para a célula vegetal depende não somente no sucesso do reconhecimento e da colonização das células, mas também das respostas das células vegetais ao processo de infecção (KUTA; TRIPATHI, 2005). Está bem documentado na literatura

que, a clorose, a necrose de tecidos transformados e a dificuldade de regeneração de plantas, a partir de células transformadas, são características comuns ao processo de transformação mediado por *A. tumefaciens* (DAN, 2008).

A resposta da planta ao ataque pela agrobactéria inicia-se com uma explosão oxidativa, levando a uma produção rápida e transiente de espécies reativas de oxigênio (ROS) seguida por uma reação de hipersensibilidade (HR) resultando na necrose do tecido vegetal. Tecidos necrosados e a morte celular afetam a eficiência da transformação pois podem ocorrer em uma camada da célula vegetal onde se encontra o T-DNA transferido, com isso, as células transgênicas que se encontram nestes tecidos necrosados podem ter a regeneração inibida com uma conseqüente redução no resgate de clones transgênicos. A necrose também é responsável pelo acúmulo de substâncias antimicrobianas no tecido, que inibem o potencial da *Agrobacterium* de colonizar as células vegetais e transferir o T-DNA. Além disso células necróticas podem atrair microrganismos oportunistas, nas condições *in vitro*, resultando em sérios problemas de contaminação que também inibem a regeneração da planta (DAN, 2008; KUTA; TRIPATHI, 2005).

Muitos métodos de transformação que utilizam nptII para seleção, possuem um problema comum de regeneração de brotos não-transgênicos, no estágio inicial de formação, pela seleção da canamicina. Estes problemas também são responsáveis pela limitação no número de plantas transgênicas que podem ser regeneradas (DAN, 2008).

Na tentativa de se obter uma melhor eficiência na regeneração dos explantes foliares, a acetoseringona (AS) foi utilizada. A acetoseringona é um composto fenólico que atua, durante o processo de transformação via *A. tumefaciens*, reprimindo a explosão oxidativa desencadeada pela bactéria. É também considerada um indutor dos genes de virulência (*vir*) da *Agrobacterium*, que são responsáveis pela transferência do T-DNA para a célula vegetal (BAKER et al., 2005). Muitos trabalhos têm mostrado os benefícios da acetoseringona para um aumento dos níveis de transformação de diversas espécies. Costa et al. (2006) relataram um aumento de cem vezes na eficiência da transformação de *Prunus amygdalus*, na presença de AS na concentração de 150µM. Wang et al. (2007) também observaram um incremento na transformação do milho (*Zea mays*) pelo cultivo de sementes em uma suspensão de *A. tumefaciens* suplementada com 100 µM de acetoseringona.

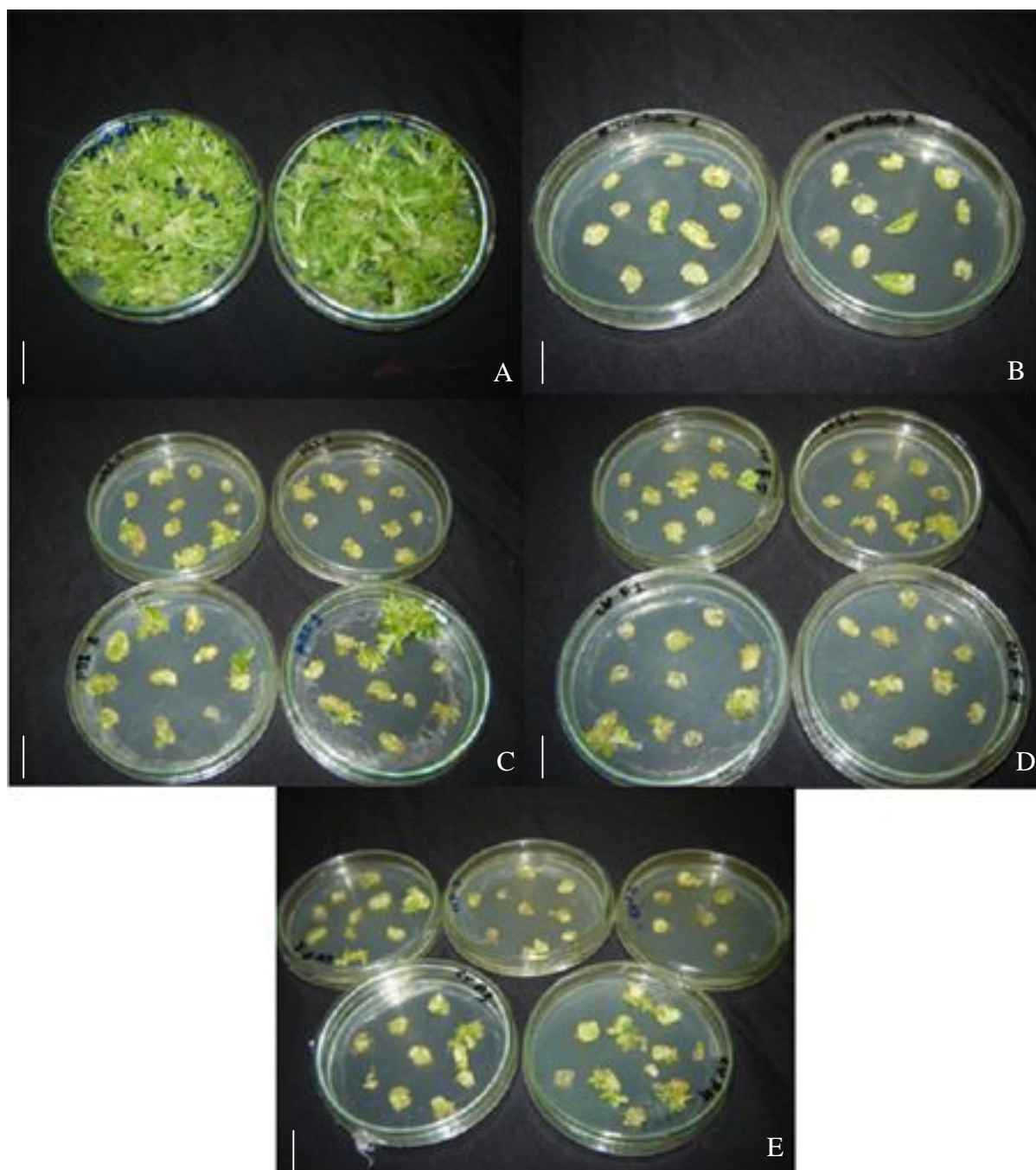


Figura 18: Aspecto dos explantes de fumo (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) controle e transformados após quatro semanas do co-cultivo com *A. tumefaciens* LBA 4404. (A) Tratamento controle não transformado, (B) Tratamento controle não transformado em meio suplementado com canamicina 100mg/L, (C) Explantes co-cultivados com *A. tumefaciens*::pBI121::gus, (D) Explantes co-cultivados com *A. tumefaciens*::pBI121::CV1887 completo, (E) Explantes co-cultivados com *A. tumefaciens*::pBI121::CV1887 parcial. Barra: 1,5 cm

