

DEDICATÓRIA

À minha família.....

AGRADECIMENTOS

A Deus, que está presente em todos os momentos, pela ajuda e proteção....

Ao professor Dr. Miguel Pedro Guerra, pela orientação, incentivo, apoio em todos os momentos e pelas grandes contribuições que sempre fizeram parte diretamente da minha formação.

Ao Dr. Manoel Teixeira Souza Júnior, pela orientação segura, apoio e pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Rubens Onofre Nodari e ao pesquisador Marco Antônio Dalbó, pelas valiosas sugestões e incentivo.

À EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia-, pela oportunidade de realização do trabalho.

À Fabiana, pela compreensão, amor e incentivo.

Ao amigo Carlos Skalee, pela grande amizade em todos os momentos.

Aos amigos Osmundo, Giovanni, Júlio, Roberto, Marly, Rivane e Juliana, por todo o apoio e amizade durante a minha estada em Brasília/DF.

Aos amigos do Curso de Recursos Genéticos Vegetais, André, Juliana e Vanildo, pela amizade e companheirismo.

À Bernadete, por todos os serviços prestados e apoio durante todo o curso.

INDÍCE

DEDICATÓRIA	I
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABELAS.....	VI
CAPÍTULO 1.....	1
<i>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</i>	<i>1</i>
<i>INTRODUÇÃO.....</i>	<i>1</i>
<i>ENGENHARIA GENÉTICA E A FRUTICULTURA BRASILEIRA</i>	<i>2</i>
<i>PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....</i>	<i>4</i>
<i>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</i>	<i>9</i>
<i>REFERÊNCIAS.....</i>	<i>10</i>
CAPÍTULO 2.....	16
<i>PRODUÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE FUMO (NICOTIANA TABACUM L.) EXPRESSANDO GENES QUE CÓDIFICAM PARA PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE AMPLO ESPECTRO..</i>	<i>16</i>
<i>RESUMO.....</i>	<i>16</i>
<i>INTRODUÇÃO.....</i>	<i>17</i>
<i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	<i>18</i>
<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</i>	<i>21</i>
<i>REFERÊNCIAS.....</i>	<i>23</i>
CAPÍTULO 3.....	29
<i>EXPRESSÃO TRANSIENTE DO GENE gus SOB REGULAÇÃO DE DIFERENTES PROMOTORES, EM DIFERENTES TECIDOS DE VIDEIRA (VITIS SP.), MAMOEIRO (CARICA PAPAYA L.) E BANANEIRA (MUSA SP.)</i>	<i>29</i>
<i>RESUMO.....</i>	<i>29</i>
<i>INTRODUÇÃO.....</i>	<i>30</i>
<i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	<i>34</i>
<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</i>	<i>36</i>
<i>REFERÊNCIAS.....</i>	<i>41</i>
<i>NOME DA CONSTRUÇÃO.....</i>	<i>45</i>
CAPÍTULO 4.....	48
<i>SENSIBILIDADE IN VITRO DE ISOLADOS DE FUSARIUM A PEPTÍDEOS DA FAMÍLIA DAS DERMASEPTINAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA</i>	<i>48</i>
<i>RESUMO</i>	<i>48</i>
<i>INTRODUÇÃO.....</i>	<i>49</i>
<i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	<i>51</i>
<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</i>	<i>53</i>
<i>REFERÊNCIAS.....</i>	<i>56</i>
CAPÍTULO 5.....	60
<i>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</i>	<i>60</i>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Cassete de expressão em eucariotos das construções gênicas utilizadas para a transformação genética de fumo (*Nicotiana tabacum* L.). A- pB.SAN167; B- pB.SAN168; C- pSAN163; D- pSAN164; e E- pSAN236. Localização referencial de iniciadores (1- sense e 2- antisense) utilizados para amplificação de fragmento de DNA contendo gene de interesse nas construções A, B, C e D.....**25**
- Figura 2.2.** Regeneração de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) a partir de folhas submetidas a transformação genética, mediada por biobalística, em meio de cultura suplementado com canamicina.....**26**
- Figura 2.3.** Amplificação de fragmento de DNA contendo gene *npt II*, por PCR. Linhas A e B são, respectivamente, água e planta não-transformada (controles negativos); C é 1 Kb DNA ladder; D é controle positivo (pSAN236), e linhas E a N amostras de plantas de fumo selecionadas em meio suplementado com canamicina.....**28**
- Figura 3.1.** Expressão transiente do gene *gus* em diferentes tecidos de fruteiras. A e B – Respectivamente, embriões somáticos e folha de mamoeiro (*Carica papaya* cv. Sunrise); C – Caules de videira (Porta-enxerto Paulsen 1103) e D – Suspensão celular de bananeira (*Musa* sp., Grupo AAB, cv. Maçã). Setas indicam resultados positivos em C e D.....**47**

Figura 4.1. Germinação de conídios e crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense em meio BD com peptídeo antimicrobiano, 24 horas após inoculação. A – Micélio; B – Poço de placa de ELISA mostrando ausência de germinação de conídios e crescimento de micélio; C – Poço de placa de ELISA mostrando germinação de conídios e crescimento de micélio em quantidade insuficiente para cobrir a área total do poço; e D – Poço de placa de ELISA mostrando germinação de conídios e crescimento de micélio em quantidade suficiente para cobrir área do poço.....**58**

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1.	Sumário de experimentos de transformação de fumo (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) por biobalística.....	27
Tabela 3.1.	Construções gênicas com o gene <i>gus</i> utilizadas no estudo de expressão transiente em diversos tecidos de bananeira (<i>Musa</i> sp.), mamoeiro (<i>Carica papaya</i> L.) e videira (<i>Vitis</i> sp.).....	45
Tabela 3.2.	Expressão transiente do gene <i>gus</i> em diferentes tecidos de bananeira (<i>Musa</i> sp.), mamoeiro (<i>Carica papaya</i>) e videira (<i>Vitis</i> sp.) com diferentes construções gênicas.....	46
Tabela 4.1.	Concentração mínima inibitória de peptídeos antimicrobianos da família das Dermaseptinas para isolados de <i>Fusarium</i> patogênicos de fruteiras.....	59

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os avanços na área da biotecnologia têm proporcionado novas ferramentas ao melhoramento genético, ferramentas estas que abrem a possibilidade de obtenção de combinações gênicas antes inimagináveis. Na área agrícola, a engenharia genética se destaca por oferecer a possibilidade de se alterar características de cultivares já conhecidas através da introdução de um ou vários genes naturais ou sintetizados artificialmente. Como consequência, diversos programas de pesquisa e desenvolvimento já se encontram em andamento em nível mundial, visando a produção de plantas transgênicas melhoradas, seja quanto à capacidade de resistir a patógenos, insetos e a estresses ambientais, ou quanto à qualidade nutricional, ou à possibilidade de produção de metabólitos de interesse. Muitos destes programas já disponibilizaram produtos, sendo que no ano 2000, aproximadamente 44 milhões de hectares foram cultivados com plantas transgênicas no mundo (James, 2000).

Plantas transgênicas de diversas espécies vegetais já foram produzidas, como consequência direta da disponibilização de sistemas de cultura de tecidos e transformação desenvolvidos nas três últimas décadas do século XX (Brasileiro & Carneiro, 1999). Ao lado dos avanços obtidos na cultura de tecidos e transformação genética, ocorreram também consideráveis progressos na obtenção de genes úteis para serem utilizados na transformação de plantas. A disponibilização de genes permite que características agrônômicas importantes,

como resistência a doenças de origem fúngica, possam ser introduzidas em plantas cultivadas. Diversos genes já foram testados para resistência a fungos em plantas transgênicas, dentre eles cabe destacar os genes que codificam para enzimas que atuam hidrolisando componentes da parede celular destes organismos, como quitinases e glucanases, ou que atuam na membrana citoplasmática, modificando sua permeabilidade, como a osmotina (Datla *et al.*, 1991). Além destes, genes que codificam peptídeos antimicrobianos de amplo espectro também têm sido identificados e testados contra diversos patógenos (Bechinger, 1997; Cammue *et al.* 1992; During *et al.* 1993; Hancock & Lehrer, 1998; Jaynes *et al.* 1993; Trudel *et al.* 1993).

A presente revisão objetiva analisar os avanços da biotecnologia na direção do desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a fungos, em especial, ao uso de genes que expressam peptídeos antimicrobianos de amplo espectro de ação para o controle de doenças fúngicas limitantes da fruticultura brasileira.

ENGENHARIA GENÉTICA E A FRUTICULTURA BRASILEIRA

A fruticultura Brasileira experimentou considerável crescimento no decorrer das últimas três décadas, devido, principalmente, ao aumento da área plantada em todo o país e pela proliferação de pólos de irrigação no Nordeste. A crescente demanda por quantidade e qualidade, nos mercados interno e externo, tem forçado este ramo da agroindústria nacional a adotar cada vez mais tecnologias que permitam suprir esta demanda. Dentre as diversas fruteiras produzidas no Brasil, cabe destacar o abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill.); a bananeira (*Musa* sp.), o mamoeiro (*Carica papaya* L.) e a videira (*Vitis vinifera* L.), que são

plantadas em quase todo o território nacional, e apresentam importância tanto econômica como social.

O cultivo de fruteiras tem severas limitações decorrentes das condições climáticas nas regiões produtoras. Essas limitações são devidas, principalmente, à ocorrência de doenças fúngicas, que são responsáveis por perdas substanciais em pomares e em pós-colheita. O uso de agroquímicos é a principal forma de controle empregada atualmente contra doenças fúngicas em pomares. Embora o cultivo possa ser viabilizado por esta forma de controle, disso resulta uma elevação considerável nos custos de produção e nos riscos para a saúde humana e para o ambiente.

Existem patógenos de fruteiras, como o *Fusarium* sp., *Mycosphaerella* sp. e *Colletotrichum* sp., para os quais o controle químico é feito a um custo que muitas vezes chega a comprometer a economicidade do cultivo, além de apresentar um nível de controle nem sempre satisfatório. Há, portanto, a necessidade de se melhorar geneticamente o material usado para a produção de frutas no Brasil, sob pena de se perder a competitividade ao longo do tempo. A resistência a pragas e doenças é um ponto chave. Embora haja abundância de fontes de resistência em algumas espécies de fruteiras, as tentativas de obtenção de cultivares resistentes e de alta qualidade via melhoramento genético convencional em geral tiveram sucesso muito limitado.

Nesse sentido, avanços na área da engenharia genética têm proporcionado novas oportunidades de obtenção de cultivares resistentes, sendo que uma série de limitações biológicas podem ser vencidas pelos melhoristas, como o longo tempo entre cada geração (3-5 anos), longo tempo para avaliação das plântulas, depressão endogâmica, herança poligênica para os caracteres mais importantes, alto custo de manutenção, entre outras. Características estas que fazem do melhoramento genético de diversas fruteiras um processo longo e oneroso.

A transformação genética de espécies frutíferas vem sendo obtida rotineiramente em vários laboratórios, mesmo em espécies consideradas anteriormente como recalcitrantes, como a videira (Kikkert *et al.* 1997; Krastanova *et al.* 1995; LeGall *et al.* 1994; Martinelli & Mandolino, 1994; Mauro *et al.* 1995; Perl *et al.* 1996; Scorza *et al.* 1995). A literatura nessa área também é vasta para a macieira (Bolar *et al.*, 1998; DeBondt *et al.* 1994; James *et al.* 1993; Sriskandarajah *et al.* 1994; Yao *et al.* 1995), e alguns casos foram reportados com ameixeira (Korte *et al.* 1994; Mante *et al.* 1991; Scorza *et al.* 1995). Métodos biotecnológicos para a obtenção de mamoeiros transgênicos resistentes a vírus também já foram desenvolvidos, e mamoeiros transgênicos resistentes ao vírus da mancha anelar, expressando o gene da capa proteica deste vírus, já foram obtidos (Fitch *et al.*, 1992; Tennant, 1996; Cai *et al.*, 1999; Souza Jr., 1999), sendo que duas variedades já se encontram no mercado (Gonsalves, 1998). A transformação genética de variedades de bananeira (*Musa sp.*) têm permitido o melhoramento de variedades estéreis amplamente cultivadas no mundo. Plantas transgênicas de bananeira já foram obtidas através da técnica de bombardeamento de micropartículas em células embriogênicas em suspensão (Sagi *et al.*, 1995; Morais *et al.*, 1999) e através da infecção por *Agrobacterium* (May *et al.*, 1995).

PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Diversos organismos utilizam peptídeos com atividade antimicrobiana como um componente de suas estratégias de defesa. Peptídeos hidrofóbicos e anfipáticos, produzidos por organismos como fungos, insetos, anfíbios e humanos, apresentam atividade antimicrobiana através da sua interação com membranas de células vivas (Bechinger, 1997). Os peptídeos antimicrobianos isolados de plantas e animais são estruturas geralmente

catiônicas, compostas de 12 a 45 aminoácidos, sendo expressos constitutivamente ou somente após uma infecção ou injúria (Hancock & Lehrer., 1998). Estes peptídeos podem também ser sintetizados *in vitro* por métodos bioquímicos, em quantidades suficientes para permitir o seu estudo por técnicas biofísicas (Bechinger, 1997).

A multiplicidade de patógenos potenciais exige uma evolução muito rápida dos mecanismos de defesa em plantas e animais, incluindo a expressão de peptídeos antimicrobianos. Embora sendo claramente um mecanismo ancestral utilizado contra microorganismos, a produção de peptídeos antimicrobianos por animais só foi reconhecida recentemente (Hancock & Lehrer, 1998).

Peptídeos com atividade antimicrobiana estão presentes na maioria das plantas, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas. As tioninas (45 a 47 aminoácidos) e as defensinas (45 a 54 aminoácidos) são exemplos de peptídeos de plantas (Broekaert *et al.*, 1997).

Insetos também têm sido utilizados como fontes para o isolamento de diversos peptídeos antimicrobianos. As cecropinas de traças e moscas foram os primeiros peptídeos a serem descobertos (Maloy & Kari, 1995). Todos estes peptídeos são básicos, devido à presença de resíduos de Arginina e Lisina, e , por isso, interagem fortemente com bicamadas lipídicas carregadas negativamente (Maloy & Kari, 1995). Estes autores também descrevem um segundo tipo de peptídeos com atividade antimicrobiana encontrados em insetos, que são as defensinas, as quais formam canais em membranas e são ativas contra bactérias gram-positivas. Casteels *et al.* (1989) propuseram a idéia da utilização de genes que codificam para proteínas com atividade antimicrobiana, encontradas em insetos, para aumentar a resistência a doenças bacterianas em plantas.

