UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

DANIELLE CAMARGO SCOTTON

Genômica funcional da interação cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) x *Moniliophthora perniciosa* por meio do sistema modelo Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L)

> Piracicaba 2012

DANIELLE CAMARGO SCOTTON

Genômica funcional da interação cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) x *Moniliophthora perniciosa* por meio do sistema modelo Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L)

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres

Piracicaba

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Scotton, Danielle Camargo

Genômica funcional da interação cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) x *Moniliophthora perniciosa* por meio do sistema modelo Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L.) / Danielle Camargo Scotton; orientador Lázaro Eustáquio Pereira Peres. - Piracicaba, 2012.

147 p.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Agrobacterium 2. Cacau 3. Cultura de tecidos vegetais 4. Embriogênese somática 5. Fungos 6. Interação planta-patógeno 7. Recombinação genética 8. Tomate I. Título

CDU (633.74 + 635.64) : 579.254.2

A toda minha família e aos meus queridos amigos pelo apoio, incentivo, amor dedicado e confiança em mim depositada.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre comigo, iluminando meus caminhos.

Ao Prof. Dr. Lázaro Peres, pela orientação, pelas valiosas contribuições científicas e acadêmicas, pela oportunidade e amizade.

Ao Prof. Dr. Antonio Figueira, pela orientação, disponibilidade do laboratório, amizade, confiança, pelo meu desenvolvimento profissional e paciência durante os oito anos de convivência.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão de bolsa de estudo de doutorado e a FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro necessário para a realização desta pesquisa.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), pela oportunidade de realização do doutorado. Aos Professores do CENA, que compõem a área de concentração Biologia na Agricultura e no Ambiente e aos Professores das disciplinas cursadas. Aos colegas da Pós-graduação pelo convívio e aprendizado mútuo.

Ao programa de Pós-Graduação do CENA/USP, a Profa. Dra. Elisabete A. De Nadai e Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli, e a equipe: Neuda Oliveira, Daiane Vieira, Fábio Oliveira e Sônia de Campos, pela paciência e constante auxílio.

Aos amigos e colegas do Laboratório do Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal da ESALQ/USP: Cássia Figueiredo, Eloisa Vendemiatti, Fernanda Arikita, Frederico Jesus, Gabriel Rehder, Geraldo Silva, Guilherme Oliveira, Ivan Sestari, João Bernardes, Lilian Pino, Lucia Mattielo, Mariana Azevedo, Matheus Vicente e Vitti pelo convívio diário em equipe, pelo auxílio em várias situações, sugestões, pela amizade, pelos cafés, jantares e os *happy hour*, e pela agradável convivência durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP: Aline Harissis, Amanda Jesus, Amanda Mattoso, André Tagliaferro, Angela Artero, Celso Gaspar, Deborah Nishimura, Edgard Kamimura, Felipe Jóia, Gildemberg Leal Jr, Gislayne Bitencourt, Ilse Ferrari, Isabela Camargo, João Fernando Bortoleto, Joni Lima, Letícia Sergio, Luís Damasceno, Lorena Sereno, Mariana Belloti, Marielle Vitti, Marília Reichert, Melissa Alves, Renato Ferreira, Roberto Camargo, Rodolfo Augusto Maniero, Tais Tomazin, Thaísa Pinheiro e Verusca Rossi, pelo convívio em equipe, pelo auxílio em várias situações, sugestões, críticas, pela amizade e pela agradável convivência durante o desenvolvimento deste trabalho.

Em especial aos amigos de salinha: João Felipe Nebó, Eduardo Bressan, Juliana Leles, Gabriela de Gaspari, Onildo Nunes e Cláudio Lopes, muito obrigada pelos ótimos momentos compartilhados, pela constante ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade.

As minhas amigas Layanne Souza e Juliana Deganello, as Gras, muito obrigada por todos os momentos divertidos que passamos no laboratório e fora dele, pelo incentivo, pelo companheirismo, pelo constante auxílio, pelas viagens e coletas, experimentos na casa-devegetação, pelas experiências profissionais e pessoais trocadas, especialmente pela ajuda que vocês me deram nessa fase final da tese. Acima de tudo isso, obrigada por serem essas pessoas tão especiais e amigas de verdade.