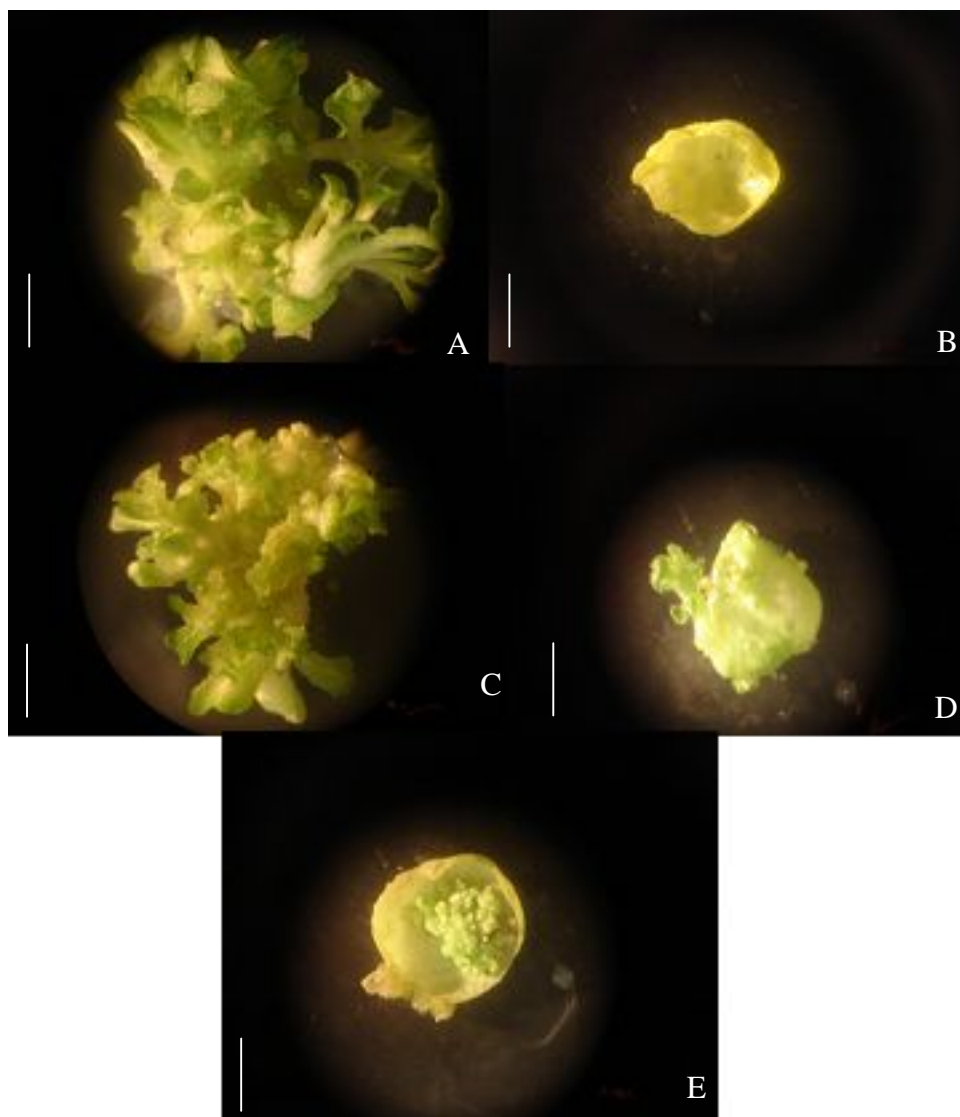


Figura 19: Aspecto individual dos explantes de fumo (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) controle e transformados após quatro semanas do co-cultivo com *A. tumefaciens* LBA4404. (A) Tratamento controle não co-cultivado com *A. tumefaciens*, (B) Tratamento controle não co-cultivado com *A. tumefaciens* em meio suplementado com canamicina 100mg/L, (C) Explantes co-cultivados com *A. tumefaciens*::pBI121::gus, (D) Explantes co-cultivados com *A. tumefaciens*::pBI121::CV1887 completo, (E) Explantes co-cultivados com *A. tumefaciens*::pBI121::CV1887 parcial. Barra: 0,5 cm

TABELA 2 - 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 ^A	Explantes com formação de brotos (%)	Explantes com formação de raízes (%)	Comprimento dos brotos (%) ^B			
			até 0,5 cm	0,6 –1,0 cm	1,1 –2,0 cm	> 3,0 cm
C+	100,0 a	72,5 a	0,0 c	12,5 a	47,5 a	37,0 a
pBI	92,5 a	2,5 b	50,0 a	20,0 a	12,5 b	0,0 b
CVparcial	62,5 b	0,0 b	77,5 a	22,5 a	0,0 b	0,0 b
CVcompleto	65,0 b	0,0 b	45,0 ab	17,5 a	10,0 b	0,0 b

A - C+ (controle positivo): plantas de fumo não transformadas em meio sem antibióticos

pBI : plantas transformadas com *A. tumefaciens* com pBI121::gus e cultivadas em meio seletivo

CVparcial : plantas transformadas com *A. tumefaciens* com pBI121::cv1887 parcial e cultivadas em meio seletivo

CVcompleto: plantas transformadas com *A. tumefaciens* com pBI121::cv1887 completo e cultivadas em meio seletivo

B- Percentual dos comprimentos dos brotos obtidos com base nas médias dos tamanhos de: até 0,5 cm, 0,6-1,0; 1,1- 2,0 e maior que 3,0 cm

Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey.

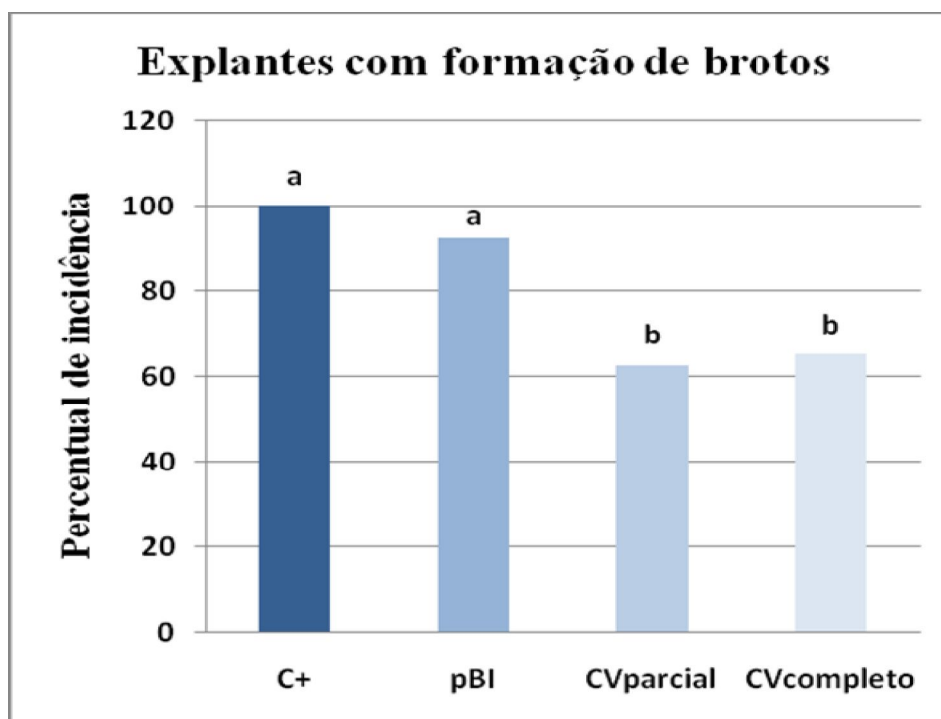


Figura 20: Percentual de explantes com formação de brotos após quatro semanas em meio de indução de brotos (sais e vitaminas MS, sacarose 3,0 %, ágar 0,7 %, 1,0 mg/l de BA) acrescido de 500 mg/l de cefotaxima e 100 mg/l de canamicina (meio seletivo). Onde C+: controle positivo; explantes não co-cultivados com *A. tumefaciens*; pBI: explantes co-cultivados com *A. tumefaciens*::pBI121::gus; CVparcial: explantes co-cultivados com *A. tumefaciens*::pBI121::CV1887 parcial e CVcompleto: explantes co-cultivados com *A. tumefaciens*::pBI121::CV1887 completo.

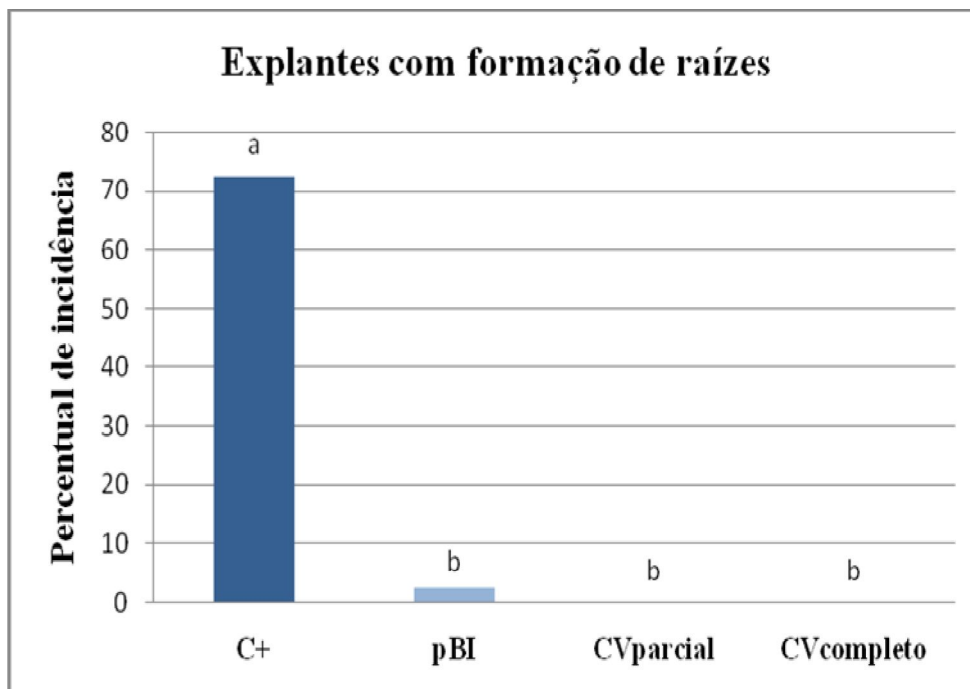


Figura 21: Percentual de explantes com formação de raízes após quatro semanas em meio de indução de brotos (saís e vitaminas MS, sacarose 3,0 %, ágar 0,7 %, 1,0 mg/l de BA) acrescido de 500 mg/l de cefotaxima e 100 mg/l de canamicina (meio seletivo). Onde C+: controle positivo; explantes não co-cultivados com *A. tumefaciens*; pBI: explantes co-cultivados com *A. tumefaciens*::pBI121::gus; CVparcial: explantes co-cultivados com *A. tumefaciens*::pBI121::CV1887 parcial e CVcompleto: explantes co-cultivados com *A. tumefaciens*::pBI121::CV1887 completo.