Segundo Batista *et al.* (1999), peptídeos produzidos na pele de anfíbios têm sido objeto de intenso interesse de muitos grupos de pesquisa e companhias farmacêuticas nas últimas décadas. Isso é devido à extraordinária variedade de atividades biológicas e aplicações biotecnológicas potenciais destes peptídeos (Matsuzaki *et al.*, 1995). Tem se tornado evidente, através do estudo de centenas de espécies de anfíbios, que diferentes espécies armazenam diferentes classes de moléculas farmacologicamente ativas na pele (Bevins & Zasloff, 1990). Diferentes famílias de peptídeos têm sido descritas de acordo com suas atividades, características estruturais e organização genômica. Estes peptídeos oferecem possibilidades promissoras para vencer o declínio da eficácia de antibióticos convencionais, devido ao desenvolvimento de organismos resistentes (Batista *et al.*, 1999). Hancock & Lehrer (1998) afirmam que muitos destes peptídeos mostram eficiente atividade *in vitro* contra microorganismos resistentes a antibióticos convencionais, podendo ser usados como modelo para o desenvolvimento de agentes anti-infecciosos em humanos.

Estudos em mais de 500 espécies distintas de sapos revelaram uma alta quantidade e diversidade de peptídeos na pele destes animais. A abundância de peptídeos antimicrobianos varia entre espécies, destacando-se os gêneros *Phyllomedusa* e *Xenopus* como ricas fontes dessas substâncias. Estes estudos também têm permitido catalogar uma diversidade muito grande de peptídeos (Bevins & Zasloff, 1990).

As potentes propriedades antimicrobianas de vários peptídeos e sua localização estratégica em interfaces entre o organismo e o ambiente, fornecem fortes evidências da sua participação na resistência às infecções. Esta inferência é fortemente apoiada pela rápida indução de certos peptídeos antimicrobianos depois de infecções ou ferimentos em plantas e animais (Hancock & Lehrer, 1998).

As magaininas são descritas como polipeptídeos de 21 a 26 aminoácidos, pertencentes à família dos peptídeos imunogênicos que são expressos na pele e intestinos do sapo africano *Xenopus laevis*. Pertencem a uma classe de pequenos peptídeos antimicrobianos que fazem parte do sistema imunológico no reino animal (Boman *et al.*, 1989). Estes autores ressaltam que a grande maioria dos peptídeos antimicrobianos atuam na ruptura de célula da membrana citoplasmática, através da interação com proteínas alvo específicas. Estes polipeptídeos protegem estes animais contra infecções e exibem um amplo espectro de atividade anti-bacteriana, antifúngica e tumoricida (Zasloff, 1987; Cruciani *et al.*, 1991).

As magaininas adotam uma estrutura secundária de α -hélice quando em contato com membranas, como determinado por Bechinger *et al.* (1997). Estes autores relatam que a hélice é hidrofóbica de um lado, sendo este lado oposto a uma parte hidrofílica. Então, as magaininas são capazes de dissipar o potencial de membrana de membranas biológicas (Westerhoff *et al.*, 1989) e induzir a formação de canais de íons através da bicamada lipídica (Cruciani *et al.*, 1991), sendo detectadas numa orientação perpendicular à bicamada em altas concentrações (Ludtke *et al.*, 1996).

Considerando que as magaininas são peptídeos lineares simples, diversos grupos de pesquisa têm conduzido estudos da estrutura e atividade destes peptídeos, visando aumentar a sua potência (Maloy & Kari, 1995). Zasloff *et al.* (1988) sintetizaram sequências modificadas do gene *Magainin2* e observaram redução da atividade antimicrobiana. A remoção de certos aminoácidos resultou até na perda total de atividade. A maioria dos estudos com peptídeos sintéticos análogos às magaininas buscam aumentar a interação destes peptídeos com membranas fosfolipídicas negativamente carregadas. Substituições e deleções foram realizadas nas magaininas, buscando-se a estabilização da estrutura de α -hélice e aumento do

caráter positivo das moléculas. Componentes obtidos através dessas mudanças, como os peptídeos MSI78 e MSI99 (Maloy & Kari, 1995), têm tido excelente atividade contra patógenos resistentes a diversos antibióticos.

Alguns modelos procuram explicar o modo de ação das magaininas, sendo que o mais recente destes, proposto por Matsuzaki *et al.* (1995) sugere que o peptídeo se liga primeiramente à parte externa da membrana plasmática. A face hidrofóbica da α -hélice penetra então na dupla camada lipídica, formando poros ou canais transientes. Com isso, os peptídeos translocam-se através da membrana, sendo que a redução da concentração destes no lado exterior da membrana provoca a desativação dos poros. Esse modelo pode explicar os resultados de vários estudos demonstrando que a condutividade de íons na membrana aumenta na presença de magaininas (Bechinger, 1997). Muitos autores descrevem este aumento de condutividade durante experimentos eletrofísicos, os quais sugerem que as magaininas formam poros bem definidos, sendo que estes eventos apresentam vida muito curta (Cruciani *et al.*, 1991). A formação de canais na membrana celular é um processo transiente, observado principalmente nos primeiros estágios da interação entre os peptídeos e a membrana (Matsuzaki *et al.*, 1995).

Peptídeos da família *Phyllomedusinae* também merecem particular atenção devido à sua potente atividade antimicrobiana (Coote *et al.*, 1998). Muitos destes peptídeos são descritos como dermaseptinas (DMS), sendo produzidos por células de glândulas de rãs do gênero *Phyllomedusa* (Bevins & Zasloff, 1990). As DMS exercem atividade contra bactérias, protozoários e fungos, em concentrações micromolares, exibindo não só a habilidade de identificar rapidamente células-alvo como também atividade contra alguns dos mais sérios patógenos resistentes a antibióticos (Batista *et al.*, 1999).

O obtenção de plantas transgênicas expressando genes que codificam peptídeos com atividade antimicrobiana de amplo espectro é uma linha de pesquisa e desenvolvimento com o uso potencial no controle de doenças de plantas causadas principalmente por fungos e bactérias. Nesse sentido, Jaynes *et al.* (1993) observaram que plantas transgênicas de fumo expressando α -tionina, uma cecropina modificada, foram muito mais resistentes a infecções causadas por patógenos bacterianos. Magaininas e seus derivados análogos também já foram testados em plantas transgênicas, demonstrando um aumento da resistência de plantas ornamentais a diversos patógenos (Smith *et al.*, 1998). Entretanto, plantas transgênicas de fumo expressando peptídeos antimicrobianos, revelaram resultados pouco satisfatórios no sentido de promover o aumento de resistência destas plantas a diferentes patógenos (Florack *et al.*, 1994).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A engenharia genética é uma importante ferramenta para o melhoramento genético, com grande potencial de uso em espécies vegetais de importância econômica para o Brasil, como as fruteiras. Variedades melhoradas por engenharia genética têm sido obtidas por diversos grupos de pesquisa em todo o mundo, inclusive no Brasil. A aplicação do conhecimento já acumulado nessa área da biotecnologia pode representar um importante apoio aos programas de melhoramento de fruteiras existentes no Brasil.

O desenvolvimento de fruteiras transgênicas expressando peptídeos com atividade antimicrobiana de amplo espectro, e resistentes aos principais fungos fitopatogênicos que limitam a produção destas, é uma linha de pesquisa e desenvolvimento com potencial para possibilitar um salto qualitativo do agro-negócio da fruticultura no Brasil, visando ampliar

tanto o mercado interno quanto externo. Porém, existe uma série de questões que precisam ser consideradas para não só possibilitar a confirmação do potencial técnico desta tecnologia, mas também para garantir que ela possa resultar em produtos capazes de serem absorvidos pelo mercado. Dentre estas questões, sobressaem-se aquelas relativas à propriedade intelectual e à segurança biológica: Que genes expressando peptídeos utilizar? Que promotores utilizar para regular estes genes? Qual a situação destes quanto à propriedade intelectual? Os peptídeos causam algum efeito tóxico ou alérgico nos potenciais consumidores? Estas são algumas das questões específicas que precisam ser respondidas antes e durante o processo de desenvolvimento destas fruteiras transgênicas.

REFERÊNCIAS

- BATISTA, C. V. F.; SILVA, R.; SEBEN, A.; SCALONI, A.; FERRARA, L.; PAIVA, G. R.; OLANMEDI-PORTUGAL, T.; POSSANI, L. D. & BLOCH JR., C. Antimicrobial peptides from the brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. *Peptides*, 20:679-686, 1999.
- BECHINGER, B. Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *J. Membrane Biol.*, 156:197-211, 1997.
- BEVINS, C. L. & ZASLOFF, M. Peptides from frog skin. *Ann. Rev. Biochem.*, 59:395-414, 1990.
- BOLAR, J.P.; BROWN, S.K.; NORELLI, J.L.; ALDWINCKLE, H.S. Factors affecting the transformation of 'Marshall McIntosh' apple by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* (in press), 1998.
- BOMAN, H.G.; BOMAN, I.A.; ANDREU, D.; LI, Z.Q.; MERRIFIELD, R.B.; SCHLENSTEDT, G.; ZIMMERMANN, R. Chemical synthesis and enzymic processing of precursor forms of cecropins A and B. *Am. Soc. Biochem. Mol. Bio.*, 264(10): 5852-5860, 1989.

- BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. C. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. (1ª Ed.) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília/DF, 1999. v.2, p.679-735.
- BROEKAERT, W.F.; CAMMUE, B. P. A.; BOLLE, M. F. C.; THEVISSSEN, K.; SAMBLANX, G. W. & OSBORN, R. W. Antimicrobial peptides from plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 16(3):297-323, 1997.
- CAI, W., GONSALVES, C., TENNANT, P., FERMIN, G., SOUZA JR., M. T., SARINDU, N., JAN, F. J., ZHU, H. Y. & GONSALVES, D. A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. *In Vitro Cellular & Development Biology – Plant*, 35(1): 61-69, 1999.
- CAMMUE, B.P.A.; DE BOLLE, M.F.C.; TERRAS. F.R.G.; PROOST, P.; VAN DAMME, J.; REES, S.B.; VANDERLEYDEN, J.; BROEKAERT, W.F. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Bio. Chem.*, 267(4): 2228-2233, 1992.
- CASTEELS, P.; AMPE, C.; RIVIERE, L.; DAMME, J. V.; ELICONE, C.; FLEMING, M.; JACOBS, F. & TEMPST, P. *Eur. J. Biochem.*, 187:381-386, 1989.
- COOTE, P.; HOLYOAK, C.; BRACEY, D.; FERDINANDO, D. & PEARCE, J. Inhibitory action of a truncated derivative of the amphibian skin peptide dermaseptin S3 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 42:2160-2170, 1998.
- CRUCIANI, R. A.; BARKER, J. L.; ZASLOFF, M.; CHEN, H. C. & COLAMONICI, O. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 88:3792-3796, 1991.
- DATLA, R. S.; HAMMERLINDL, J. K.; PELCHER, L. E.; CROSBY, W. L. & SELVARAJ, G. A bifunctional fusion between beta-glucuronidase and neomycin phosphotransferase: a broad spectrum marker enzyme for plants. *Gene*, 101:239-246, 1991.
- DE BONDT, A.; EGGERMONT, K. DRUART, P.; VIL, M.D.; GODERIS, I.; VANDERLEYDEN, J.; BROEKAERT, W.F. *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus X domestica* Borkh): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. *Plant Cell Rep.*, 13: 587-593, 1994.
- DÜRING, K.; PORSCHE, P.; FLADUNG, M.; LÖRS, H. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *Plant J.*, 3: 587-598, 1993.

- FITCH, M.; MANSHARDT, R.; GONSALVES, D.; SLIGHTOM, J. & SANFORD, J. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Bio/Technology*, 10:1466-1472, 1992.
- FLORACK, D. E. A.; DIRKSE, W. G.; VISSER, B.; HEIDEKAMP, F. & STIEKEMA, W. J. Expression of biologically active hordothionins in tobacco. Effects on pre and pro-sequences and the amino- and the carboxyl-termini of the hordothionin precursor on mature protein expression and sorting. *Plant Mol. Biol.*, 24:83-96, 1994.
- GONSALVES, D. Control of papaya ringspot virus in papaya: A case study. *Annual Review Phytopathology*, 36: 415-437, 1998.
- HANCOCK, R. E. W. & LEHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 16:82-88, 1998.
- JAMES, C. Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2000. ISAAA Briefs No. 21: Preview. ISAAA: Ithaca, NY. 2000. <http://www.isaaa.org/briefs/Brief21.htm>
- JAMES, D.J.; PASSEY, A.J.; WEBSTER, A.D.; BARBARA, D.J.; VISS, P.; DANDEKAR, A.M.; URATSU, S. Transgenic apples and strawberries: Advances in transformation, introduction of genes for insect resistance and field studies of tissue cultured plants. *Acta Hort.*, 336: 179-184, 1993.
- JAYNES, J. M.; NAGPALA, P.; DESTEFANO-BELTRAN, L.; HUANG, J. H.; KIM, J.H.; DENNY, T. E. CETINER, S. Expression of a Cecropin B lytic peptid analog in transgenic tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Science*. 89:43-53, 1993.
- KIKKERT, J.; ALI, G. S.; STRIEM, M. J.; MARTENS, M.; WALLACE, P.G.; MOLINO, L. & REISCH, B. I. Genetic engineering of grapevine (*Vitis* sp.) for enhancement of disease resistance. *Acta Hort.* 447, 1997.
- KORTE, A.M.; MAISS, E.; CASPER, R. Agrobacterium-mediated gene transfer as a tool for the induction of resistance against plum pox virus (PPV) in plum (*Prunus domestica* L.). *Acta Hort.*, p. 164-168, 1994.
- KRASTANOVA, S.; PERRIN, M.; BARBIER, P., DEMANGEAT, G.; CORNUET, P.; BARDONNET, N.; OTTEN, L.; PINCK, L., WALTER, B. Transformation of grapevine rootstocks with the coat protein gene of grapevine fanleaf nepovirus. *Plant Cell Rep.*, 14: 550-554, 1995.