A amiga Mariana da Silva Azevedo pelo companheirismo, pelo auxílio constante com as plantinhas de tomate e experimentos de transformação, pelas horas divertidas no laboratório, pelos *happy hours* divertidíssimos, especialmente pela amizade.

As amigas queridas Liliane Stipp (Lili) e Alessandra Monteiro-Hara (Pitty) pela longa, duradoura e sincera amizade, pelo apoio nos momentos difíceis, e compartilhar os ótimos também, pela ajuda nos experimentos, pelas conversas e risadas, e pelas horas de lazer...

A todos os funcionários do LAMP do CENA/USP, Benedita Inês Rodrigues, José Benedito Alves, Luis Eduardo Fonseca, Myriam Raquel Orsy, Paulo Cassieri e Wlamir Godoy pela amizade e pelo auxílio imprescindível nas várias fases do desenvolvimento deste trabalho.

A Sra. Sônia Storer pela ajuda imprescindível e pela constante amizade e carinho.

As Sras. Marília Henyei, Raquel Carvalho, Renata Fini Mazzero e Adriana Moretti, bibliotecárias do CENA e ao Sr. Celsinho Aguiar, pela constante ajuda.

A direção e ao time de pesquisa do Centro Mars de Pesquisa do Cacau pelo apoio concedido, em especial, aos amigos do laboratório de cultura de tecidos e fisiologia Ednailza Miranda Carvalho Aboboreira (Nay), Delvany, Eliege, Antônio Carlos, Soraia e Valdivino pelo apoio nos experimentos, demonstração de amizade e companheirismo nos poucos dias que estive em Itabuna-BA.

A Liliane de Daiana Teixeira, da Clínica Fitopatológica da ESALQ/USP, pela disponibilidade dos fungos necrotróficos.

A bióloga Mônica L. Rossi e Dra. Neusa L. Nogueira, do Laboratório Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas do CENA/USP, pela ajuda sempre que necessária.

Ao pessoal do Laboratório Biotecnologia Vegetal do CENA/USP, em especial a Profa. Dra. Beatriz Mendes, Renata Cruz, Marcelo Correa e Eveline Tavano pela constante ajuda e amizade.

A minha mãe, Maria Aparecida (Dim), por estar sempre ao meu lado e ter me mostrado que o mundo pode ser melhor. Pelo exemplo, pela educação, apoio, amor incondicional, carinho, amizade eterna, compreensão e incentivo durante toda a minha vida, enfim, por tudo... E por ser minha referência de vida diária... Minha melhor amiga, Obrigada!!!

Ao Fausto, por estar sempre ao meu lado, pela sua dignidade, pelo amor, pelos cuidados extras, pela compreensão nos momentos de ausência, por batalhar sempre comigo...

Aos meus irmãos Karinna e Giovanni pelo apoio durante todos os momentos de minha vida, e obrigada por acreditarem em mim e nunca me deixarem desanimar. A minha maravilhosa sobrinha Brunna, pela felicidade de cada dia e pelo amor incondicional, pela espontaneidade, veracidade e pureza de seus gestos. E ao meu pai, Dirceu (*in memorian*), por ter me ensinado a lutar pelos meus ideais e ser essa pessoa que sou hoje...

E a todos não citados, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta tese.

Agradeço de coração.

RESUMO

9

SCOTTON, D. C. Genômica funcional da interação cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) x *Moniliophthora perniciosa* por meio do sistema modelo Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L). 2012. 147 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