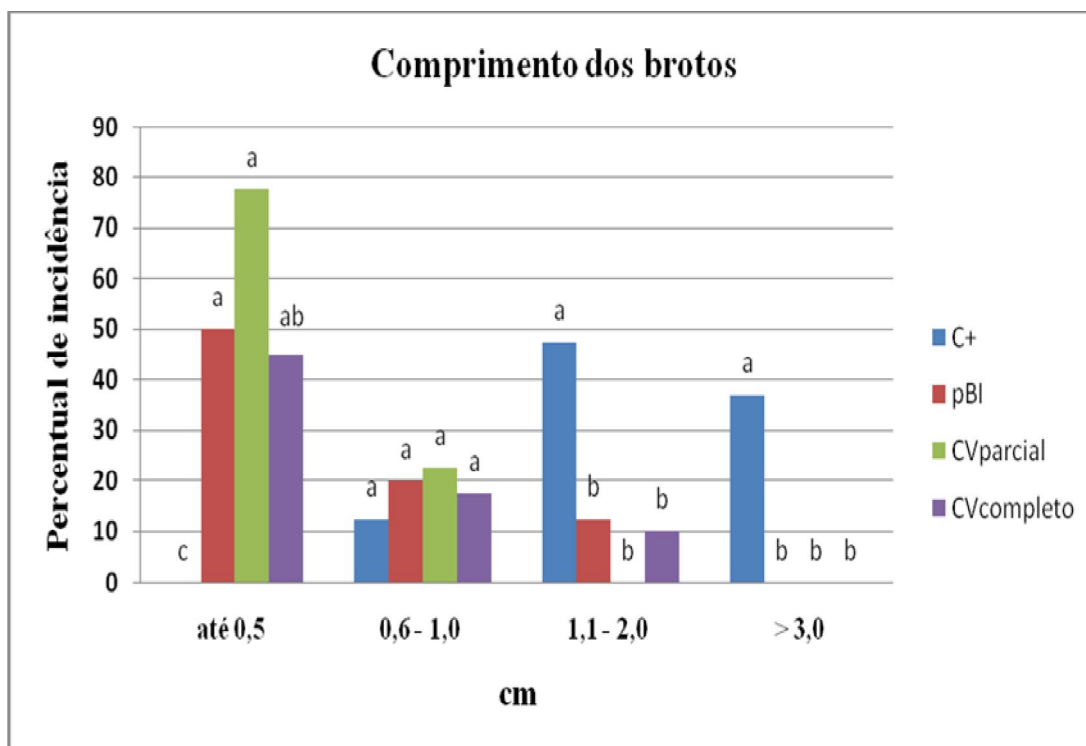


Figura 22: Avaliação do desenvolvimento dos clones de fumo selecionados dos tratamentos C+, pBI, CVparcial e CVcompleto, cultivados por quatro semanas em meio de indução de brotos (sais e vitaminas MS, sacarose 3,0 %, ágar 0,7 %, 1,0 mg/l de BA) acrescido de 500 mg/l de cefotaxima e 100 mg/l de canamicina (meio seletivo).

Ao final de cinco semanas de cultivo os brotos formados a partir dos explantes de cada tratamento, foram cuidadosamente seccionados em condições estéreis e transferidos para frascos contendo meio de enraizamento (sais e vitaminas MS, sacarose 3,0%, ágar 0,7%, pH 5,8) contendo 100 mg/L de canamicina.

Ao final de quatro semanas de cultivo em meio de enraizamento foi observado que a maior média de brotos enraizados foi obtida a partir de brotos originados de explantes pertencentes ao controle positivo (explantes não co-cultivados com a bactéria e cultivados em meio sem antibiótico). Os brotos originados de explantes co-cultivados com *A. tumefaciens* portando os plasmídeo pBI121::gus, pBI121::CV1887 parcial e pBI121::CV1887 pBI também enraizaram em meio seletivo, mas o percentual de enraizamento foi bem inferior. Em relação ao tamanho médio das raízes, os explantes do controle positivo apresentaram um alto índice de desenvolvimento, com aproximadamente 50% apresentando tamanhos superiores a 2,0 cm de comprimento. Foi visto também que os clones transformados com CV1887 tiveram um número reduzido de explantes com tamanho superior a 2,0 cm (Tabela 3 e Figuras 23,24,25).

Os resultados obtidos constituem uma evidência de que as plantas de fumo obtidas por organogênese foram transformadas com os genes *gus*, CV1887 parcial e CV1887 completo, uma vez que, apenas as plantas que tiveram a região-T do plasmídeo pBI121 integrado no seu genoma podem enraizar em meio contendo canamicina na concentração de 100 mg/L.

Os procedimentos de transformação *in vitro* induzem diversas variações nos transformantes primários (T₀). Nesta geração de transformantes, a cultura de tecidos e os efeitos da transformação são confundidos. Está bem estabelecido que o processo de cultura de tecidos pode gerar tanto variações epigenéticas, que são induzidas pelo ambiente no fenótipo, como variações somaclonais. Mesmo com um processo rigoroso de seleção durante a transformação e regeneração, plantas quiméricas, com tecidos transformados e não-transformados, podem persistir na geração T₀ (BHAT; SRINIVASAN, 2002).

As variações somaclonais também contribuem para diferenças entre as plantas transformadas. Muitos fatores têm sido descritos como responsáveis por estas variações, mas a maioria deles podem ser classificados como fatores de estresse, aos quais as plantas estão sujeitas durante a desdiferenciação e regeneração na cultura de tecidos incluindo as lesões, a dissecação, o estresse osmótico e o suprimento insuficiente de nutrientes (FILIPECKI; MALEPSZY, 2006).

A etapa seguinte de confirmação da transformação consistiu na extração de DNA genômico dos clones enraizados em meio seletivo. Foram usados 48 clones como fonte de DNA genômico, dos quais seis do controle positivo, dez dos transformados com *gus*, dezoito dos transformados com CV1887 parcial e treze dos transformados com CV1887 completo. O DNA extraído foi usado como molde em uma reação de amplificação com iniciadores específicos.

Os produtos de PCR foram aplicados em eletroforese em gel de agarose 0,8% resultando em bandas correspondentes ao tamanho dos fragmentos do gene *gus* (1.812 pb) em 80%, CV1887 parcial (2.642 pb) em 84% dos clones e em CV1887 completo (4.155 pb) em 78% dos clones. (Figuras 26, 27, 27 e 29). Os clones dos tratamentos controle não tiveram seu DNA amplificado com os iniciadores específicos para CV1887.

As plantas confirmadas foram aclimatadas em substrato autoclavado formado por areia e vermiculita na proporção de 1:1 e mantidas sob fotoperíodo de 12 horas a uma temperatura de 25 °C.

TABELA 3 - Respostas de brotos de fumo (*Nicotiana tabacum* va. Xanthi) originados de explantes co-cultivados com *A.tumefaciens* LBA4404 portando os seguintes plasmídeos: pBI121::gus, pBI121::cv 1887 parcial, pBI121::cv 1887 completo, após quatro semanas de cultivo em meio de enraizamento (saís e vitaminas MS e canamicina 100 mg/L); e os explantes controle não co-cultivados com *A. tumefaciens*.

Tratamentos ^A	Comprimento dos brotos (%) ^B				Explantes com formação de raízes (%)
	0- 0,5 cm	0,6 –1,0 cm	1,1 –2,0 cm	> 3,0 cm	
C+	1,0 c	2,0 b	38,0 a	60,0 a	69,0 a
pBI	27,0 bc	35,0 a	21,0 ab	21,0 b	54,0 bc
CVparcial	85,0 a	9,0 ab	3,0 b	5,0 b	22,0 c
CVcompleto	37,0 b	18,0 ab	26,0 ab	18,0 b	24,0 b

- A** - C+ (controle positivo): plantas de fumo não transformadas em meio sem antibióticos
 pBI : plantas transformadas com *A. tumefaciens* com pBI121::gus e cultivadas em meio seletivo
 CVparcial : plantas transformadas com *A. tumefaciens* com pBI121::cv1887 parcial e cultivadas em meio seletivo
 CVcompleto: plantas transformadas com *A. tumefaciens* com pBI121::cv1887 completo e cultivadas em meio seletivo
- B**- Percentual dos comprimentos dos brotos obtidos com base nas médias dos tamanhos de: até 0,5 cm, 0,6-1,0; 1,1-2,0 e maior que 3,0 cm

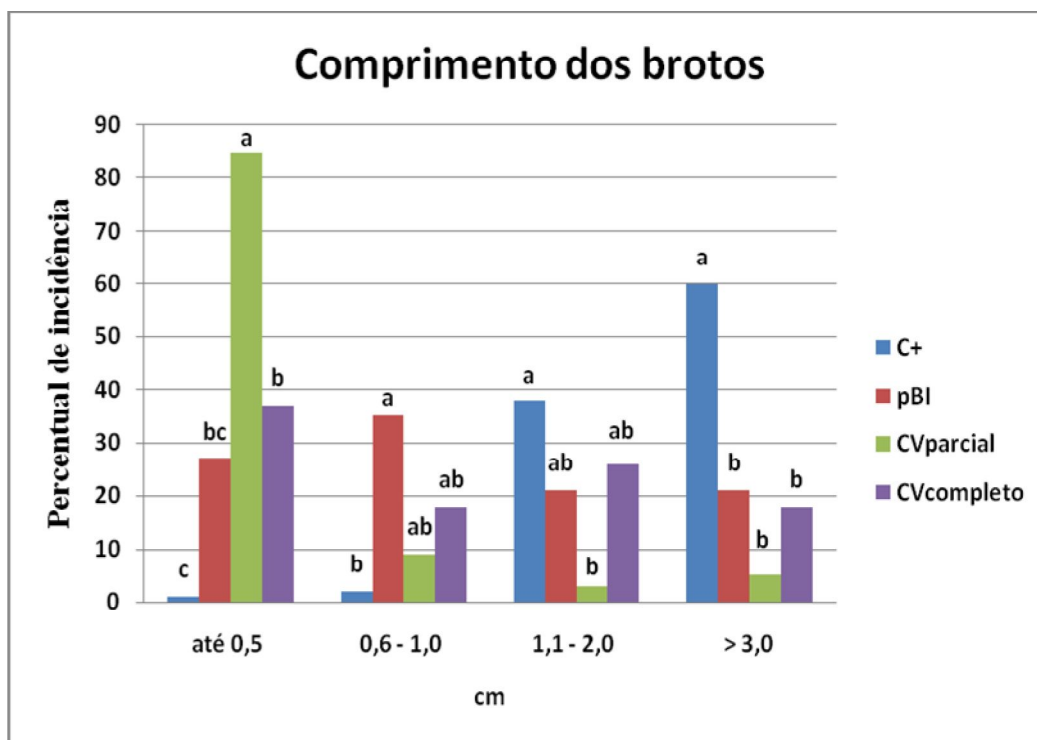


Figura 23: Avaliação do desenvolvimento dos clones de fumo selecionados dos tratamentos C+, pBI, CVparcial e CVcompleto, cultivados por quatro semanas em meio de enraizamento (saís e vitaminas MS e canamicina 100 mg/L).