- LEGALL, O.; TORREGROSA, L.; DANGLLOT, Y., CANDRESSE, T.; BOUQUET, A. Agrobacterium-mediated genetic transformation of grapevine somatic embryos and regeneration of transgenic plants expressing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMV). *Plant Science*, 102: 161-170, 1994.
- LUDTKE, S. J.; HE, K.; HELLER, W. T.; HARROUN, A.; YANG, L. & HUANG, H. W. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry*, 35:13723-13728, 1996.
- MALOY, W.L. & KARI, U.P. Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers*, 37:105-122, 1995.
- MANTE, S.; MORGENS, P.H.; SCORZA, R.; CORDTS, J.M.; CALLAHAN, A.M. Agrobacterium-mediated transformation of plum (*Prunus domestica* L.) hypocotyl slices and regeration of transgenic plants. *Bio/technology*, 9(9): 853-857, 1991.
- MARTINELLI, L. & MANDOLINO, G. Genetic transformation and regeneration of transgenic plant in grapevine (*Vitis rupestris* S.). *Theor. Appl. Genet.*, 88:621-628, 1994.
- MATSUZAKI, K.; MURASE, O.; FUJII, N. & MIYAJIMA, K. Translocation of a channel-forming antimicrobial, magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore. *Biochemistry*, 34:6521-6526, 1995.
- MAURO, M.C.; TOUTAIN, S.; WALTER, B.; PINCK, L.; OTTEN, L.; COUTOS-THEVENOT, P.; DELOIRE, A.; BARBIER, P. High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene. *Plant Science*, 112: 97-106, 1995.
- MAY, G. D.; AFZA, R.; MASON, H. S.; WIECKO, A.; NOVAK, F. J. & ARNTZEN, C. J. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Bio/Technology*, 13:486-492, 1995.
- MORAIS, L. S.; MATSUMOTO, K.; ARAGÃO, F. J. L. & RECH, E. L. Transformação em células em suspensão de bananeira, utilizando como agente seletivo o herbicida imazapyr, via biolística. 45º Congresso Brasileiro de Genética. Gramado – RS. Anais do Congresso Brasileiro de Genética. Gramado, RS:SBG, 1999. Setor 17-086.
- PERL, A.; LOTAN, O.; ABU-ABIED, M.; HOLLAND, D. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): the role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. *Nature Biotechnology*, 14: 624-628, 1996.

- SAGI, L.; PANIS, B.; REMY, S.; SCHOOFS, H.; DE SMET, K.; SWENNEN, R. & CAMMUE, B. P. A. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* sp.) via particle bombardment. *Bio/Technology*, 13:481-485, 1995.
- SCORZA, R.; CORDTS, J.M.; RAMMING, D.W.; EMERSHAD, R.L. Transformation of grape (*Vitis vinifera* L.) zygotic-derived somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.*, 14: 589-592, 1995.
- SMITH, F.; BLOWERS, A. D.; ECK, J. V. & SANFORD, J. Expression of magainin and PGL classes of antimicrobial peptide genes in plants, and their use in creating resistance to multiple plant pathogens. Sanford Scientific, Inc. 877 Marshall Road, Waterloo, NY, 13165. USA, 1998.
- SOUZA JR., M. T. Analysis of the resistance in genetically engineered papaya against papaya ringspot potyvirus, partial characterization of the PRSV.Brazil.Bahia isolate, and development of transgenic papaya for Brazil. Ithaca, Cornell University, 1999. 277p. Tese de Doutorado.
- SRISKANDARAJAH, S.; GOODWIN, P.B.; SPEIRS, J. Genetic transformation of the apple scion cultivar 'Delicious' via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 36: 317-329, 1994.
- TENNANT, P. F. Evaluation of the resistance of coat protein transgenic papaya against papaya ringspot virus isolates and development of transgenic papaya for Jamaica. Ithaca, Cornell University, 1996. 317p. Tese de Doutorado.
- TRUDEL, J.; POTVIN, C.; ASSELIN, A. Expression of active hen egg white lysozyme in transgenic tobacco. *Plant Sci.*, 87: 55-67. 1993.
- WESTERHOFF, H. V.; JURETIC, D.; HENDLER, R. W. & ZASLOFF, M. Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86:6597-6601, 1989.
- YAO, J.L.; COHEN, D.; ATKINSON, R.; RICHARDSON. K.; MORRIS, B. Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar 'Royal Gala'. *Plant Cell Rep.*, 14: 407-412, 1995.
- ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84:5449-5453, 1987.

ZASLOFF, M.; MARTIN, B. & CHEN, H. C. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. Proc. Natl. Acad. Sci., 85:910-913, 1988.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE FUMO (Nicotiana tabacum L.) EXPRESSANDO GENES QUE CODIFICAM PARA PEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE AMPLO ESPECTRO

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos de anfíbios têm sido objeto de amplo estudo devido às suas diversas atividades biológicas e aplicações biotecnológicas potenciais. As magaininas são polipeptídeos de 21 a 26 aminoácidos, pertencentes à família dos peptídeos imunogênicos, que são expressos na pele e intestinos de sapos, apresentando atividade antimicrobiana e fornecendo resposta imediata às infecções nesses animais. Peptídeos como as magaininas têm potencial de uso no controle de doenças de plantas causadas por fungos ou bactérias. O presente estudo objetivou a produção de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) expressando genes que codificam para magaininas, as quais serão posteriormente utilizadas em estudos visando o controle de doenças de plantas. Para tanto, folhas de fumo foram submetidas a transformação genética mediada por biobalística, utilizando os genes *Magainin2* e *MSI99*, e o gene marcador de seleção *nptII*. Plantas de fumo, obtidas em meio de cultura suplementado com canamicina, foram submetidas à análise molecular por PCR. Essa análise revelou uma alta eficiência de co-transformação, haja visto que 75% das plantas selecionadas foram PCR positivas para o gene *nptII* e para o gene de interesse.

TERMOS ADICIONAIS PARA INDEXAÇÃO: Resistência, magaininas, engenharia genética, co-transformação, biobalística.

INTRODUÇÃO

Organismos como fungos, insetos, anfíbios e humanos, produzem peptídeos hidrofóbicos e anfipáticos, que apresentam atividade antimicrobiana, através da sua interação com a membrana de células vivas (Bechinger, 1997). Os peptídeos antimicrobianos de plantas e animais são estruturas geralmente catiônicas, compostas de 12 a 45 aminoácidos, sendo expressos constitutivamente ou somente após uma infecção ou injúria (Hancock *et al.*, 1998).

Durante as últimas décadas, peptídeos antimicrobianos de anfíbios têm sido intensamente estudados devido à sua extraordinária variedade de atividades biológicas e aplicações biotecnológicas potenciais. Segundo Bevins & Zasloff (1990), mais de 500 espécies distintas de sapos já foram estudadas, revelando alta quantidade e diversidade de peptídeos na pele destes animais. A abundância de peptídeos antimicrobianos varia entre espécies, destacando-se os gêneros *Phyllomedusa* e *Xenopus* como ricas fontes dessa substâncias.

Bechinger (1997), descreve as magaininas como polipeptídeos de 21 a 26 aminoácidos, pertencentes à família dos peptídeos imunogênicos que são expressos na pele e intestinos de sapos, apresentando atividade antimicrobiana e fornecendo resposta imediata às infecções nesses animais. Além disso, são solúveis em água, onde assumem uma conformação em α -hélice e demonstram uma forte afinidade para membranas fosfolipídicas.

O principal sítio de ação das magaininas é a membrana citoplasmática de fungos e bactérias (Zasloff, 1987). Alguns modelos procuram explicar o modo de ação das magaininas, sendo que o mais recente destes, proposto por Matsuzaki *et al.* (1995) sugere que estes peptídeos se ligam primeiramente à parte externa da membrana plasmática. A face hidrofóbica da α -hélice das magaininas penetra então na dupla camada lipídica, formando

poros ou canais. Esse modelo pode explicar os resultados de vários estudos demonstrando que a condutividade de íons na membrana aumenta na presença de magaininas (Bechinger, 1997).

Genes expressando peptídeos com atividade antimicrobiana de amplo espectro podem ser usados para gerar espécies frutíferas como a videira, mamoeiro, bananeira e abacaxizeiro, resistentes às principais doenças fúngicas a que são submetidas. Este presente trabalho objetivou a produção de plantas transgênicas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) expressando genes que codificam para estes peptídeos. Esta espécie foi utilizada como modelo para introdução e análise de expressão de genes que codificam para magaininas, devido à sua rápida regeneração *in vitro* e a existência de detalhados protocolos de transformação genética, seja por *Agrobacterium* ou por Biobalística. Estas plantas serão posteriormente utilizadas para estudos de expressão *in vivo* destes peptídeos e avaliação da ação dos mesmos contra fungos que atacam fumo e que são relacionados, em nível de gênero com fungos que atacam fruteiras, como os classificados como *Fusarium*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Sementes de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) das variedades 'Sansum' e 'Xantii' foram inoculadas sobre papel filtro em magentas contendo 50 ml de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) sólido, acrescido de sacarose (40 g/l), mio-inositol (100 mg/l) e phytigel (2 g/l), sendo o pH ajustado para 5,6 com KOH. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/ 8 horas de luz e temperatura de 25±2 °C.

Duas semanas após a inoculação, folhas provenientes das plantas de fumo germinadas foram utilizadas para o primeiro experimento de bombardeamento, como será descrito adiante. Subsequentemente, essas plantas foram sendo repicadas e mantidas *in vitro*, sob as mesmas condições de cultivo, para serem utilizadas nos experimentos posteriores.

Construções Gênicas

Foram utilizados cinco plasmídeos nos experimentos de transformação de fumo, sendo eles: pSAN163, pSAN164, pB.SAN167, pB.SAN168 e pSAN236 (Figura 2.1). O plasmídeo pSAN163 apresenta um cassete de expressão em eucariotos, composto pelo promotor do gene *UBQ3* (Callis *et al.*, 1995), o gene *Magainin2* (Zasloff, 1987) e o terminador *nos* (Bevan *et al.*, 1983), o qual está inserido no sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). O pSAN164 tem a mesma constituição do pSAN163, só que o gene *MSI99* (Maloy *et al.*, 1995) se encontra no lugar do *Magainin2*. O gene *MSI99* é sintético e análogo ao *Magainin2*. O pB.SAN167 apresenta um cassete de expressão em eucariotos, composto pelo promotor do gene *UBQ3*, um peptídeo sinal de secreção, o gene *Magainin2* e o terminador *nos*, o qual está inserido no sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo pBluescript II SK (Stratagene, La Jolla, CA). O pB.SAN168 tem a mesma constituição do pB.SAN167, só que o gene *MSI99* se encontra no lugar do *Magainin2*. O pSAN236 apresenta um cassete de expressão composto pelo promotor do gene *UBQ10* (Callis *et al.*, 1995), o gene marcador de seleção *npt II* (Beck *et al.*, 1982) e o terminador *nos*.

O DNA plasmidial utilizado nos experimentos de transformação foram obtidos de culturas bacterianas de *Escherichia coli* (DH5 α) mediante o emprego de um protocolo modificado de purificação de DNA em pequena escala (Modified mini alkaline-lysis/PEG

precipitation procedure, Appendix A, Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA.).

Transformação e Seleção de Transformantes

Folhas de plantas de fumo germinadas *in vitro* foram extraídas no mesmo dia do bombardeamento, e imediatamente inoculadas, em grupo de quatro, no centro da placa de petri contendo meio de seleção [MS sólido, suplementado com sacarose (40g/l), mio-inositol (100 mg/ l), vitaminas MS (2,5 ml/ l), canamicina (100 mg/ l) e phytigel (1,5 g/ l), sendo o pH ajustado para 5,6 com KOH].

O método utilizado para a transformação foi o de Biobalística (Sanford *et al.*, 1990). As micropartículas (M10) de tungstênio, com DNA adsorvido, foram preparadas segundo o protocolo desenvolvido por Aragão *et al.* (1996), com algumas adaptações. Cada placa foi bombardeada duas vezes, sendo que em cada bombardeamento utilizou-se de uma mistura de pSAN236 com um dos demais plasmídeos, na proporção de 1:2 (Tabela 2.1). Cada tiro usou 1,5 µg de DNA com o gene de interesse e 0,75 µg de DNA com o gene marcador de seleção, co-precipitados em 600 µg de micropartículas. O bombardeamento foi realizado em aparelho de biobalística com pressão de Hélio de 1200 psi. Foram realizados oito experimentos de transformação (Tabela 2.1).

Após o bombardeamento, os explantes foram mantidos em meio de seleção em sala de crescimento (25^o+/-2^o C e fotoperíodo de 16 horas de luz). As folhas bombardeadas foram mantidas em meio de seleção por três meses, sendo repicadas a cada duas semanas. As plantas regeneradas foram extraídas e individualizadas, sendo também mantidas em meio de seleção.

Caracterização Molecular das Plantas Seleccionadas

A caracterização das plantas seleccionadas foi feita mediante emprego da reação de PCR – “Polymerase Chain Reaction” (Mullis & Faloona, 1987) para avaliar a presença do gene de interesse (*Magainin2* e *MSI99*) e do gene marcador de seleção (*nptII*). Para tanto, o DNA total das plantas foi extraído utilizando protocolo descrito em Souza Jr. (1999).

Os iniciadores específicos 5'-acatcgaattcctgc-3' e 5'-tagaactagtggatc-3' foram utilizados como sense e antisense, respectivamente, para a amplificação de fragmento de DNA contendo os genes *Magainin2* ou *MSI-99*. Enquanto que a amplificação do gene *nptII* foi feita com o emprego dos iniciadores específicos 5'-gaggctattcggctatgactg-3' e 5'-tcgacaagaccggttccatc-3' como sense e antisense, respectivamente. Um único programa foi utilizado para a amplificação, independente do par de iniciadores utilizados, sendo ele: um ciclo de 95°C/ 5 minutos, 35 ciclos de 95°C/ 1 minuto + 55°C/ 1 minuto + 73°C/ 1 minuto, e 1 ciclo de 73°C/ 7 minutos. Foi utilizado um termociclador modelo PTC 100 (MJ Research). Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, tamponado com 0,5X TAE (Sambrook *et al.*, 1989) e colorido com brometo de etídio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cultura de tecidos e transformação de plantas

Na Tabela 2.1, podemos observar o número de plantas seleccionadas nos diferentes experimentos, 90 dias após o bombardeamento, utilizando-se uma combinação de diferentes construções gênicas contendo os genes de interesse (*Magainin2* e *MSI99*) e o gene marcador

de seleção (*nptII*). Um total de 40 plantas de fumo foram regeneradas a partir do meio seletivo, sendo que nenhuma destas foi originada das placas controle; isto é, não-bombardeadas (Figura 2.2).

Das oitenta placas, contendo cada uma quatro folhas, que foram submetidas a bombardeamento, foram selecionadas 40 plantas potencialmente transgênicas, o que representa uma eficiência de regeneração de 12,5% em relação ao número total de explantes bombardeados. Isso significa que, num período de três meses, foi possível obter uma planta potencialmente transformada para cada oito folhas de fumo bombardeadas.

Observou-se uma desuniformidade entre os experimentos, no que diz respeito ao número de plantas selecionadas. Os experimentos 1 e 2 mostraram os melhores resultados, com onze plantas selecionadas por experimento; uma eficiência de regeneração de 27,5% em relação ao número de explantes bombardeados. Por outro lado, nenhuma planta foi selecionada nos experimentos 04 e 05. Foi obtida uma média de cinco plantas selecionadas por experimento.

Análise molecular das plantas potencialmente transgênicas selecionadas

A análise molecular das plantas selecionadas, mediante emprego de PCR, revelou que a metodologia utilizada permitiu alcançar o objetivo do trabalho; isto é, a obtenção de plantas transgênicas de fumo contendo o gene de interesse.

Os resultados da análise por PCR para a presença do gene *nptII* revelaram que 38 das 40 plantas de fumo selecionadas apresentavam este gene. Isso significa que 95% das plantas eram transgênicas, e 5% eram escapes. Como o esperado, para amplificação a partir do gene *nptII*, utilizando os iniciadores descritos em material e métodos, um fragmento de DNA com

498 pares de bases (pb) foi obtido. Este fragmento também foi amplificado do controle positivo (pSAN236), mas não no controle negativo (planta de fumo não-transformada) (Figura 2.3).

Para os genes *Magainin2* e *MSI99*, como esperado, um fragmento de 500 pb foi obtido, por PCR, do controle positivo (pB.SAN167, pB.SAN168 ou pSAN163), mas não no controle negativo. Das 40 plantas selecionadas, 25% destas apresentaram-se como negativas quanto à presença de gene de interesse. Uma das duas plantas PCR negativas para o gene *nptII* apresentou-se positiva para o gene de interesse. Para a análise da eficiência do processo de transformação utilizado, podemos observar que, de um total de 80 placas bombardeadas, totalizando 320 folhas, foram selecionadas 39 plantas transgênicas, representando 12,2% do total de explantes bombardeados.

Porém, quanto à eficiência da co-transformação, observou-se que 75% das plantas selecionadas apresentavam ambos genes, o de interesse e o marcador de seleção. Estudos de análise de progênes necessitam ser conduzidos para determinar se as plantas com os dois genes apresentam estes nos mesmos grupos de ligação ou não.

REFERÊNCIAS

- BECHINGER, B. Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *J. Membrane Biol.*, 156:197-211, 1997.
- BECK, E.; LUDWIG, G.; AUERSWALD, E. A.; REISS, B. & SCHALLER, H. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene*, 19: 327-336, 1982.
- BEVAN, M.; BRANES, W. M. & CHILTON, M-D. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucl. Acids Res.*, 11:369-385, 1983.

- BEVINS, C. L. & ZASLOFF, M. Peptides from frog skin. *Ann. Rev. Biochem.*, 59:395-414, 1990.
- CALLIS, J.; CARPENTER, T.; SUN, C. & VIERSTRA, R. D. Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype columbia. *Genetics*, 139:921-939, 1995.
- HANCOCK, R. E. W. & LEHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 16:82-88, 1998.
- MALOY, W.L. & KARI, U.P. Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers*, 37:105-122, 1995.
- MATSUZAKI, K.; MURASE, O.; FUJII, N. & MIYAJIMA, K. Translocation of a channel-forming antimicrobial, magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore. *Biochemistry*, 34:6521-6526, 1995.
- MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. A polymerase chain reaction. In: WU, R., ed. *Recombinante DNA - Part F*. San Diego: Academic Press, p.335-350, 1987.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473-497, 1962.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T.. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANFORD, J. C. Biolistic plant transformation. *Physiol. Plant.*, 79:206-209, 1990.
- SOUZA JR., M. T. Analysis of the resistance in genetically engineered papaya against papaya ringspot potyvirus, partial characterization of the PRSV.Brazil.Bahia isolate, and development of transgenic papaya for Brazil (Ph.D. Dissertation). Ithaca. Cornell University, 1999.
- YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J. & MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33:103-119, 1985.
- ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84:5449-5453, 1987.

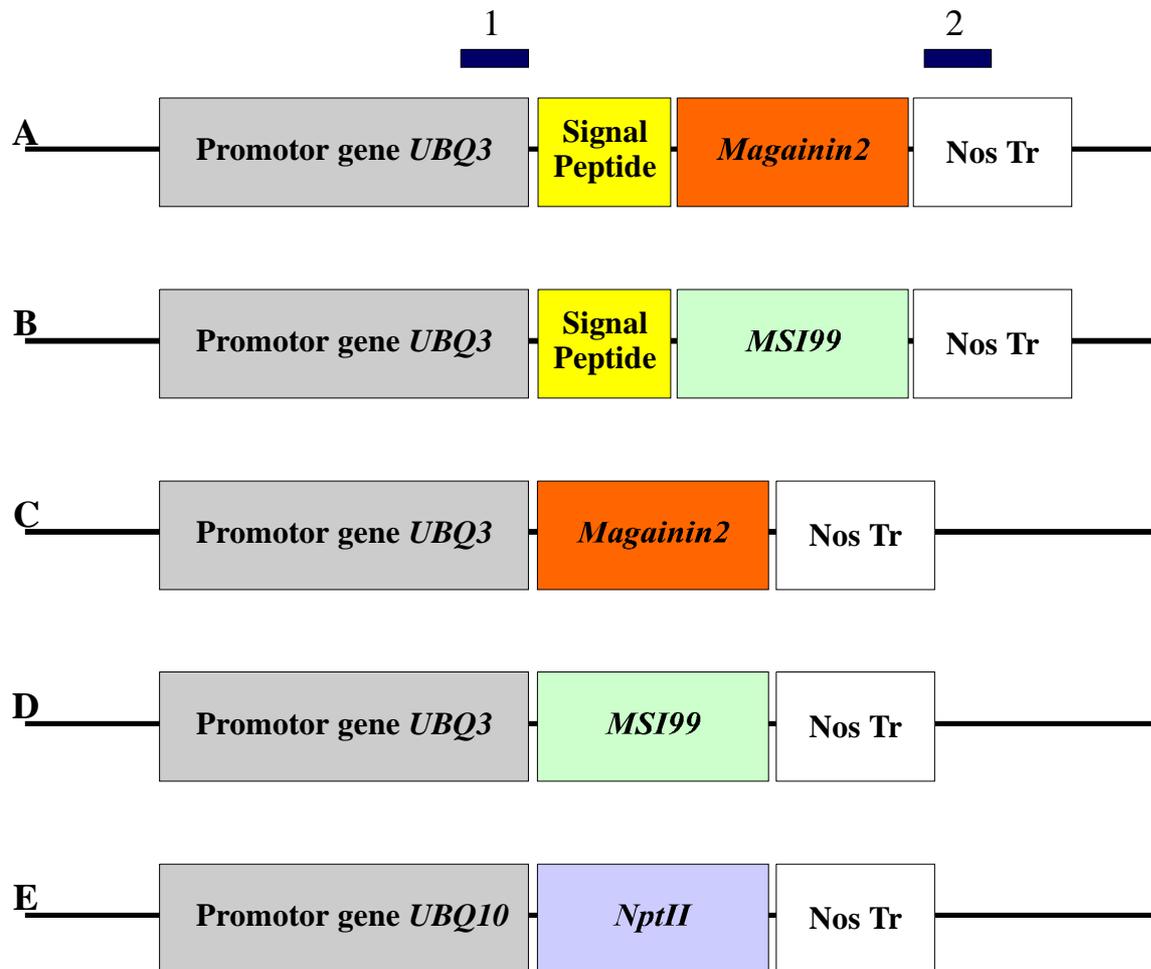


Figura 2.1. Cassete de expressão em eucariotos presente nas construções gênicas utilizadas para a transformação genética de fumo (*Nicotiana tabacum* L.). A – pB.SAN167; B – pB.SAN168; C – pSAN163; D – pSAN164; e E – pSAN236. Localização referencial de iniciadores (1 – sense e 2 – antisense) utilizados para amplificação de fragmento de DNA contendo gene de interesse nas construções A, B, C e D. Nos Tr – Terminador da nopalina sintase. *Magainin2* e *MSI99* – Genes de interesse. *UBQ3* e *UBQ10* – Genes de poli-ubiquitinas, extraídos de *Arabidopsis thaliana*. *NptII* – Gene que codifica a enzima neomicina fosfotransferase, utilizado como marcador de seleção.

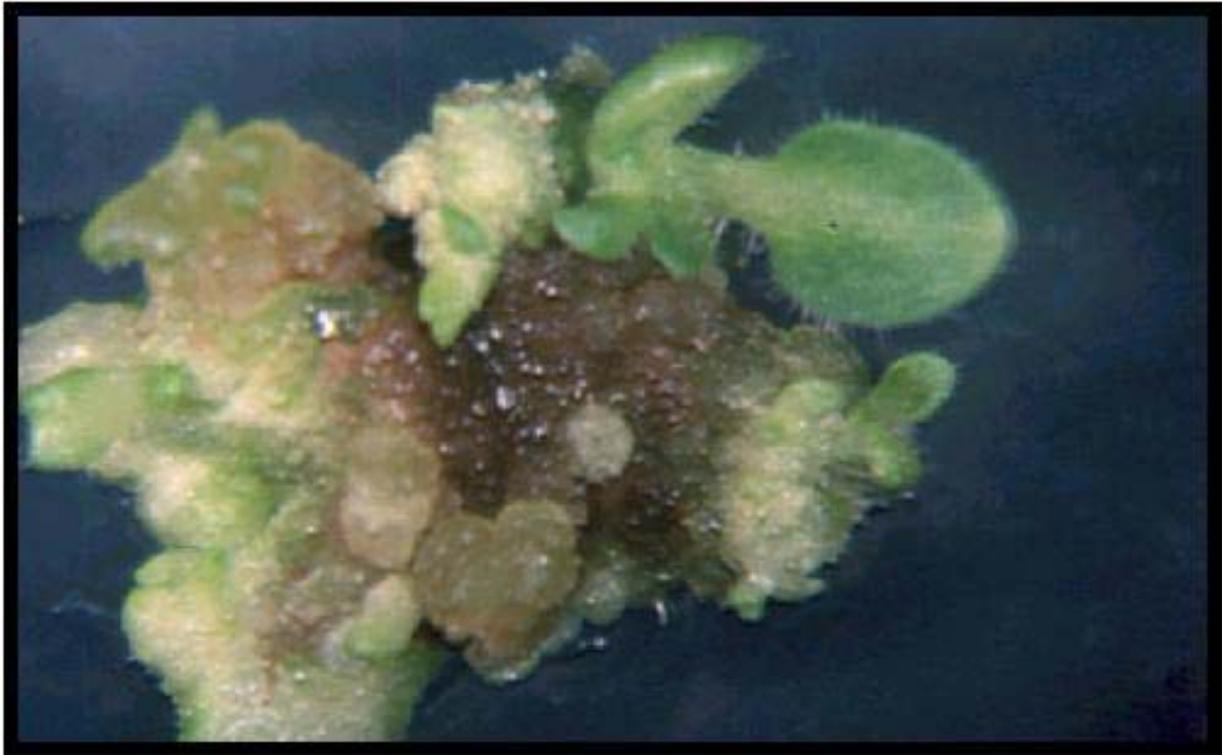


Figura 2.2. Regeneração de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) a partir de folhas submetidas a transformação genética, mediada por biobalística, em meio de cultura suplementado com canamicina.

Tabela 2.1. Sumário de experimentos de transformação de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) por biobalística.

Experimento	Cultivar	Construções	#	Placas #	Plantas
		Utilizadas*		Bombardeadas	
001/2000	Samsun	pSAN236 : pB.SAN167	10**	11	
002/2000	Samsun	pSAN236 : pB.SAN167	10	11	
003/2000	Samsun	pSAN236 : pB.SAN168	10	2	
004/2000	Samsun	pSAN236 : pB.SAN168	10	0	
005/2000	Samsun	pSAN236 : pB.SAN168	10	0	
006/2000	Samsun	pSAN236 : pSAN163	10	3	
007/2000	Samsun	pSAN236 : pSAN163	10	6	
008/2000	Xanthii	pSAN236 : pB.SAN168	10	7	
TOTAL	---		80	40	

* Co-bombardeamento utilizando DNAs na proporção de 1:2.

** Além das placas bombardeadas, cada experimento teve duas placas não bombardeadas como controle negativo.

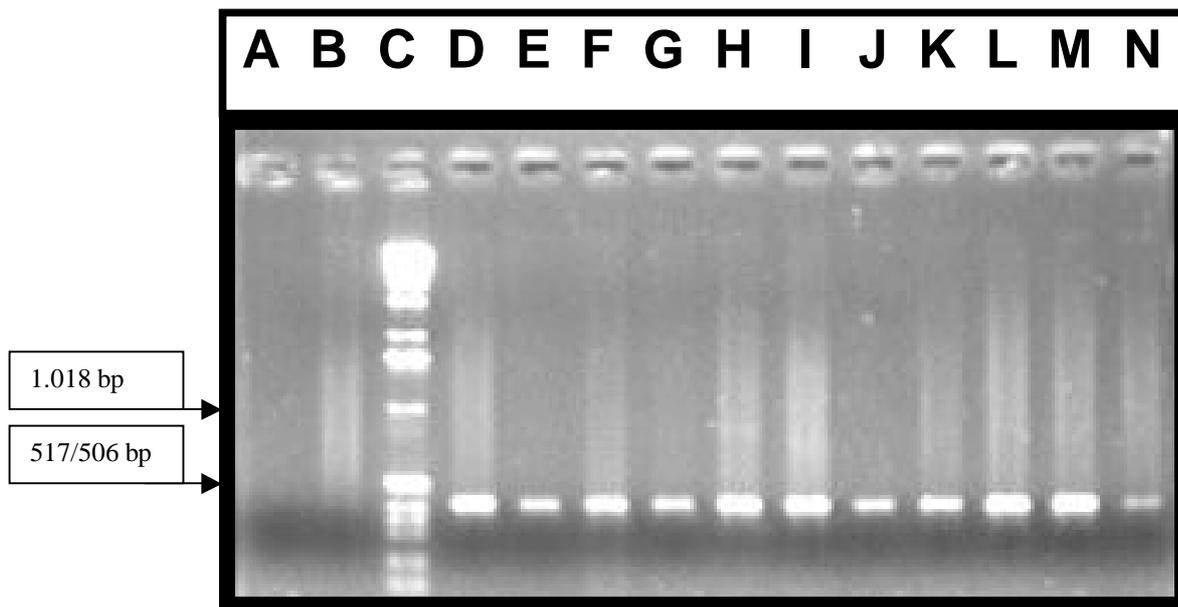


Figura 2.3. Amplificação de fragmento de DNA contendo gene *npt II*, por PCR. Linhas A e B são, respectivamente, água e planta não-transformada (controles negativos); C é 1 Kb DNA ladder; D é controle positivo (pSAN236), e linhas E a N amostras de plantas de fumo selecionadas em meio suplementado com canamicina.