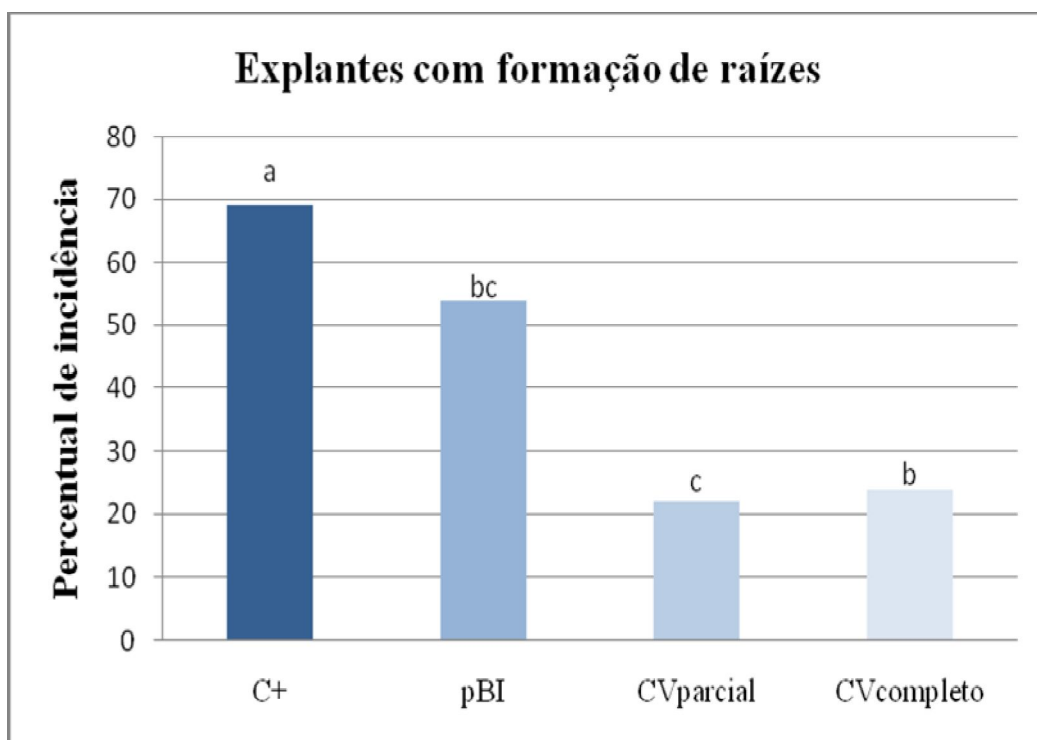


Figura 24: Percentual de explantes com formação de raízes após quatro semanas em meio de enraizamento (saís e vitaminas MS e 100 mg/l de canamicina). Onde C+: controle positivo; explantes não co-cultivados com *A. tumefaciens*; pBI: explantes co-cultivados com *A. tumefaciens*::pBI121::gus; CVparcial: explantes co-cultivados com *A. tumefaciens*::pBI121::CV1887 parcial e CVcompleto: explantes co-cultivados com *A. tumefaciens*::pBI121::CV1887 completo.

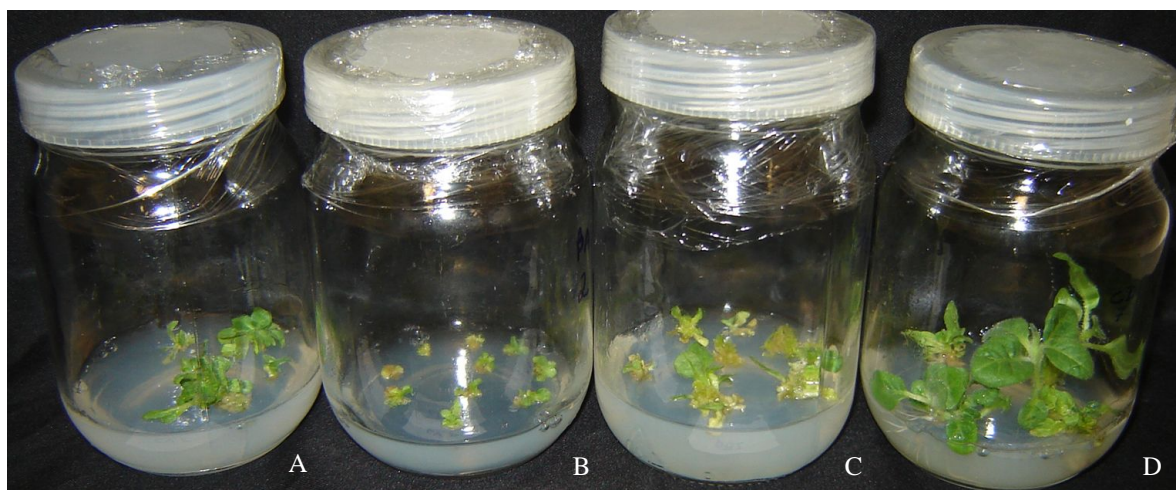


Figura 25: Aspecto dos explantes de fumo (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) transformados em meio de enraizamento e utilizados como controle. (A) Explantes co-cultivados com *A. tumefaciens*::pBI121::CV1887 completo, (B) Explantes co-cultivados com *A. tumefaciens*::pBI121::CV1887 parcial, (C) Explantes co-cultivados com *A. tumefaciens*::pBI121::gus, (D) Tratamento controle não co-cultivado com *A. tumefaciens*.

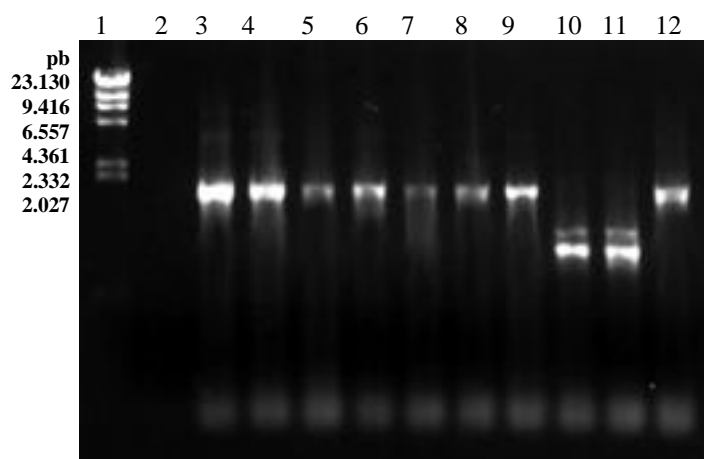


Figura 26: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR amplificados a partir do DNA genômico extraído de plantas de fumo transformadas com pBI 121::gus. Poço 1: Marcador λ DNA Hind III 250 ng; Poço 2: controle negativo da reação; Poços 3 ao 12: produtos de clones de pBI 121::gus. Em cada poço foram aplicados 5 μ L de amostra.

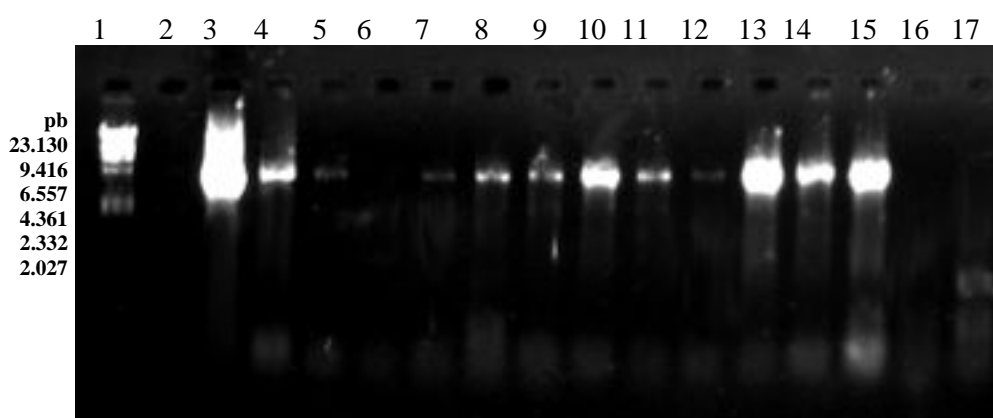


Figura 27: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR amplificados a partir do DNA genômico extraído de plantas de fumo transformadas com pBI 121::cv1887 completo. Poço 1: Marcador λ DNA Hind III 250 ng; Poço 2: controle negativo da reação; Poço 3: controle positivo pGEM::cv1887 completo; Poços 4 ao 17: produtos de clones de pBI 121::cv 1887 completo. Em cada poço foram aplicados 5 μ L de amostra.