CAPÍTULO 3

EXPRESSÃO TRANSIENTE DO GENE *gus* SOB REGULAÇÃO DE DIFERENTES PROMOTORES, EM DIFERENTES TECIDOS DE VIDEIRA (*Vitis sp.*), MAMOEIRO (*Carica papaya L.*) E BANANEIRA (*Musa sp.*)

RESUMO

Entre as fruteiras produzidas no Brasil, destacam-se a videira (*Vitis vinifera* L.), o mamoeiro (*Carica papaya* L.) e a bananeira (*Musa sp.*), plantadas em quase todo o território nacional e com importância econômica e social. A tecnologia de produção de organismos geneticamente modificados, também conhecidos como “transgênicos”, tem grande potencial de uso no desenvolvimento de fruteiras melhoradas. Porém, questões de propriedade intelectual limitam o uso da engenharia genética por países do Terceiro Mundo, que normalmente não detêm direitos sobre “ferramentas” necessárias ao uso desta. O presente trabalho avaliou promotores de expressão gênica, a fim de buscar alternativas ao CaMV 35S, o mais utilizado até o momento. Para tanto, construções gênicas com o gene *gus* sob a regulação de diferentes promotores foram testadas para expressão transiente em diversos tecidos de bananeira, mamoeiro e videira. Expressão transiente foi observada em embriões somáticos, caules, raízes, frutos e células em suspensão das espécies testadas. O promotor do gene *UBQ3*, que é constitutivo e se encontra em domínio público, mostrou ser uma alternativa promissora para futuros trabalhos de transformação genética destas fruteiras.

TERMOS ADICIONAIS PARA INDEXAÇÃO: β -glucuronidase, ubiquitina, actina e CaMV 35S.

INTRODUÇÃO

A fruticultura brasileira apresentou um notável crescimento nas últimas três décadas, tanto quantitativo como qualitativo. O crescimento quantitativo se deu pelo aumento da área plantada em todo o país, mas, principalmente, pela proliferação de pólos de irrigação no Nordeste Brasileiro. Por outro lado, a crescente demanda por qualidade nos mercados interno e externo, forçou uma adoção cada vez maior de tecnologias que permitam o aumento da qualidade da fruta brasileira. Dentre as diversas fruteiras produzidas no Brasil, cabe destacar a videira (*Vitis vinifera* L.), o mamoeiro (*Carica papaya* L.) e a bananeira (*Musa* sp.), que são plantadas em quase todo o território nacional, e apresentam importância tanto econômica como social.

A videira é ameaçada por inúmeros problemas fitossanitários onde quer que seja cultivada. As doenças fúngicas da videira, por exemplo, são responsáveis por perdas substanciais em produtividade e qualidade do fruto em todo o mundo. O uso de cultivares resistentes obtidas por melhoramento genético convencional tem sido uma das principais formas de controle de pragas e doenças nesta cultura. Porém, devido ao seu longo ciclo vegetativo (2-3 anos), esses programas de melhoramento necessitam de um longo período para o desenvolvimento de novas variedades (Camargo *et al.*, 1999). Nesse sentido, a engenharia genética apresenta-se como uma ferramenta muito promissora para o desenvolvimento de cultivares resistentes.

Segundo Kikkert *et al.* (1997), métodos para a transformação de videira, incluindo importantes variedades de porta-enxertos e variedades copa, têm progredido rapidamente nos últimos anos. Os métodos de transformação mais utilizados para inserir genes são aqueles baseados em cepas modificadas de *Agrobacterium tumefaciens* (Perl *et al.*, 1996; Martinelli &

Mandolino, 1994), utilizando cultura de embriões, e o método de biobalística (Sanford, 1990), no qual genes são acelerados juntamente com micropartículas inertes em alta velocidade para dentro das células. Então, vários sistemas modelo para transformação de videira já foram estabelecidos (Kikkert *et al.*, 1997), podendo ser aplicados para o melhoramento de variedades comercialmente importantes.

O Brasil é o maior produtor de mamão (*Carica papaya* L.), responsável por aproximadamente 40% da produção mundial (IBGE/SIDRA, 2000). O mamoeiro destaca-se por ser capaz de produzir frutos o ano inteiro, sob irrigação, além de apresentar um alto valor nutritivo (Burke, 1992). Como a videira, o mamoeiro tem a sua produção bastante limitada devido a uma série de pragas, cabendo destacar as de origem viral e fúngica. A “mancha anelar do mamoeiro” ou “mosaico” é o principal problema fitossanitário desta cultura no mundo, sendo causada por um vírus, o *Papaya ringspot virus* (PRSV). Diversas estratégias já foram aplicadas visando o controle desta doença, como o “roguing” (eliminação das plantas sintomáticas), o uso de plantas tolerantes desenvolvidas pelo melhoramento genético convencional e o uso de proteção cruzada (Isherwood, 1992; Rezende & Costa, 1993; Yeh & Gonsalves, 1994). Porém, nenhuma destas estratégias garante um controle amplo e duradouro. Nesse sentido, o desenvolvimento de métodos biotecnológicos para a obtenção de mamoeiros transgênicos resistentes a vírus tem hoje uma grande importância. Mamoeiros transgênicos resistentes ao vírus da mancha anelar, expressando o gene da capa proteica deste vírus, já foram obtidos (Fitch *et al.*, 1992; Tennant, 1996; Cai *et al.*, 1999; Souza Jr., 1999), e duas variedades já se encontram no mercado (Gonsalves, 1998). O domínio da tecnologia de transformação genética de mamoeiro abre a possibilidade de adicionar novos valores agregados a esta cultura, tais como resistência a fungos, vida de prateleira mais longa, etc.

A bananeira está entre as culturas tropicais e subtropicais mais importantes no mundo, sendo cultivada em mais de 100 países (INIBAP, 1999). Um dos maiores problemas desta cultura é a falta de variedades que combinem alta produtividade com resistência às principais doenças, tais como a “Sigatoka Negra” (*Mycosphaerella musicola*) e o “Mal do Panamá” (*Fusarium oxysporum* f.sp. cubense). O melhoramento genético convencional tem sido bastante utilizado nesta cultura, porém, devido principalmente a problemas de baixa fertilidade, somente poucos genótipos melhorados foram obtidos até o momento. A transformação genética nesta espécie oferece uma importante alternativa para vencer as dificuldades do melhoramento convencional, permitindo o melhoramento direto de variedades elite estéreis amplamente cultivadas no mundo. Plantas transgênicas de bananeira já foram obtidas através da técnica de bombardeamento de micropartículas em células embriogênicas em suspensão (Sagi *et al.*, 1995; Morais *et al.*, 1999) e através da infecção por *Agrobacterium* (May *et al.*, 1995).

Um dos principais fatores que limitam o desenvolvimento de plantas transgênicas em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento é a dependência do uso de “ferramentas” biotecnológicas que se encontram sob proteção intelectual ou patentes. Dentre estas “ferramentas” cabe destacar os promotores de expressão, que são regiões regulatórias de genes necessárias à transcrição dos mesmos. Promotores constitutivos são aqueles que permitem a expressão de um gene em todas as células da planta, durante todas as fases do seu desenvolvimento. Um dos promotores constitutivos mais utilizados em biotecnologia de plantas é o 35S do vírus do mosaico da couve-flor (Benfey & Chua, 1990), que confere uma alta taxa de expressão na maioria das células quando transferido para plantas.

Ubiquitinas são proteínas eucarióticas altamente conservadas de aproximadamente 76 aminoácidos (Finley & Chau, 1991). *UBQ3* é um gene de poli-ubiquitina (Callis *et al.*, 1995)

originado de *Arabidopsis thaliana*, cujo promotor que regula a sua transcrição é constitutivo e parece ser efetivo em uma grande variedade de dicotiledôneas.

O gene da β -glucuronidase (*gus*), isolado de *Escherichia coli* (Jefferson *et al.*, 1986), é um gene repórter bastante utilizado no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas. Este gene é usado para o estudo e monitoramento da expressão gênica, principalmente no que diz respeito à especificidade de sequências de promotores (Gilissen *et al.*, 1998). Esse sistema representa uma ferramenta muito importante no desenvolvimento de protocolos para modificação genética de espécies recalcitrantes, como é caso da videira. Gilissen *et al.* (1998), ressaltam que a expressão do gene *gus* em uma planta modificada geneticamente depende das características da sequência promotora ligada ao gene. No caso de promotores constitutivos, a enzima codificada por este gene estará presente em todas as células da planta, e a quantidade de enzima por célula dependerá da atividade do promotor.

O presente estudo objetivou avaliar promotores de expressão gênica em diversos tecidos de bananeira, mamoeiro e videira. Nesse contexto, foi avaliado o uso potencial do promotor do gene *UBQ3*, que é constitutivo e se encontra em domínio público, como alternativa ao promotor CaMV 35S-35S em futuros trabalhos de transformação genética destas fruteiras. Para tanto, foi analisada a expressão transiente do gene *gus*, sob o controle de diferentes promotores, em diferentes tecidos destas fruteiras.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Foram utilizadas folhas e caules de plantas de videira da variedade copa ‘Cabernet Sauvignon’, e folhas, caules e raízes, do porta-enxerto ‘Paulsen-1103’ (gentilmente cedidos pelo Laboratório de Morfogênese *in vitro* da Universidade Federal de Santa Catarina), que estavam sendo mantidas *in vitro*, em meio de cultura MS/2 isento de fitorreguladores. Culturas de calos, previamente estabelecidas segundo Martinelli *et al.* (1994), provenientes de cultura de tecidos de ovários de ambas as variedades também foram utilizadas.

Frutos, folhas, caules e raízes foram obtidos de mamoeiros ‘Sunrise’ coletados no campo da Embrapa/Cenargen – Brasília/DF. Análises nos frutos, caule e raízes foram efetuadas tanto no tecido da superfície quanto no tecido interno destes órgãos. Além destes tecidos, foram utilizados embriões somáticos estabelecidos *in vitro* segundo Souza Jr. (1999).

Células em suspensão da bananeira ‘Maçã’, obtidas de acordo com Moraes *et al.* (1999), foram utilizadas juntamente com raízes e folhas coletadas a partir de plantas estabelecidas *in vitro* e gentilmente cedidas por K. Matsumoto – Embrapa/Cenargen.

Construções Gênicas

As construções gênicas utilizadas nesse trabalho consistem do gene da β -glucuronidase (*gus*) (Jefferson *et al.*, 1986), regulado por diferentes promotores e terminadores, conforme Tabela 3.1.

O plasmídeo pAG1 (Aragão *et al.*, 2000) contém o gene *gus* sob o controle do promotor do gene *act2* (Yong-Qiang *et al.*, 1996). O plasmídeo pBI-426 (Datla *et al.*, 1991) contém o gene *gus* sob o controle do promotor 35S duplo (35S-35S), do vírus do mosaico da couve-flor (Benfey & Chua, 1990). Já o plasmídeo pUBQ3*gus* contém o gene *gus* sob o controle do promotor do gene *UBQ3*, que é um promotor constitutivo de *Arabidopsis thaliana* (Callis *et al.*, 1995). Por último, o plasmídeo pZSL11 contém o gene *gus* sob o controle do promotor constitutivo *SAM* (Elíbio Rech – Embrapa/Cenargen, comunicação pessoal). Todos os cassetes de expressão citados apresentam o terminador *nos*, do gene da nopalina sintase (Bevan *et al.*, 1983).

Transformação e Análise de Expressão Transiente

Todos os tecidos a serem transformados foram inicialmente inoculados, aproximadamente quatro horas antes da transformação, em placas de petri contendo meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) sólido, isento de fitorreguladores. Para aumentar a eficiência de transformação, os explantes foram agrupados no centro das placas para o bombardeamento.

Para videira, variedade-copa ‘Cabernet Sauvignon’, foram preparadas quatro placas para cada tipo de tecido utilizado (folhas, caules e calos). Da mesma forma, para a variedade ‘Paulsen-1103’ foram preparadas quatro placas para cada tipo de tecido (folhas, caules, raízes e calos).

Para o mamoeiro, também foram preparadas quatro placas para cada tipo de tecido (embrião somático, folhas, fruto superfície, fruto cortado, caule superfície, caule cortado, raiz superfície e raiz cortada).

No caso da bananeira, foram submetidas à transformação quatro placas com suspensões celulares, sobre papel filtro. Além disso, empregou-se também igual número de placas, com folhas ou com raízes.

O método utilizado para a transformação dos tecidos foi de biobalística (Sanford, 1990). O DNA utilizado no bombardeamento foi preparado segundo o protocolo desenvolvido por Aragão *et al.* (1996) com algumas adaptações. Cada placa foi bombardeada duas vezes, sendo que em cada bombardeamento utilizou-se 1 µg de DNA precipitado em 600 µg de micropartículas (M10) de tungstênio. O bombardeamento foi realizado em aparelho de biobalística com o gás Hélio sob pressão de 1200 psi.

Após o bombardeamento, os explantes foram mantidos em sala de crescimento ($25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz) por 24 horas. Depois desse período, realizou-se o teste histoquímico, imergindo os explantes em solução de 0.5 µg/µl 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β-D-Glucuronide, dissolvido em 10 mM EDTA, disodium salt + 100 mM NaH₂PO₄.H₂O + 0,5 mM K₄Fe(CN)₆.3H₂O + 0,1% Triton X-100 (X-Glu). Nessas condições, os explantes foram incubados no escuro a 37° C por 16 horas. Depois desse período, analisou-se a presença ou ausência de pontos de coloração azul nos diferentes tecidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Expressão transiente em Bananeira

A análise de expressão transiente em folha e raiz de bananeira não foi possível devido à completa oxidação destes órgãos quando submetidos ao bombardeamento com

micropartículas de tungstênio (dados não mostrados). Esta limitação não foi observada quando utilizaram-se células de bananeira em suspensão.

Somente a construção pAG1, que apresenta o gene *gus* sob a regulação do promotor do gene *Act2*, não apresentou resultado positivo para expressão transiente em células de suspensão de bananeira (Tabela 3.2). Este dado é contrastante com o obtido por Moraes *et al.* (2000), que relata resultado positivo de expressão transiente com o gene *gus* sob a regulação deste promotor em células em suspensão da bananeira `Maçã`. Foi considerado como resultado positivo de expressão transiente, no presente estudo, todo tecido que apresentou uma ou mais células com coloração azul após bombardeamento e tratamento em solução X-Glu. Na presença de X-Glu, a enzima β -glucuronidase produz um precipitado azul insolúvel. Não foi realizada nenhuma avaliação quantitativa da expressão transiente.

A construção pBI-426, que apresenta o gene *gus* sob a regulação do promotor CaMV 35S-35S, resultou em várias células com coloração azul (Figura 3.1 e Tabela 3.2). Da mesma forma, resultados positivos de expressão transiente foram obtidos para as construções pUBQ3gus e pZSL11 (Tabela 3.2). Os resultados obtidos com bananeira mostram que, para efeito de expressão transiente em células de suspensão da variedade `Maçã`, não houve diferença entre as construções pBI426, pUBQ3gus e pZSL11. Devido aos problemas de oxidação dos tecidos bombardeados, estudos complementares de expressão em tecidos de plantas transgênicas desenvolvidas com estas construções se fazem necessários para prover um cenário mais completo do potencial de uso do promotor UBQ3 em bananeira.

Expressão transiente em Mamoeiro

A análise da expressão transiente em mamoeiro também considerou como resultado positivo todo e qualquer tecido que apresentou uma ou mais células com coloração azul. Após o teste histoquímico em X-Glu, pontos azuis foram detectados em embriões e folhas (Figura 3.1), para todas as construções gênicas utilizadas. Tennant (1996) também observou a expressão do gene *gus*, sob a regulação do promotor CaMV 35S e do terminador *nos*, em folhas obtidas de plântulas de mamoeiro transgênico oriundas de sementes.

A expressão transiente do gene *gus* na superfície do fruto do mamoeiro (casca) foi observada para todas as construções utilizadas, com exceção da pZSL11 (Tabela 3.2). No entanto, não foi possível observar expressão deste gene na polpa do fruto, independente da construção utilizada. Quando a expressão na superfície do caule foi avaliada, pontos azuis foram observados com a maioria das construções testadas, com exceção da construção pAG1. Da mesma forma que na polpa do fruto, nenhuma expressão transiente foi observada no tecido interno do caule. Nenhum dos promotores testados promoveu o aparecimento de sinais de expressão transiente em tecidos de raiz de mamoeiro (Tabela 3.2).

A inexistência de resultado positivo de expressão transiente em tecidos internos de mamoeiro pode ser decorrente de inibição da β -glucuronidase por proteases liberadas quando os tecidos foram cortados.

Em relação aos diferentes tecidos testados para o mamoeiro, observou-se que não houve diferença entre as construções com o gene *gus* presentes nos plasmídeos pUBQ3*gus* e pBI426, que possibilitaram a expressão do gene *gus* em embriões somáticos, folhas e superfícies de frutos e caules. Este resultado sugere que o promotor do gene *UBQ3* representa uma alternativa ao uso do promotor de CaMV 35S-35S em mamoeiro.

Todos os promotores promoveram a expressão em embriões somáticos. Tecidos embrionários são normalmente empregados para a seleção *in vitro* de plantas transgênicas de mamoeiro. Estes resultados sugerem que qualquer um dos promotores testados poderia ser utilizado para regular a expressão de genes marcadores de seleção positiva de mamoeiros transgênicos.

Somente com a construção pZSL11 não foi possível observar a expressão transiente do gene *gus* na casca do fruto. Devido a limitações metodológicas, que não permitiram a obtenção de resultados conclusivos de expressão transiente na polpa do fruto, não foi possível saber se a construção pZSL11 tem ou não a mesma especificidade de expressão apresentada na superfície deste. A polpa do mamão é consumida principalmente *in natura*, sem processamento. Um promotor com expressão tecido-específica, que não se expressa na polpa do fruto teria um considerável potencial de uso nesta fruteira e em outras fruteiras, principalmente se o produto do transgene utilizado apresentasse limitações quanto à segurança alimentar; isto é, toxidez ou alergenicidade. Estudos complementares se fazem necessários, principalmente no que se refere a expressão estável do gene *gus* nos diversos tecidos do fruto, para que se tenha uma análise mais completa da expressão destes promotores em tecidos do fruto, e com isso poder saber se algum destes promotores se enquadra neste perfil.

Expressão transiente em Videira

Para o porta-enxerto 'Paulsen 1103', resultados positivos de expressão transiente do gene *gus* foram obtidos em caules (Figura 3.1) e raízes, mas não nos demais tecidos testados. Somente a construção pAG1 não apresentou expressão deste gene em nenhum tecido de

videira testado. Nas raízes, pontos azuis foram observados quando estes tecidos foram bombardeados com as construções pBI-426 e pZSL11, mas não com as demais (Tabela 3.2).

Martinelli & Mandolino (1994) obtiveram resultados positivos de expressão do gene *gus*, sob a regulação do promotor CaMV 35S e terminador *nos* em embriões somáticos secundários de *Vitis rupestris* S. 'Paulsen 1103', o porta-enxerto utilizado neste estudo, é híbrido de *V. Berlandieri* e *V. rupestris*. Para *Vitis* sp., o promotor mais utilizado em transformação genética é o CaMV 35S-35S (Kikkert *et al.* 1997; Martinelli *et al.*, 1994). As construções pBI426 e pZSL11 apresentaram a mesma especificidade para expressão transiente neste porta-enxerto, o que sugere que este promotor pode representar uma alternativa ao CaMV 35S-35S em transformação de videira.

Quando se trata de porta-enxertos, é importante que a expressão de um gene inserido ocorra principalmente nos tecidos de raiz e de caule. Os resultados obtidos revelam que o promotor do gene *UBQ3* promoveu a expressão do gene *gus* apenas em caules de videira (Tabela 3.2). Estudos complementares de expressão estável nos diferentes tecidos de videira se fazem necessários. Se estes estudos revelarem a mesma especificidade de expressão para o promotor do gene *UBQ3*, este não poderá ser utilizado quando objetivando características dependentes de expressão na raiz, como por exemplo, resistência à "pérola da terra" (*Eurizococcus brasiliensis*) ou a nematóides.

Para a variedade copa "Cabernet Sauvignon", resultados positivos de expressão transiente foram observados apenas nos caules. Estes tecidos apresentaram pontos azuis, após o teste histoquímico em X-Glu, quando bombardeados com as construções pBI-426 e pZSL11 (Tabela 3.2). Kikkert *et al.* (1997) reportam expressão transiente do gene *gus* sob o controle do promotor CaMV 35S-35S, utilizando a construção pBI-426 para o bombardeamento de células embriogênicas das variedades 'Merlot' e 'Chancellor'.

No caso de variedades copa, é importante que os promotores sejam eficientes para promover a expressão em tecidos da copa, como folhas, caule e frutos. Os resultados obtidos (Tabela 3.2) revelam que o promotor do gene *UBQ3* não foi eficiente para promover a expressão em nenhum dos tecidos testados, sendo, para tanto, menos eficiente em relação aos promotores que regulam o gene *gus* em pBI426 e pZSL11.

Um dos principais tecidos atacados por doenças fúngicas na videira são as folhas. Nenhum dos promotores utilizados no presente estudo permitiu a expressão transiente do gene *gus* neste tecido. Expressão estável deste gene foi observada em folhas, caules, raízes, anteras e ovários quando sob a regulação do promotor CaMV 35S-35S (Kikkert *et al.*, 1997). Estes autores relatam expressão estável do gene *gus* nos tecidos da variedade- copa ‘Chancellor’. A não expressão deste gene de forma transiente em folhas das variedades ‘Cabernet Sauvignon’ e ‘Paulsen 1103’ (Tabela 3.2) pode ser decorrente de limitações metodológicas ou resultado de uma especificidade de expressão em nível de variedade. Estudos complementares precisam ser realizados para melhor esclarecer este ponto.

REFERÊNCIAS

- ARAGÃO, F. J. L.; BARROS, L. M. G.; BRASILEIRO, A. C. M; RIBEIRO, S. G.; SMITH, F. D.; SANFORD, J. C.; FARIA, J. C. & RECH, E. L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theor. and Appl. Genet.*, 93:142-150, 1996.
- ARAGÃO, F. J. L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G. R. & RECH, E. L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean (*Glycine max* L. Merrill) plants at a high frequency. *Theor. Appl. Genet.*, 101:1-6, 2000.
- BENFEY, P. N. & CHUA, N. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science*, 250:959-966, 1990.

- BURKE, B. Papaya captures gold in nutritional 'Olympics'. Honolulu Star-Bulletin, 1992.
- BEVAN, M.; BRANES, W. M. & CHILTON, M-D. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. Nucl. Acids Res., 11:369-385, 1983.
- CAI, W., GONSALVES, C., TENNANT, P., FERMIN, G., SOUZA JR., M. T., SARINDU, N., JAN, F. J., ZHU, H. Y. & GONSALVES, D. A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. In Vitro Cellular & Development Biology – Plant, 35(1): 61-69, 1999.
- CALLIS, J.; CARPENTER, T.; SUN, C. & VIERSTRA, R. D. Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype columbia. Genetics, 139:921-939, 1995.
- CAMARGO, U. A.; AMARAL, A. L. & OLIVEIRA, P. R. D. Uvas sem sementes. Biotecnologia, 10:108-112, 1999.
- DATLA, R. S.; HAMMERLINDL, J. K.; PELCHER, L. E.; CROSBY, W. L. & SELVARAJ, G. A bifunctional fusion between beta-glucuronidase and neomycin phosphotransferase: a broad spectrum marker enzyme for plants. Gene, 101:239-246, 1991.
- FINLEY, D. & CHAU, V. Ubiquitination. Annu. Rev. Cell Biol., 7:25-69, 1991.
- FITCH, M.; MANSCHARDT, R.; GONSALVES, D.; SLIGHTOM, J. & SANFORD, J. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. Bio/Technology, 10:1466-1472, 1992.
- GILISSEN, L. J. W.; METZ, P. L. J.; STIEKEMA, W. J. & NAP, J. Biosafety of *E. coli* β -glucuronidase (GUS) in plants. Transgenic Research, 7:157-163, 1998.
- GONSALVES, D. Control of papaya ringspot virus in papaya: A case study. Annual Review Phytopathology, 36: 415-437, 1998.
- IBGE.SIDRA (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). <http://www.ibge.gov.br>, 2000.
- INIBAP. Networking Banana and Plantain: INIBAP Annual Report 1988. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France, 64p, 1999.
- ISHERWOOD, M. O. J. Papaya ringspot virus in Puna: chronology of events and eradication program up date. Proc. Annu. Hawaii Papaya Ind. Assoc. Conf., 28th, Honolulu, 1992. P.7-9.
- JEFFERSON, R. A.; BURGESS, S. M. & HIRSH, D. β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene fusion marker. Proc. Natl. Acad., 83:8447-8451, 1986.

- KIKKERT, J.; ALI, G. S.; STRIEM, M. J.; MARTENS, M.; WALLACE, P.G.; MOLINO, L. & REISCH, B. I. Genetic engineering of grapevine (*Vitis* sp.) for enhancement of disease resistance. *Acta Hort.* 447, 1997.
- MARTINELLI, L. & MANDOLINO, G. Genetic transformation and regeneration of transgenic plant in grapevine (*Vitis rupestris* S.). *Theor. Appl. Genet.*, 88:621-628, 1994.
- MAY, G. D.; AFZA, R.; MASON, H. S.; WIECKO, A.; NOVAK, F. J. & ARNTZEN, C. J. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Bio/Technology*, 13:486-492, 1995.
- MORAIS, L. S.; MATSUMOTO, K.; ARAGÃO, F. J. L. & RECH, E. L. Transformação em células em suspensão de bananeira, utilizando como agente seletivo o herbicida imazapyr, via biolística. 45º Congresso Brasileiro de Genética, 1999. Gramado – RS. Anais do Congresso Brasileiro de Genética. Gramado, RS:SBG, 1999. Setor 17-086.
- MURASHIGE, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plants*, 15:473-497, 1962.
- PERL, A.; LOTAN, O.; ABU-ABIED, M. & HOLLAND, D. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): the role of antioxidants during grape *Agrobacterium* interactions. *Nature Biotechnology*, 14:624-628, 1996.
- REZENDE, J. A. . & COSTA, A. S. Doenças de vírus e micoplasma de mamoeiro. *Summa Phytopathologica*, 19:73-79, 1993.
- SAGI, L.; PANIS, B.; REMY, S.; SCHOOF, H.; DE SMET, K.; SWENNEN, R. & CAMMUE, B. P. A. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* sp.) via particle bombardment. *Bio/Technology*, 13:481-485, 1995.
- SANFORD, J. C. Biolistic plant transformation. *Physiol. Plant*, 79:206-209, 1990.
- SOUZA JR., M. T. Analysis of the resistance in genetically engineered papaya against papaya ringspot potyvirus, partial characterization of the PRSV.Brazil.Bahia isolate, and development of transgenic papaya for Brazil. Ithaca, Cornell University, 1999. 277p. Tese de Doutorado.
- TENNANT, P. F. Evaluation of the resistance of coat protein transgenic papaya against papaya ringspot virus isolates and development of transgenic papaya for Jamaica. Ithaca, Cornell University, 1996. 317p. Tese de Doutorado.

YEH, S. D. & GONSALVES, D. Practices and perspective of control of papaya ringspot virus by cross protection. In: HARRIS, K. F. ed. Advances in diseases vector research. New York, Springer-Verlag, 10:237-257, 1994.

YONG-QIANG, A.; McDOWELL, J.M.; HUANG, S.; MCKINNEY, E. C.; CHAMBLISS, S. & MEAGHER, R.B. Strong constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. Plant J., 10:107-121, 1996.

Tabela 3.1. Construções gênicas com o gene *gus* utilizadas no estudo de expressão transiente em diversos tecidos de bananeira (*Musa* sp.), mamoeiro (*Carica papaya* L.) e videira (*Vitis* sp.).

Nome da Construção	Promotor	Terminador
pBI426 ¹	CaMV 35S-35S	Nos
pAG1 ²	Actin 2	Nos
pUBQ3- <i>gus</i> ³	UBQ3	Nos
pZSL11 ⁴	SAM	Nos

1 - Datla *et al.* (1991); 2 - Aragão *et al.* (2000); 3 - Silveira *et al.* (2000); e 4 - SAM (Elíbio Rech – Embrapa/Cenargen, comunicação pessoal).

Tabela 3.2. Expressão transiente do gene *gus* em diferentes tecidos de bananeira (*Musa* sp.), mamoeiro (*Carica papaya*) e videira (*Vitis* sp.) com diferentes construções gênicas.

Cultura	Tecido	Construção			
		pBI426 ¹	pUB3 <i>gus</i> ²	pAG1 ³	pZSL11 ⁴
Mamoeiro	Embrião somático	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	Folha	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	Fruto C ⁵	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
	Fruto P ⁶	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Caule E ⁷	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	Caule I ⁸	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Raiz E	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Raiz I	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Videira - Porta- enxerto	Caule	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	Raiz	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
	Calo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Folha	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Videira - Copa	Caule	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
	Calo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	Folha	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Bananeira	Células em Suspensão	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo

Gene *gus* sob o controle do promotor: 1 - CaMV 35S-35S (Datla *et al.*, 1991); 2 - do gene *UBQ3* (Silveira *et al.*, 2000); 3 - do gene *act2* (Aragão *et al.*, 2000); e 4 - SAM (Elábio Rech – Embrapa/Cenargen, comunicação pessoal). Tecido: 5 - Casca do fruto; 6 - Polpa do fruto; 7 – Tecido interno; e 8 – Tecido externo.