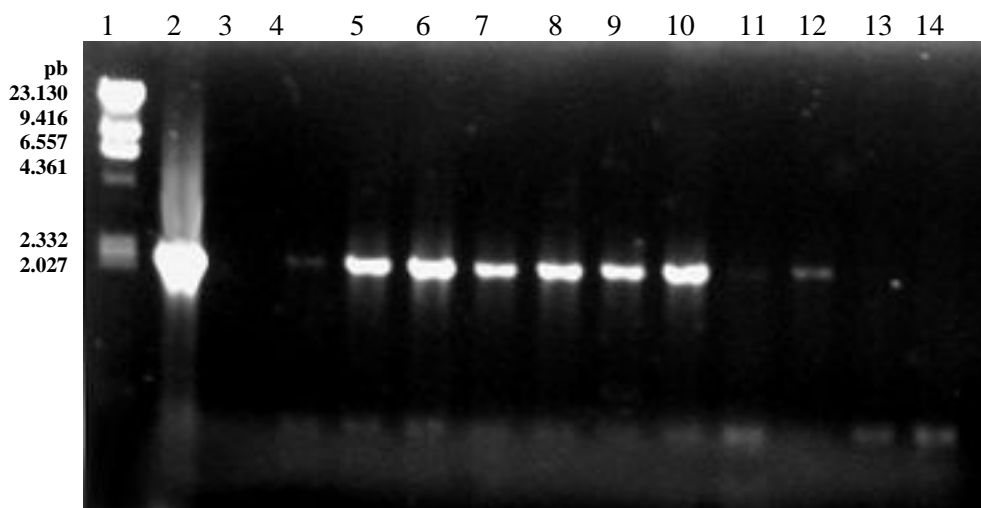


Figura 28: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR amplificados a partir do DNA genômico extraído de plantas de fumo transformadas com pBI 121::cv1887 parcial. Poço 1: Marcador λ DNA Hind III 250 ng; Poço 2: controle positivo pGEM::cv1887 parcial; Poço 3: controle negativo da reação; Poços 4 ao 14: produtos de clones de pBI 121::cv 1887 parcial. Em cada poço foram aplicados 5 μ L de amostra.

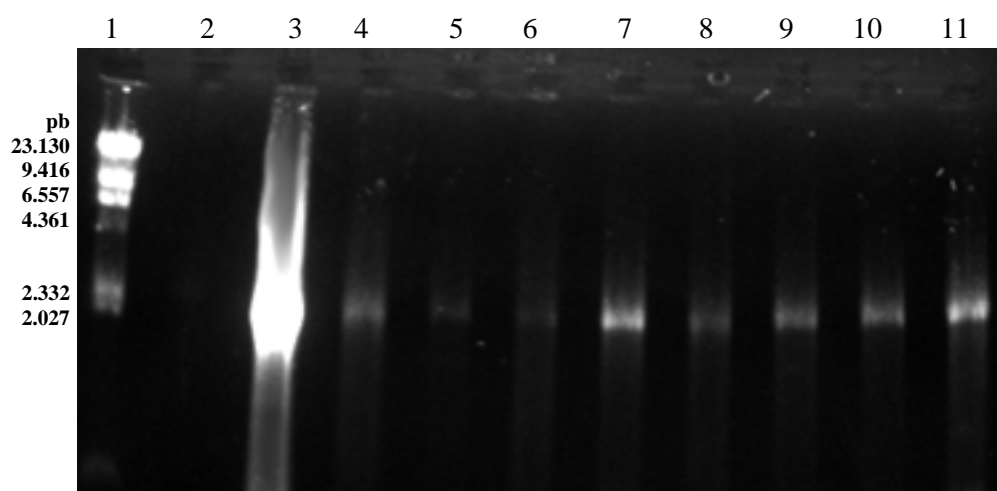


Figura 29: Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos de PCR amplificados a partir do DNA genômico extraído de plantas de fumo transformadas com pBI 121::cv1887 parcial. Poço 1: Marcador λ DNA Hind III 250 ng; Poço 2: controle negativo da reação; Poço 3: controle positivo pGEM::cv1887 parcial; Poços 4 ao 11: produtos de clones de pBI 121::cv 1887 parcial. Em cada poço foram aplicados 5 μ L de amostra.

5.5. Extração de RNA e RT-PCR

Foram selecionados dois clones das plantas controle não co-cultivadas com *A. tumefaciens*, três clones das plantas transformadas com *gus*, três clones das transformadas com CV1887 parcial e dois clones das transformadas com cv 1887 completo para extração de RNA total. Foi possível observar a presença de RNA em todos os clones, podendo-se identificar as bandas correspondentes ao RNA ribossômico 18S e 28S (Figura 30).

A partir das amostras de RNA extraídas o cDNA de cada clone foi sintetizado através de uma reação de RT-PCR, sendo possível observar a presença de um produto amplificado com aproximadamente 2.642 pb para os três clones de cv 1887 parcial e outro com 1812 pb para os três clones transformados com *gus* (Figuras 31 e 32). A expressão de cv 1887 completo não foi observada.

As diferenças nos níveis de expressão também podem ser atribuídas ao número de cópias presentes em plantas transgênicas independentes e ao efeito de posição do transgene. Plantas resultantes de eventos independentes de transformação com as mesmas construções podem ter uma ou várias inserções dos genes, e essas inserções podem também carregar consigo seqüências de vetor, que também são transferidas (KOHLI *et al.*, 1998).

A integração do transgene mediada por *Agrobacterium*, é um processo randômico. Transcricionalmente, algumas regiões ativas do genoma são favorecidas, como por exemplo, as regiões subterminais dos cromossomos, talvez devido à maior acessibilidade do DNA à essas áreas. Do contrário, se a inserção ocorrer em uma região heterocromática a expressão será suprimida (ALPETER *et al.*, 2005, BAHT; SRINIVASAN, 2002, GELVIN, 1998).

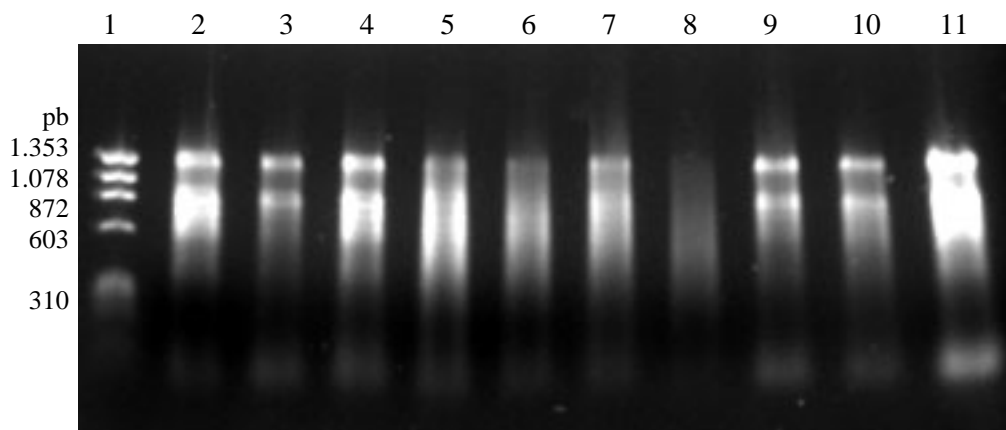


Figura 30: Eletroforese em gel de agarose 1,2% das amostras de RNA total extraídas de plantas de fumo controle e transformadas com *gus*, cv 1887 parcial e cv 1887 completo. Poço 1: Marcador ϕ -X174 RF DNA/*Hae* III 250 ng; Poços 2 ao 4: amostras de RNA extraído de plantas transformadas com cv 1887 parcial; Poços 5 e 6: amostras de RNA extraído de plantas transformadas com cv 1887 completo; Poços 7 ao 9: amostras de RNA extraído de plantas transformadas com o gene *gus*; Poços 10 e 11: amostras de plantas controle não transformadas. Em cada poço foram aplicados 3 μ L de amostra.

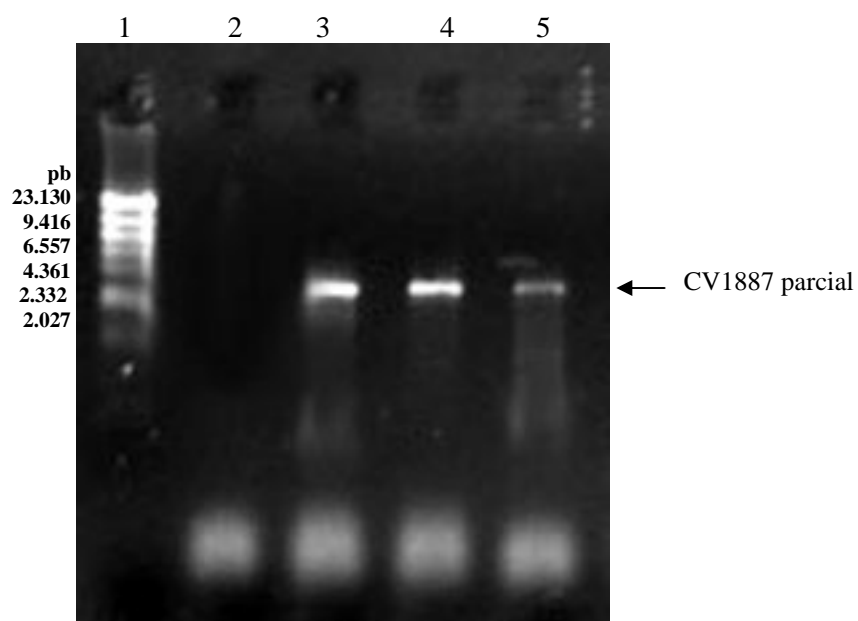


Figura 31: Eletroforese em gel de agarose 1,0% dos produtos de PCR amplificados a partir do cDNA sintetizado a partir de amostras de RNA extraídas de plantas de fumo transformadas CV1887 parcial. Poço 1: Marcador λ DNA Hind III 250 ng; Poço 2: controle negativo; Poços 3, 4 e 5: produtos dos clones transformados. Em cada poço foram aplicados 5 μ L de amostra.

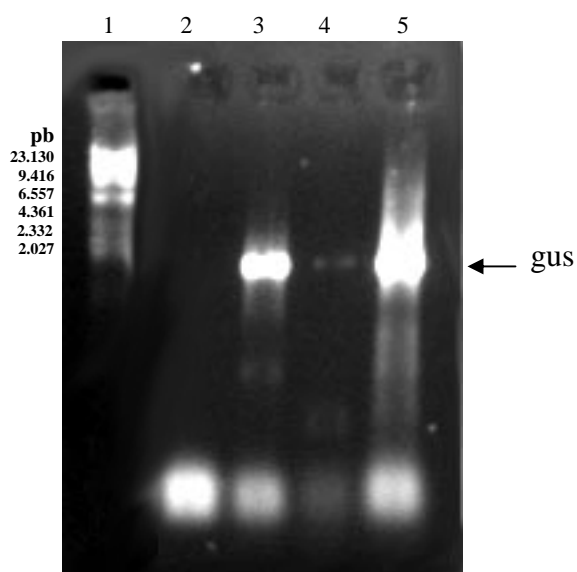


Figura 32: Eletroforese em gel de agarose 1,0% dos produtos de PCR amplificados a partir do cDNA sintetizado a partir de amostras de RNA extraídas de plantas de fumo transformadas com *gus*. Poço 1: Marcador λ DNA Hind III 250 ng; Poço 2: controle negativo; Poços 3, 4 e 5: produtos dos clones transformados. Em cada poço foram aplicados 5 μ L de amostra.

Muitos genes bacterianos têm sido identificados e expressos em plantas de tabaco transgênicas. As plantas geneticamente transformadas com esses genes mostram uma ativação espontânea de diferentes mecanismos de defesa deixando a planta em um intenso estado de defesa. Isto permite uma melhora na habilidade da planta em reagir rapidamente à invasão do patógeno como também, na supressão da infecção (JUBE; BORTHAKUR, 2007).

Jang et al. (2006) mostraram que, a expressão do gene *hrpN* da bactéria *Erwinia amylovora*, em plantas de fumo, promoveram uma melhoria no crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como, um aumento na resistência ao fungo *Botrytis cinerea*. No trabalho foram avaliados os níveis de expressão, podendo ser confirmada a amplificação dos transcritos de *hrpN* a partir de um único indivíduo transgênico. Hatziloukas; Panopoulos (1992) também já haviam demonstrado que a expressão funcional do gene *argK* de *Pseudomonas syringae*, em plantas de tabaco, resultou numa resistência da planta contra *P. syringae*. Em outra abordagem, a expressão da proteína Cry2Aa2 de *B. thuringiensis*, também foi relatada em plantas de fumo por Kota et al. (1999). As folhas de fumo transformadas mostraram um nível de expressão da proteína a níveis de aproximadamente 3% do total de proteínas solúveis. Estes resultados sugerem que plantas de fumo expressando o gene *cry2Aa2* tornam-se resistente ao ataque por insetos.

Baseado no trabalho de Jube; Borthakur (2007), nenhuma planta de fumo expressando gene bacteriano com um potencial na defesa contra nematóides foi relatada até o momento. A expressão da proteína CV1887 de *Chromobacterium violaceum*, em plantas de tabaco, representa uma alternativa promissora para a geração de organismos resistentes ao ataque destas pragas.

6. CONCLUSÃO

Plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) foram transformadas com as sequências codificadoras CV1887 parcial e CV1887 completo via *Agrobacterium tumefaciens*. A expressão também foi verificada pela análise dos transcritos nos clones transformados com CV1887 parcial, sendo o primeiro relato de expressão desta proteína em plantas, que constitui um modelo para a validação da atividade determinada *in silico* na anotação do genoma.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTPETER, F.; BAISAKH, N.; BEACHY, R.; BOCK, R.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; DANIELL, H.; DATTA, K.; DATTA, S.; DIX PJ; FAUQUET, C; HUANG, N; KOHLI, A; MOOIBROEK, H; NICHOLSON, L; NGUYEN, TT; NUGENT, G; RAEMAKERS, K; ROMANO, A; SOMERS, DA; STOGER, E; TAYLOR, N; VISSER R. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. **Molecular Breeding**, v. 15, p. 305-327, 2005.

ANDERSON, P. M.; SUNG, Y. C. & FUCHS, J. A. The cyanase operon and cyanate metabolism. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 7, p. 247–252, 1990.

ATKINSON, H.J; GRIMWOOD, S; JOHNSTON, K.; GREEN, J. Prototype Demonstration of Transgenic Resistance to the Nematode *Radopholus similis* Conferred on Banana by a Cystatin. **Transgenic Research**, v. 13, p.135-142, 2004.

ATKINSON, H.J.; URWIN, P.E.; MCPHERSON, Michael J. Engineering plants for nematode resistance. **Annual Reviews of Phytopathology**, v. 41, p.615-639, 2003.

AUGUST, P.R.; GROSSMAN, T.H.; MINOR, C.; DRAPER, M.P.; MACNEIL, I.A.; PEMBERTON, J.M.; CALL, K.M.; HOLT, D.; SOSBURNE, M.S. Sequence analysis and functional characterization of the violacein biosynthetic pathway from *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**. v. 2, p. 513-519, 2000.

BAKER, C.J.; MOCK, N.M.; WHITAKER, B.D.;ROBERTS, D.P.;RICE, C.P.; DEAHL, K.L.; AVERYANOV, A.A. Involvement of acetosyringone in plant–pathogen recognition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, p.130–136, 2005.

BEKAL, S.; BORNEMAN, J.; SPRINGER, M.S.; GIBLIN-DAVIS, R.M.; BECKER, J.O. Phenotypic and molecular analysis of a *Pasteuria* strain parasitic to the sting nematode. **Journal of Nematology**, v. 33, p. 110–115, 2001.

BHAT, S. R.; SRINIVASAN, S. Molecular and genetic analyses of transgenic plants: Considerations and approaches. **Plant Science**, v. 163, n. 4, p.673-681, 2002.

BIRD, David Mck.; OPPERMAN, Charles H.; DAVIES, Keith G.. Interactions between bacteria and plant-parasitic nematodes: now and then. **International Journal For Parasitology**, v. 33, p.1269-1276, 2003.

BOENARE, N.E.; GIVAUDAN, A.; BREHELIN, M.; LAUMOND, C.. Symbiosis and pathogenicity of nematode–bacterium complex. **Symbiosis**, v. 22, p. 21–45, 1997.

CAMPBELL, S. C., OLSON, G. J., CLARK, T. R. & MCFETERS, G.. Biogenic production of cyanide and its application to gold recovery. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** v. 26, p. 134–139, 2001.

CHARLES, J.F.; NIELSEN-LEROUX, C.. Mosquitocidal Bacterial Toxins: Diversity, Mode of Action and Resistance Phenomena. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 201-206, 2000.

CHEN, G., ZHANG, Y., LI, J., DUNPHY, G. B., PUNJA, Z. K. & WEBSTER, J. M. Chitinase activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species, bacterial associates of entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate. Pathology**, v. 68, p. 101–108, 1996.

CHEN, P.Y.; WANG, C.K.; SOONG, S.C.; TO, K.Y. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. **Molecular Breeding**, v. 11, n. 4, p. 287-293, 2003.

CHRISTOU, P.; CAPEL, T.; KOHLI, A.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. **Trends In Plant Science**, v. 11, n. 6, p.302-305, 2006.

COBER, E.R.; RIOUX, S.; RAJCAN, I.; DONALDSON, P.A; SIMMONDS, D.H. Partial Resistance to White Mold in a Transgenic Soybean Line. **Crop Science**, v. 43, p. 92-95, 2003.

COLLINGE, D.B.; LUND, O.S.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. What are the prospects for genetically engineered, disease resistant plants? **European Journal of Plant Pathology**, v. 121, n. 3, p.217-231, 2008.

COSTA, M.S.; MIGUEL, C.; OLIVEIRA, M.M. An improved selection strategy and the use of acetosyringone in shoot induction medium increase almond transformation efficiency by 100-fold. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 85, p. 205–209, 2006.