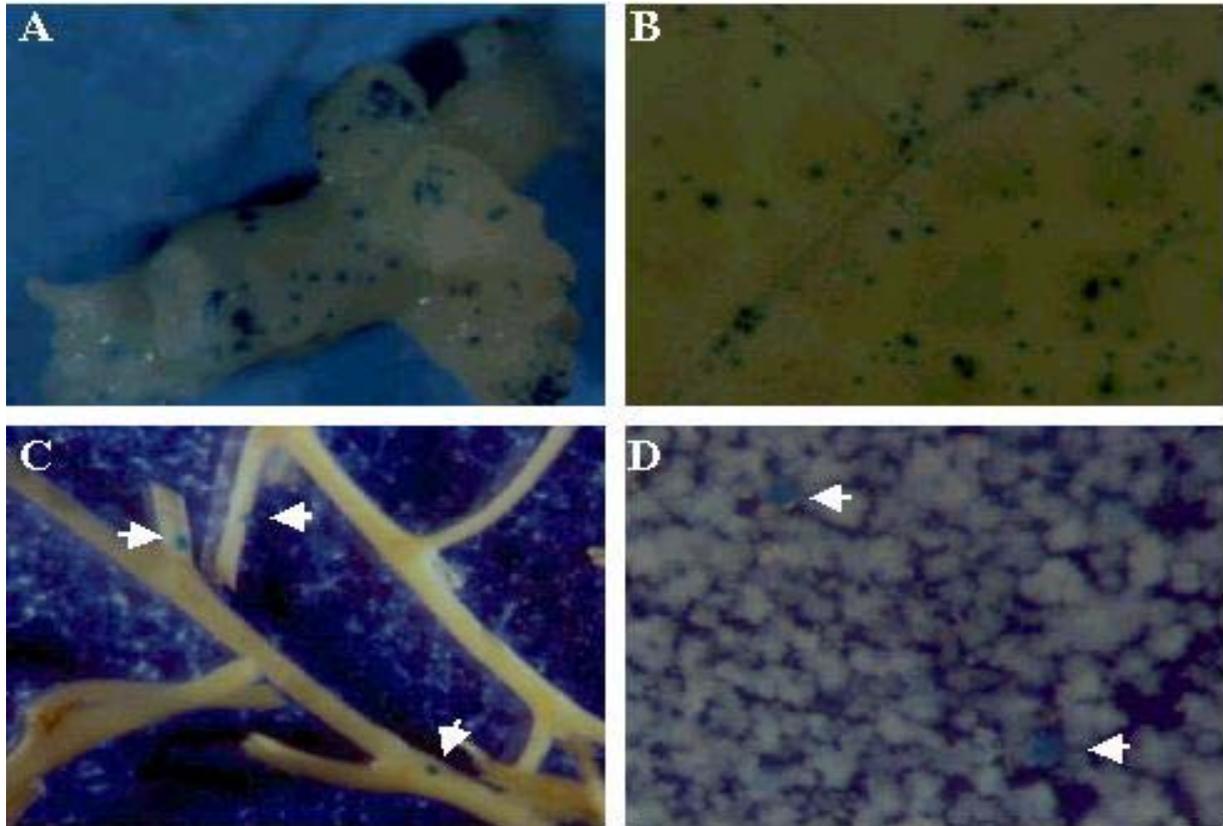


Figura 3.1. Expressão transitória do gene *gus* em diferentes tecidos de fruteiras. A e B – Respectivamente, embriões somáticos e folha de mamoeiro (*Carica papaya* cv. Sunrise); C – Caules de videira (Porta-enxerto Paulsen 1103) e D – Suspensão celular de bananeira (*Musa* sp., Grupo AAB, cv. Maçã). Setas indicam resultados positivos em C e D.

CAPÍTULO 4

SENSIBILIDADE IN VITRO DE ISOLADOS DE FUSARIUM A PEPTÍDEOS DA FAMÍLIA DAS DERMASEPTINAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

RESUMO

A fruticultura é uma atividade agrícola que tem severas limitações decorrentes da ação de fitopatógenos que ocorrem tanto em pré como pós-colheita. Dentre as doenças das fruteiras, cabe destacar aquelas causadas por fungos, em especial por aqueles do gênero *Fusarium*, que apresentam uma ampla gama de hospedeiros entre as fruteiras. Peptídeos com atividade antimicrobiana de amplo espectro têm sido objeto de intenso estudo nas últimas décadas, apresentando potencial de uso no controle de fitopatógenos. O presente estudo objetivou avaliar a ação de dois peptídeos (K e L) da família das dermaseptinas, originalmente extraídos de uma rã (*Phyllomedusa distincta*) da Floresta Atlântica Brasileira, contra fungos do gênero *Fusarium* que são patógenos de fruteiras como o abacaxizeiro, a bananeira e a videira. Os resultados mostram que ambos peptídeos apresentam atividade antimicrobiana contra os três fungos testados (*Fusarium oxysporum* f.sp. cubense, *F. oxysporum* Schl. f.sp. herbemontis e *F. moniliforme* Sheld. f.sp. subglutinans), além da determinação da concentração mínima destes capaz de inibir a germinação de conídios e crescimento micelial *in vitro*. Igual concentração mínima inibitória (CMI) foi observada para o peptídeo L, independente do isolado de fungo utilizado, enquanto que o peptídeo K teve variação de CMI.

TERMOS ADICIONAIS PARA INDEXAÇÃO: Abacaxi, banana, uva, *Phyllomedusa distincta*, concentração inibitória mínima.

ABSTRACT

The fruit crops production is an agricultural activity that shows severe limitation as a consequence of the action of plant pathogens in pre and post-harvest. Diseases caused by fungi are among the most important diseases of fruit crops. A broad range of host of the *Fusarium* genera is found among the fruit crops species. Peptides with a broad spectrum of anti-microbial activity has been the object of intense studies in the last decades, showing a potential use for the control of plant pathogens. The present study aimed to evaluate the anti-microbial action of two dermaseptins peptides (K and L), obtained from a frog (*Phyllomedusa distincta*) found in the Brazilian Atlantic Rain Forest, against three different plant pathogenic *Fusarium*, which are pathogens of pineapple, banana and grapes. The results show that both peptides have anti-microbial activity against all three fungi tested (*Fusarium oxysporum* f.sp. cubense, *F. oxysporum* Schl. f.sp. herbemontis e *F. moniliforme* Sheld. f.sp. subglutinans). The minimal concentration (MIC) of the peptides able to inhibit *in vitro* conidium germination and micelium growth were also determined. The same MIC was observed for peptide L against all three fungi, while different MICs were seen for peptide K.

INTRODUÇÃO

Diversos organismos utilizam peptídeos antimicrobianos como um componente de suas estratégias de defesa. Peptídeos hidrofóbicos e anfipáticos, produzidos em organismos como fungos, insetos, anfíbios e humanos, apresentam atividade antimicrobiana através da sua interação com membranas de células vivas (Bechinger, 1997). Peptídeos produzidos na

pele de anfíbios têm sido objeto de interesse de diversos grupos de pesquisa nos últimos anos (Batista *et al.*, 1999). Este interesse é devido à extraordinária variedade de atividades biológicas e aplicações biotecnológicas potenciais destes peptídeos (Matsuzaki *et al.*, 1995). Peptídeos obtidos de rãs da família *Phyllomedusinae* merecem particular atenção devido à sua potente atividade antimicrobiana (Coote *et al.*, 1998). Muitos destes peptídeos são descritos como dermaseptinas (DMS), sendo produzidos por células de glândulas de rãs do gênero *Phyllomedusa* (Bevins & Zasloff, 1990). As DMS exercem atividade contra bactérias, protozoários e fungos, em concentrações micromolares, exibindo não só a habilidade de identificar rapidamente células-alvo como também atividade contra alguns dos mais sérios patógenos resistentes a antibióticos (Batista *et al.*, 1999).

Phyllomedusa distincta é uma rã que ocorre preferencialmente na Floresta Atlântica do Brasil. Peptídeos já foram extraídos deste anfíbio, e tiveram sua seqüência de aminoácidos determinada (Batista *et al.*, 1999). Estudos se fazem necessários para medir a atividade destes peptídeos nativos de *P. distincta*, com a finalidade de avaliar o seu potencial de uso biológico e farmacológico.

A fruticultura é uma atividade de grande importância econômica e social no Brasil, e que ainda apresenta grande potencial de crescimento. Porém, esta tem severas limitações decorrentes de pragas que ocorrem tanto em pré como pós-colheita. Dentre estas, cabe destacar as doenças causadas por fungos, em especial aqueles do gênero *Fusarium*, que apresentam uma ampla gama de hospedeiros entre as fruteiras.

Estes patógenos, de uma maneira geral, provocam redução na qualidade dos frutos, forçando a colheita antes do ponto ideal de maturação e causando perdas nos pomares e em pós-colheita. Além disso, são responsáveis por doenças tais como: o “Mal-do-Panamá” (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* E. F. Smith), a “Fusariose” (*Fusarium oxysporum* Schl.

f.sp. herbemontis Tocchetto) e a “Fusariose” ou “Gomose” (*Fusarium moniliforme* Sheld. f.sp. subglutinans Wr. & Rg.), as quais estão entre as principais doenças da bananeira (*Musa* sp.), da videira (*Vitis* sp.) e do abacaxizeiro (*Ananas comosus*), respectivamente.

O presente estudo objetivou a determinação da concentração mínima de dois peptídeos da família das dermaseptinas (K e L), extraídos de *Phyllomedusa distincta*, capaz de inibir o crescimento *in vitro* de três diferentes fungos do gênero *Fusarium*, importantes patógenos da bananeira, do abacaxizeiro e da videira.

MATERIAL E MÉTODOS

O isolado de *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense E. F. Smith utilizado neste estudo foi cedido pelo Dr. Zilton Maciel Cordeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura, enquanto que o de *Fusarium oxysporum* Schl. f.sp. herbemontis Tocchetto foi cedido pelo Dr. Olavo Sônego da Embrapa Uva e Vinho, e o de *Fusarium moniliforme* Sheld. f.sp. subglutinans Wr. & Rg. foi cedido pelo Dr. José Aires Ventura do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural.

No recebimento, que se deu na forma de cultura micelial *in vitro*, os isolados foram repicados em placas de petri contendo meio de cultura BDA (Riker & Riker, 1936) e mantidos em sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz, durante um período que variou de sete a dez dias. Após esse período, as culturas foram utilizadas para a extração de conídios. Os conídios foram lavados das placas de cultura fúngica com uma solução de 0,1% de tween 40. Após a lavagem, a solução foi coletada e filtrada em gase para reter a massa micelial, sendo então utilizada para a contagem de conídios. A contagem de conídios foi realizada com câmara de Neubauer (Beçak & Paulete-

Vanrell, 1970) em microscópio ótico, utilizando-se um aumento de 10X. Uma diluição de 1/10X da solução filtrada de conídios das diferentes culturas de *Fusarium* foi preparada para a contagem. Esta diluição foi feita misturando-se 100 µl da solução filtrada, 50 µl de glicerol (50%), 50 µl do corante azul de toluidina (1%). e 800 µl de água milli-Q estéril. Dessa diluição, foram utilizados 5 µl na câmara de Neubauer para a contagem. Para cada fungo, o número de conídios foi contado num volume de 0,1 µl na câmara (campo D da câmara de Neubauer), sendo este procedimento repetido três vezes. A média do número de conídios em 0,1 µl foi estabelecida para cada fungo para a posterior padronização em 300 (peptídeo K) e 400 (peptídeo L) conídios/ µl na solução filtrada.

Os peptídeos K (GLWSKIKAAAGKEAAKAAAKAAGKAALNAVSEAV) e L (ALWKTLKKNVGKAAGKAALNAVTDMMVNQ) de *Phyllomedusa distincta* utilizados foram extraídos e purificados segundo Batista *et al.* (1999). Amostras liofilizadas destes foram diluídas separadamente em 1 ml de água milli-Q estéril em microtubos de 2 ml. Amostras de 5 µl de cada uma das diluições foram transferidas para outro microtubo, sendo o volume completado para 2 ml (diluição 1/ 400). Para determinar a concentração dos peptídeos K e L, as diluições 1/ 400 destes foram submetidas à leitura em espectrofotômetro para quantificação.

Diluições em série dos peptídeos, em meio BD, foram realizadas para obter as seguintes concentrações molares para o peptídeo K: $6,4 \times 10^{-5}$; $3,2 \times 10^{-5}$; $1,6 \times 10^{-5}$; $0,8 \times 10^{-5}$; $0,4 \times 10^{-5}$; $0,2 \times 10^{-5}$; $0,1 \times 10^{-5}$ e $0,05 \times 10^{-5}$; e para o peptídeo L: $6,8 \times 10^{-5}$; $3,4 \times 10^{-5}$; $1,7 \times 10^{-5}$; $0,85 \times 10^{-5}$; $0,43 \times 10^{-5}$; $0,22 \times 10^{-5}$; $0,11 \times 10^{-5}$ e $0,055 \times 10^{-5}$. Diluições em série do fungicida Benlate, em meio BD, foram realizadas para obter as seguintes concentrações molares do princípio ativo Benomyl: 136×10^{-5} ; 68×10^{-5} ; 34×10^{-5} ; 17×10^{-5} ; $8,5 \times 10^{-5}$; $4,3 \times 10^{-5}$; $2,2 \times 10^{-5}$ e $1,1 \times 10^{-5}$. O fungicida Benlate foi utilizado como controle negativo de

germinação e crescimento de micélio. Conídios inoculados em meio de cultura BD, isento de peptídeos ou fungicida, foram utilizados como controles positivos.

As análises para determinar CMI foram realizadas em placas de ELISA estéreis, com 96 células (8 x 12). A placa continha, para cada fungo testado, uma repetição de cada uma das diferentes concentrações do determinado peptídeo e do fungicida, além de três repetições do controle positivo. Cada célula da placa recebeu 190 µl de meio BD com o peptídeo ou com o fungicida, e 10 µl de solução com conídios (300-400 conídios/ µl). Três placas foram montadas para o teste de cada peptídeo, sendo que cada uma destas placas representou uma repetição, perfazendo um total de seis placas. Todas as diluições de peptídeos e fungicida foram preparadas separadamente para cada repetição.

As placas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz por 24 horas. Ao final deste período foi realizada a avaliação da germinação de conídios e crescimento micelial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 24 horas de cultivo, os seguintes resultados eram visíveis por poço na placa de ELISA: a) ausência total de germinação de conídios e crescimento micelial (Figura 4.1b); b) presença de micélio em quantidade insuficiente para cobrir toda a área do poço (Figura 4.1c); e c) presença de micélio em quantidade suficiente para cobrir toda a área do poço (Figura 4.1d). Todos os controles positivos de germinação e crescimento micelial apresentaram micélio em quantidade suficiente para cobrir toda a área do poço. Foram considerados como valores de CMI as concentrações de peptídeos e fungicida nas quais não houve germinação de conídios e crescimento micelial após 24 horas, para as três repetições. As CMIs dos peptídeos

e do fungicida, para os três diferentes isolados de *Fusarium*, podem ser visualizadas na Tabela 4.1.

A germinação de conídios e crescimento micelial de *F. moniliforme* não foi totalmente inibida na presença do peptídeo K em nenhuma das concentrações utilizadas, embora tenha sido observada uma redução significativa na quantidade de micélio - quantidade insuficiente para cobrir toda a área do poço - quando a concentração deste peptídeo foi de $6,4 \times 10^{-5}$ M. Para este mesmo fungo, a germinação de conídios e crescimento micelial foi completamente inibida na concentração de $3,4 \times 10^{-5}$ M do peptídeo L. O fungicida Benlate, na concentração de 17×10^{-5} M do princípio ativo inibiu completamente a germinação de conídios e o crescimento micelial de *F. moniliforme*. Estes resultados mostram que ambos os peptídeos foram mais eficientes que o fungicida no controle deste fungo. A CMI observada na combinação peptídeo L vs. *F. moniliforme* foi cinco vezes menor que a observada na combinação fungicida vs. *F. moniliforme*. A redução observada na germinação de conídios e crescimento micelial, quando a combinação peptídeo K vs. *F. moniliforme* foi avaliada na concentração $6,4 \times 10^{-5}$ M, sugere que a CMI nesta combinação não é muito superior a este valor, o que nos permite prever que o peptídeo K é mais eficiente que o fungicida.

Os peptídeos K e L inibiram totalmente a germinação de conídios e crescimento micelial de *F. oxysporum* f.sp. cubense nas concentrações de $3,2 \times 10^{-5}$ e $3,4 \times 10^{-5}$ M, respectivamente. O fungicida foi mais eficiente contra este fungo do que contra o *F. moniliforme*, apresentando a concentração de $4,3 \times 10^{-5}$ do princípio ativo como CMI. Estes resultados mostram que os peptídeos foram ligeiramente mais eficientes contra este patógeno de bananeira do que o fungicida.

O peptídeo K apresentou uma CMI de $1,6 \times 10^{-5}$ M, enquanto que o peptídeo L apresentou de $3,4 \times 10^{-5}$ M, para o *F. oxysporum* f.sp. herbemontis. O fungicida foi mais

eficiente na inibição a este fungo do que aos demais, apresentando uma CMI menor que $1,1 \times 10^{-5}$ M do princípio ativo. Mesmo o fungicida tendo apresentado uma alta eficiência contra este fungo, os resultados mostram que os peptídeos foram apenas ligeiramente menos eficientes que o fungicida

Os resultados descritos no presente estudo, juntamente com os de Smith *et al.* (1998), que observaram CMI's entre $0,08 \times 10^{-5}$ e $0,3 \times 10^{-5}$ M quando testando o peptídeo Magainin2 (Zasloff, 1987), ou o seu derivado sintético MSI99 (Maloy & Kari, 1995), contra *F. solani* e *F. graminearum*, mostram que peptídeos de anfíbios têm atividade antimicrobiana de amplo espectro dentro do gênero *Fusarium*. Magainin2 é um peptídeo obtido a partir da pele do sapo africano *Xenopus laevis*, e que apresenta atividade antimicrobiana de amplo espectro (Zasloff, 1987; Smith *et al.*, 1998).

O uso de peptídeos com atividade antimicrobiana no controle de fungos e bactérias fitopatogênicas é de grande interesse, e seu uso mediante expressão de genes que codificam para estes em plantas transgênicas tem sido objeto de estudo (Montanelli & Nascari, 1990; Hightower *et al.*, 1994; Florack *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1998).

Neste contexto, cabe lembrar que a adoção comercial de uma planta transgênica expressando genes que codificam para peptídeos antimicrobianos, e, conseqüentemente, com resistência a fungos ou bactérias fitopatogênicas, será dependente de uma série de fatores que extrapolam e muito o carácter meramente técnico de ser ou não resistente. Dentre estes fatores, cabe destacar, a origem do peptídeo, a forma de utilização da planta transgênica e a biossegurança ambiental e alimentar.

REFERÊNCIAS

- BATISTA, C. V. F.; SILVA, R.; SEBBEN, A.; SCALONI, A.; FERRARA, L.; PAIVA, G. R.; OLANMEDI-PORTUGAL, T.; POSSANI, L. D. & BLOCH JR., C. Antimicrobial peptides from the brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. *Peptides* 20:679-686. 1999.
- BEČAK, W. & PAULETE-VANRELL, J. Técnicas de citologia e histologia. São Paulo, Livraria Nobel S. A.. 1970.
- BECHINGER, B. Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *Journal of Membrane Biology* 156:197-211. 1997.
- BEVINS, C. L. & ZASLOFF, M. Peptides from frog skin. *Annual Review of Biochemistry* 59:395-414. 1990.
- COOTE, P.; HOLYOAK, C.; BRACEY, D.; FERDINANDO, D. & PEARCE, J. Inhibitory action of a truncated derivative of the amphibian skin peptide dermaseptin S3 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 42:2160-2170. 1998.
- FLORACK, D.; ALLEFS, S.; BOLLEN, R.; BOSCH, D.; VISSER, B. & STIEKEMA, W. Expression of giant silkworm cecropin B genes in tobacco. *Transgenic Research* 4:132-141. 1995.
- HANCOCK, R. E. W. & LEHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology* 16:82-88. 1998.
- HIGHTOWER, R.; BADEN, C.; PENZES, E.; DUNSMUIR, P. The expression of cecropin peptide in transgenic tobacco does not confer resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. *Plant Cell Report* 13:295-299. 1994.
- MALOY, W.L. & KARI, U.P. Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers* 37:105-122, 1995.
- MATSUZAKI, K.; MURASE, O.; FUJII, N. & MIYAJIMA, K. Translocation of a channel-forming antimicrobial, magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore. *Biochemistry* 34:6521-6526. 1995.
- MONTANELLI, C.; NASCARI, G. Resistance to bacterial disease: preliminary results of a biotechnological approach in potato. *Acta-Horticulture* 280:537-540. 1990.

RIKER, A. J. & RIKER, R. S. Introduction to research on plant disease. ST. Louis, Mo., John S. Swift Co. 1936.

SMITH, F.; BLOWERS, A. D.; ECK, J. V. & SANFORD, J. Expression of magainin and PGL classes of antimicrobial peptide genes in plants, and their use in creating resistance to multiple plant pathogens. Patent Application Case No. 98,349-A. Sanford Scientific, Inc. 877 Marshall Road, Waterloo, NY, 13165. USA. 1998.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. Proceedings of the National Academic Science USA 84:5449-5453, 1987.

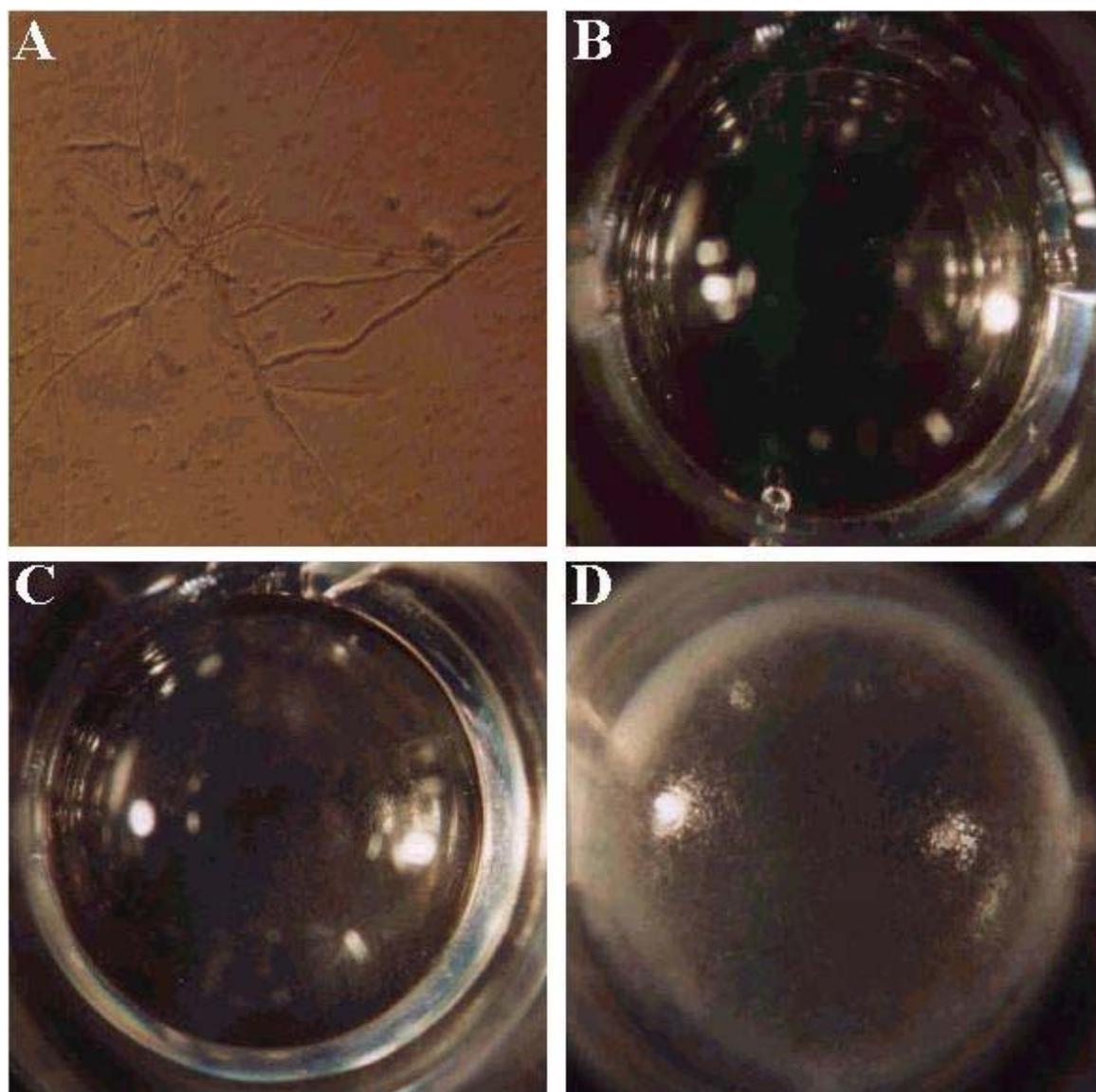


Figura 4.1. Germinação de conídios e crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense em meio BD com peptídeo antimicrobiano, 24 horas após inoculação. A – Micélio; B – Poço de placa de ELISA mostrando ausência de germinação de conídios e crescimento de micélio; C – Poço de placa de ELISA mostrando germinação de conídios e crescimento de micélio em quantidade insuficiente para cobrir a área total do poço; e D – Poço de placa de ELISA mostrando germinação de conídios e crescimento de micélio em quantidade suficiente para cobrir área do poço.

Tabela 4.1. Concentração mínima inibitória (CMI) de dois peptídeos antimicrobianos (K e L), da família das dermaseptinas, em relação a três diferentes fungos fitopatogênicos do gênero *Fusarium*.

Patógeno	Concentração Mínima Inibitória (CMI) em Molar		
	Peptídeo K	Peptídeo L	Benomyl*
<i>F. moniliforme</i> f.sp. subglutinans	$\geq 6,4 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	17×10^{-5}
<i>F. oxysporum</i> f.sp. cubense	$3,2 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$4,3 \times 10^{-5}$
<i>F. oxysporum</i> f.sp. herbemontis	$1,6 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$\leq 1,1 \times 10^{-5}$

* Metil-1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazol carbamato - princípio ativo do fungicida Benlate®

500.

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os métodos de transformação e seleção utilizados no estudo de introdução de genes de resistência a doenças, possibilitaram a obtenção de plantas de fumo resistentes ao antibiótico canamicina e com os genes de interesse *MSI99* e *Maganin2*. Estes genes expressam peptídeos antimicrobianos de amplo espectro, as magaininas. Estas plantas serão mantidas tanto *in vitro* como aclimatizadas em casa de vegetação para futuros estudos de expressão dos genes inseridos. Além disso, estas plantas poderão ser testadas quanto à resistência a diferentes patógenos que infectam plantas de fumo, e que também ocorrem em culturas agronomicamente importantes, como é o caso das fruteiras.

A elucidação de pontos referentes à expressão de genes que codificam para peptídeos antimicrobianos em fruteiras pode significar uma importante alternativa ao uso dos métodos de controle a doenças mais utilizados hoje, baseados principalmente no uso de agroquímicos. Porém, muitos estudos ainda se fazem necessários, pois, em muitos casos, peptídeos antimicrobianos não são acumulados em quantidade suficiente nas células da planta, sendo, degradados rapidamente. Além disso, existem sérias preocupações sobre efeitos fitotóxicos desencadeados por estes peptídeos quando expressos em plantas e seus riscos potenciais ao ambiente. Por estas razões, a comunidade científica não tem ainda utilizado agressivamente esta tecnologia.

Através do estudo do comportamento de diferentes promotores utilizados para a expressão transiente do gene GUS em diferentes tecidos de fruteiras, como a bananeira, o mamoeiro e a videira, foi possível a identificação de alternativas ao uso dos promotores mais

utilizados hoje para transformação de fruteiras. O promotor do gene de poli-ubiquitinas *UBQ3*, que é constitutivo e de domínio público, se mostrou como uma importante alternativa ao uso do promotor 35S-35S. A geração desse tipo de conhecimento é muito importante em países como o Brasil, onde, muitas vezes, o desenvolvimento de programas de melhoramento, através do uso da engenharia genética, é limitado pela necessidade de utilização de ferramentas biotecnológicas que estão sob patente.

Neste trabalho, foram também desenvolvidos estudos com peptídeos antimicrobianos originalmente extraídos de uma rã da Floresta Atlântica Brasileira (*Phyllomedusa distincta*). Estes peptídeos mostraram ação *in vitro* contra diversos isolados de *Fusarium*, patógeno limitante do cultivo de inúmeras fruteiras de importância econômica no Brasil. Os genes responsáveis pela expressão destes peptídeos poderão ser identificados, clonados e introduzidos no genoma destas fruteiras. Além disso, genes análogos a estes poderão ser desenvolvidos com modificações para aumentar a sua eficiência contra diversos patógenos, antes de serem utilizados em programas de melhoramento via transformação genética. O estabelecimento deste tipo de tecnologia é importante para consolidar competências para o desenvolvimento e aplicação de técnicas de transformação genética no Brasil.