CRONIN, D.; LOCCOZ, Y.M.; DUNNE; O’GARA, F.C. Inhibition of egg hatch of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* by chitinase-producing bacteria. **European Journal Of Plant Pathology**, v. 103, p.433-440, 1997.

DALAL, M.; DANI, R. G.; KUMAR, P. A.. Current Trends in the genetic engineering of vegetable crops. **Scientia Horticulturae**, J, v. 107, n. , p.215-225, 2006.

DAN, Y. Biological functions of antioxidants in plant transformation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 44, p. 149-161, 2008.

DANIELL, H.; LEE, S-B.; PANCHAL, T.; WIEBE, P.O. Expression of the native Cholera Toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. **Journal of Molecular Biology**, v. 311, no. 5, p. 1001-1009, 2001.

DAVIES, K.G.; FARGETTE, M.; GETAL, B.. Cuticle heterogeneity as exhibited by *Pasteuria* spore attachment is not linked to the phylogeny of parthenogenetic root-knot nematode (*Meloidogyne spp.*). **Parasitology**, v. 122, p. 111–120, 2000.

DAVIS, E.L.; MITCHUM, M.G. Nematodes. Sophisticated parasites of legumes. **Plant Physiology**, v. 137, p. 1182-1188, 2005.

DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

DURAN, N., RETTORI, D., MENCK, C.F.M. Quem é a *Chromobacterium violaceum*? Perspectivas farmacológicas e industriais na era pós-genômica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.20, p. 38-43. 2001.

DURAN, N., AND MENCK, C.F. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, n. 27, p. 201–222, 2001.

EMMERT, E. A. B.; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram +) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, v. 171, p. 1–9, 1999.

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

FEULNER, G., GRAY, J. A., KIRSCHMAN, J. A., LEHNER, A. F., SADOSKY, A. B., VLAZNY, D. A., ZHANG, J., ZHAO, S. & HILL, C. W. Structure of the *rhsA* locus from *Escherichia coli* K-12 and comparison of *rhsA* with other members of the *rhs* multigene family. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 446–456, 1990.

FILIPECKI, M.; MALEPSZY, S. Unintended consequences of plant transformation: molecular insight. **Journal of Applied Genetics**, v. 47, n. 4, p. 277-286, 2006.

FLEISCHMANN, R. D., ADAMS, M. D., WHITE, O., CLAYTON, R. A., KIRKNESS, E. F., KERLAVAGE, A. R., BULT, C. J., TOMP, J. F., DOUGHERTY, B. A.; MERRICK, J. M. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, v. 269, p. 496–512, 1995.

FONTES, E. M.G. Legal and regulatory concerns about transgenic plants in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 2003, n. 83, p.100-103, 2003.

FOSTER, S. J. Molecular analysis of three major wall-associated proteins of *Bacillus subtilis* 168: evidence for processing of the product of a gene encoding a 258 kDa precursor two-domain ligand-binding protein. **Molecular Microbiology**, v. 8, p. 299–310, 1993.

FUKAMIZO, T. Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application. **Current protein & peptide science**, v. 1, n. 1, p. 105-24, 2000

GELVIN, S.B. The introduction and expression of transgenes in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v 9, p. 227-232, 1998

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

HAMID, M.; SIDDIQUI, I. A.; SHAUKAT, S. S. Improvement of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 biocontrol activity against root-knot nematode by the addition of ammonium molybdate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p.239-244, 2003.

HAQ, S.K.; ATIF, S.M.; KHAN, R.H.. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, v. 431, p.145-159, 18 ago. 2004.

HATZILOUKAS, E.; PANOPOULOS, N. J. Origin, Structure, and Regulation of *argk*, Encoding the Phaseolotoxin-Resistant Ornithine Carbamoyltransferase in *Pseudomonas-Syringae* Pv *Phaseolicola*, and Functional Expression of *argk* in Transgenic Tobacco. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 18, p.5895-5909, 1992.

HE, M.; YANG, Z-Y; Nie, Y-F; WANG, J.; XU, P. A new type of class I bacterial 5-enopyruvylshikimate-3-phosphate synthase mutants with enhanced tolerance to glyphosate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1568, no. 1, p. 1-6, 2001.

HEIL, M., BOSTOCK, R.M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of botany**, v.89, n. 5, p. 503-12, 2002.

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

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

HOSS, S.; ARNDT, M.; BAUMGARTE, S.; Tebbe, C.C.; Nguyen, H.T.; Jehle, J.A. Effects of transgenic corn and Cry1Ab protein on the nematode, *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 70, p.334-340, 2008.

HUANG, X.; TIAN, B.; QIUHONG, N.; YANG, J.; ZHANG, L.; ZHANG, K. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes, **Research in Microbiology**, v. 156, p.719-727, 2005.

HUESING, J.E., SHADE, R.E., CHRISPPEELS, M.J., MURDOCK, L.L. α -amylase inhibitor, not phytohemagglutinin, explains resistance of common bean to cowpea weevil. **Plant Physiology**, v. 96, p. 993-996, 1991.

HUISMAN, G.W., PEOPLES, O.P., SKRALY, F. Microbes with polyhydroalkanoate (PHA) biosynthesis genes integrated into their chromosome and method for producing PHAs and screening for PHA genes. **Chemical Abstracts**, v. 132, 2000.

JANG, Y.S.; SOHN, S.I.; WANG, M.H. The *hrpN* gene of *Erwinia amylovora* stimulates tobacco growth and enhances resistance to *Botrytis cinerea*. **Plant**, v. 223, p. 449-456, 2006.

JANSSEN, D. B., PRIES, F. & VAN DER PLOEG, J. R. Genetics and biochemistry of dehalogenating enzymes. **Annuals Reviews of Microbiology**, v. 48, p.163–191, 1994.

JUBE, S.; BORTHAKUR, D. Expression of bacterial genes in transgenic tobacco: methods, applications and future prospects. **Electronic Journal Of Biotechnology**, v. 10, n. 3, p.452-467, 2007.

JUNG, C.; WYSS, U. New approaches to control plant parasitic nematodes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 439-446, 1999.

KALPANA, K ; MARUTHASALAM, S.; RAJESH, T.; POOVANNAN, K.; KUMAR, K.K.; KOKILADEVI, E.; RAJA, J.A.J.; SUDHAKAR,D.; VELAZHAHAN, R.; SAMIYAPPAN, R.; BALASUBRAMANIAN, P. Engineering sheath blight resistance in elite indica rice cultivars using genes encoding defense proteins. **Plant Science**, v. 170, p. 203-215, 2006.

KOHLI, A.; LEECH,M.; VAIN, P.; LAURIE, D.A.; CHRISTOU, P.. Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 12, p. 7203-7208, 1998.

KOLIBACHUK, D., MILLER, A., DENNIS, D. Cloning, molecular analysis and expression of the polyhydroxyalkanoic acid syntase (phaC) gene from *Chromobacterium violaceum*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3561-3565, 1999.

KOTA, M.; DANIELL, H.; VARMA, S.; GARCZYNSKI, S. F.; GOULD, F. and MOAR, W. J. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, no. 5, p.1840-1845, 1999.

KUTA, D.D.; TRIPATHI, L. Agrobacterium-induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against Agrobacterium-mediated DNA transfer. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 8, p. 752-757, 2005.

LAMB, C.J., RYALS, J.A., WARD, E.R., DIXON, R.A. Emerging strategies for enhancing crop resistance to microbial pathogens. **Biotechnology**, v. 10, n. 11, p. 1436-45, 1992.

LAVILLE, J., BLUMMER, C., VON SCHROETTER, C., GAIA, V., DE FAGO, G., KEEL, C. & HAAS, D. Characterization of the *hcnABC* Gene Cluster Encoding Hydrogen Cyanide Synthase and Anaerobic Regulation by ANR in the Strictly Aerobic Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* CHAO. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 3187–3196, 1998.

LI X.Q; WEI, J.Z, TAN, A.; AROIAN, R.V. Resistance to root-knot nematode in tomato roots expressing a nematocidal *Bacillus thuringiensis* crystal protein. **Plant Biotechnology Journal**, v. 4, n. 4, p. 455-464, 2007.

LILLEY, C. J.; URWIN, P. E.; JOHNSTON, K. A.. Preferential expression of a plant cystatin at nematode feeding sites confers resistance to *Meloidogyne incognita* and *Globodera pallida*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 2, n. , p.3-12, 2004.

MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v. 17, p. 193–199, 2001

MAE, A.; MONTESANO, M.; KOIV, V.; PALVA, E. T.. Transgenic plants producing the bacterial pheromone N-acyl-homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, vol. 14, no. 9, p. 1035-1042, 2001.

MARROQUIN, L. D.; ELYASSNIA, D.; GRIFFITTS, J. S.; Feitelson, J. S.; AROIAN, R. V. *Bacillus thuringiensis* (Bt) Toxin Susceptibility and Isolation of Resistance Mutants in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genetics Society of America**, v. 155, p.1693-1699, 2000.

MCLEAN, M. D.; YEVTUSHENKO, D. P.; DESCHENE, A.; Van CAUWENBERGHE, O. R.; Overexpression of glutamate decarboxylase in transgenic tobacco plants confers resistance to the northern root-knot nematode. **Molecular Breeding**, v. 11, n. 4, p.277-285, 2004.

MINET, A.D. & CHIQUET-EHRISMANN, R. Phylogenetic analysis of teneurin genes and comparison to the rearrangement hot spot elements of *E. coli*. **Gene**, v. 257, n. 1, p. 87-97, 2000.

MINET A.D., RUBIN B.P., TUCKER, R.P., BAUMGARTNER, S., CHIQUET-EHRISMANN, R. Teneurin-1, a vertebrate homologue of the *Drosophila* pair-rule gene Ten-m, is a neuronal protein with a novel type of heparin-binding domain. **Journal of Cell Science**, v.112, p. 2019-2032, 1999.

MOAR, W.J. Breathing new life into insect-resistant plants. **Nature Biotechnology** v. 21, p.1152-1154, 2003

MURDOCK, L.L., HUESING, J.E., NIELSEN, S.S., PRATT, R.C., SHADE, R.E. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. **Phytochemistry**, v. 29, n. 1, p. 85-89, 1990.

NELSON, L. M. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. Online. **Crop Management**. doi:10.1094/CM-2004-0301-05-RV.

NIELSEN, K.M. Transgenic organisms- time for conceptual diversification. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 227-228, 2003.

OLIVEIRA, E.J.; RABINOVITCH, L.; MONNERAT, R.G.; PASSOS, L. K. J.; ZAHNER,V. Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potential use in biological control. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 6657–6664, 2004.

QU, J.; YE, J.; FANG, R. Artificial MicroRNA-Mediated Virus Resistance in Plants. **Journal of Virology**, v. 81, n. 12, p. 6690-6699, 2007.

RIPOLL, C.; FAVERY, B.; LECOMTE, P.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, W.; ABAD, P.; JOUANIN, L. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. **Plant Science**, v. 164, n. 4, p.517-523, 2003.

ROMLING, U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. **Research in Microbiology**, v. 153, 205–212, 2002.

ROMMENS, C.M.; HARING, M.A.; SWORDS, K.; DAVIES, H.V.; BELKNAP, W.R.. The intragenic approach as a new extension to traditional plant breeding. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 9, p. 397-403, 2007.

RYAN, C.A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Reviews of Phytopathology**, v 28, p. 425–449, 1990.

RYAN, R. P; GERMAINE, Kieran; FRANKS, Ashley.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **Federation Of European Microbiological Societies**, v. 278, p.1-9, 2008.

SADOSKY AB, GRAY JA, HILL CW. The RhsD-E subfamily of *Escherichia coli* K-12. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 25, p.7177-83, 1991.

SAMALIEV, H.Y., ANDREOGLOU, F.I., ELAWAD, S.A., HAGUE, N.G.M., GOWEN, S.R. The nematicidal effects of the bacteria *Pseudomonas oryzihabitans* and *Xenorhabdus nematophilus* on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Nematology**, v. 2, p. 507-514, 2000.

SAMBROOK, J. FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SIDDIQUI, I.A.; SHAUKAT, S.S. Zinc and glycerol enhance the production of nematicidal compounds in vitro and improve the biocontrol of *Meloidogyne javanica* in tomato by fluorescent pseudomonas. **Letters in Applied Microbiology**, v 35, p. 212–217, 2002.

SIDDIQUI, I.A.; SHAUKAT, S.S. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. **Soil Biology and Biochemistry**, v 35, p. 1615–1623, 2003.

SIDDIQUI, Z.A; MAHMOOD, I. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes, a review. **Bioresource technology**, v 69, p. 167–179, 1999.

SIDDIQUI, Z. A.; BAGHEL, G.; AKHTAR, M. S.. Biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Rhizobium* and plant growth-promoting rhizobacteria on lentil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p.435-441, 2007.

SMIGOCKI, A.; NEAL, J.W. Jr.; MC CANNA, I.; DOUGLASS, L. Cytokinin-mediated insect resistance in Nicotiana plants transformed with the ipt gene. **Plant Molecular Biology**, v. 23, no. 2, p. 325-335, 1993

SMITH, A. D. & HUNT, R. J. Solubilization of gold by *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 35, p.110–116, 1985.

TIAN, Baoyu; YANG, Jinkui; ZHANG, Ke-qin. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. **Federation Of European Microbiological Societies**, v. 61, p.197-213, 2007.

VASCONCELOS, A.T.R. de, ALMEIDA D.F. de, HUNGRIA, M., GUIMARÃES C.T., ANTONIO, R.V., ALMEIDA, F.C., ALMEIDA, L.G.P., ALMEIDA, R., ALVES-GOMES J.A., ANDRADE, E.M., ARARIPE, J., ARAÚJO, M.F.F., ASTOLFI, S., AZEVEDO V., BAPTISTA, A.J., BATAUS, L.A.M., BATISTA, J.D., BELO, A., VAN DEN BERG, C., BOGO, M., BONATTO, S., BORDIGNON, J., BRIGIDO, M.M., BRITO, C.A., BROCCHI, M., BURITY, H.A., CAMARGO, A.A., CARDOSO, D.D., CARNEIRO, N.P., CAVADA, B.S., CHUEIRE, L.M.O., CRECZYNSKI-PASA, T.B., DA CUNHA, N.C., FAGUNDES, N., FALCÃO, C.L., FANTINATTI, F., FARIAS, L.P., FELIPE, M.S.S., FERRARI, L.P., FERRO, J.A., FERRO, M.T., FRANCO, G.R., DE FREITAS, N.S.A., FURLAN, L.R., GAZZINELLI, R.T., GOMES, E.A., GONÇALVES, P.R., GRANGEIRO, T.B., GRATTAPAGLIA, D., GRISARD, E.C., HANNA, E.S., JARDIM, S.N., LAURINO, J., LEOI, L.C.T., LIMA, L.F.A., LOUREIRO, M.D., DE LYRA, M.D.C.P., MADEIRA, H.M.F., MANFIO, G.P., MARANHÃO, A.Q., MARTINS, W.S., DI MAURO, S.M.Z., DE MEDEIROS, S.R.B., MEISSNER, R.D., MOREIRA, M.A.M., DO NASCIMENTO, F.F., NICOLAS, M.F., OLIVEIRA, J.G., OLIVEIRA, S.C., PAIXÃO, R.F.C., PARENTE, J.A., PEDROSA, F.D.P., PENA, S.D.J., PEREIRA, J.O., PEREIRA, M., PINTO, L.S.C., PINTO, L.D., PORTO, J.I.R., POTRICH, D.P., RAMALHO-NETO, C.E., REIS, A.M.M., RIGO, L.U., RONDINELLI, E., DO SANTOS, E.B.P., SANTOS, F.R., SCHNEIDER, M.P.C., SEUANEZ, H.N., SILVA, A.M.R., DA SILVA, A.L.D., SILVA, D.W., SILVA, R., SIMÕES, I.D., SIMON, D., SOARES, C.M.D., SOARES, R.D.A., SOUZA, E.M., DE SOUZA, K.R.L., SOUZA, R.C., STEFFENS, M.B.R., STEINDEL, M., TEIXEIRA, S.R., URMENYI, T., VETTORE, A., WASSEM, R., ZAHA, A., SIMPSON, A.J.G. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 20, p. 11660-11665, 2003.

URWIN, Peter E., ATKINSON, Howard J., WALLER, D.A. and MCPHERSON, M.J. Engineered oryzacystatin-I expressed in transgenic hairy roots confers resistance to *Globodera pallida*. **Plant Journal**. 8, 121–131, 1995.

VOLNER, A., SAM, M., HAN, A.Y. *Chromobacterium violaceum* phenylalanine hydroxylase: Cloning, purification, and iron-dependent catalysis. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 219, 2000.

WANG, He-Yong; LI, Yun-Feng; XIE, Long-Xu and XU, Peilin. Expression of a bacterial *aroA* mutant, *aroA*-M1, encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase for the production of glyphosate-resistant tobacco plants. **Journal of Plant Research**, vol. 116, no. 6, p. 455-460, 2003.

WANG, J.; SUN, Y.; LI, Y. Maize (*Zea mays*) genetic transformation by co-cultivating germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 46, p. 51–55, 2007.

WATSON, J.; KOYA, V.; LEPLA, S. H.; DANIELL, H. Expression of *Bacillus anthracis* protective antigen in transgenic chloroplasts of tobacco, a non-food/feed crop. **Vaccine**, v. 22, n. 31-32, p. 4374-4384, 2004

WEI, J.Z.; HALE K, CARTA L, PLATZER E, WONG C, FANG SC, AROIAN RV. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 5, p. 2760-2765, 2003.

WILLIAMSON, V.M.; KUMAR, A. Nematode resistance in plants: the battle underground. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 7, p. 396 –403, 2006.

XIAO, D.Q.J.; XIE, W.; LIU, H.; LI, X.; XIONG, L.; WANG, S. Rice Gene Network Inferred from Expression Profiling of Plants Overexpressing OsWRKY13, a Positive Regulator of Disease Resistance. **Molecular Plant**, v.1, n.3, p. 538-551, 2008.

ZHAO, S.; DANST, C.H.; FEULNER, G.; VLAZNY,GRAY, J.A.;HILL, C.W. Rhs Elements of *Escherichia coli* K-12: Complex Composites of Shared and Unique Components That Have Different Evolutionary Histories. *Journal of Bacteriology*, v. 175, n. 10, p. 2799-2808, 1993.

ZINOV'EVA, S.V.; VASYUKOVA, N. I.; OZERETSKOVSKAYA, O.L. Biochemical aspects of plant interactions with phytoparasitic nematodes: a review. **Applied biochemistry and Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 111-119, 2004.