A cultura do cacaueiro (Theobroma cacao L.) na região sul da Bahia foi dizimada com a introdução do fungo Moniliophthora perniciosa. Novas fontes de resistência têm sido buscadas e alternativas são necessárias para assegurar a produção de cultivares considerando a variabilidade genética do patógeno. A descoberta de genes de resistência e de defesa presumíveis a partir de abordagens genômicas impõe a necessidade de estabelecimento de uma plataforma de análise funcional para comprovar a função dos genes identificados e/ou esclarecimento dos mecanismos envolvidos; isto requer o desenvolvimento de métodos de manipulação e/ou inserção de genes, permitindo a superexpressão ou silenciamento de genes de interesse. Os primeiros cacaueiros transgênicos só foram desenvolvidos a poucos anos, e a eficiência do processo ainda é limitada. Há grande influência genotípica na capacidade embriogênica, que reduz a eficiência de obtenção de transgênicos. Micro-Tom tem sido considerado um modelo para pesquisas em tomateiro, sendo uma cultivar miniatura, ciclo de vida curto, porte reduzido e de fácil transformação. MT pode ser usada no estudo da interação com o fungo M. perniciosa, visto a disponibilidade de isolados do biótipo-S que infectam o tomateiro, assim disponibilizando informações dos mecanismos de defesa do T. cacao a M. perniciosa em um menor tempo, suprindo alguns obstáculos encontrados nas características biológicas do cacaueiro. Considerando que durante a patogênese do cacaueiro, M. perniciosa é capaz de desencadear a morte celular programada no tecido infectado, foi analisada a hipótese de que a expressão de genes anti-apoptóticos diminuiria ou minimizaria os efeitos da infecção, permitindo uma menor susceptibilidade. Para tal, foi clonado o gene da proteína Bax-inhibitor-1, que atua como atenuador basal para a progressão da morte celular, e desenvolvida uma construção. Esse gene havia sido detectado numa biblioteca da interação M. perniciosa x T. cacao e identificado com seguência completa, e foi re-introduzido em tomateiro e cacaueiro sob controle de promotor constitutivo. Para o modelo genético MT, plantas transgênicas contendo Bax-inhibitor-1, SKP1 e Cafeína sintase foram obtidas. Plantas transgênicas de tomateiro contendo o gene Bax-inhibitor-1 foram inoculadas com M. perniciosa e demonstraram redução no número de plantas sintomáticas (40%), quando comparadas as plantas de MT inoculadas com o mesmo patógeno (83%). Esses dados corroboram com resultados das inoculações com os fungos necrotróficos B. cinerea, S. sclerotium e S. rolfsii, sendo que as plantas transgênicas inoculadas também apresentaram contenção dos sintomas dessas doenças, uma redução de 40% da área de infecção em comparação as plantas de MT infectadas. Desse modo, pode-se concluir que o gene Bax-inhibitor-1 em MT agiu de forma basal na atenuação da progressão da morte celular, reduzindo os sintomas da vassoura-de-bruxa, da mesma forma que esse transgene contribuiu na redução dos sintomas do mofo cinza, mofo branco e murcha-de-esclerócio, por conter o crescimento e desenvolvimento dos fungos inoculados em tomateiro. Foi possível otimizar o protocolo de embriogênese somática e de transformação genética de cacaueiro, o que levou a obtenção de plantas transgênicas contendo a construção Bax-inhibitor-1, confirmadas por RTqPCR. Indicando que a abordagem de transformação de cacaueiro está implementada no laboratório, porém a baixa eficiência do processo e o tempo necessário ainda impedem seu uso em larga escala para análise funcional.

Palavras-chave: Embriogênese somática; Micro-Tom; Transformação genética; Moniliophthora perniciosa.

ABSTRACT

SCOTTON, D. C. Functional genomics of the interaction cocoa (*Theobroma cacao* L.) x *Moniliophthora perniciosa* by means of the model system Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L). 2012. 147 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

The cultivation of cocoa (Theobroma cacao L.) in south Bahia was decimated by the introduction of the fungus Moniliophthora perniciosa. New sources of resistance have been sought and alternatives are needed to ensure the production of cultivars considering the genetic variability of the pathogen. The discovery of genes for resistance and defense presumed from genomic approaches makes it necessary the establishment of a platform to verify the function of identified genes and/or the elucidation of the mechanisms involved; this requires the development of methods for manipulating and/or insertion of genes, allowing overexpressing or silencing of genes of interest. The first transgenic cocoa were only developed a few years ago, and the efficiency of the process is still limited. There is an expressive influence of the embryogenic capacity, which reduces the efficiency of obtaining transgenic plants. The cultivar Micro-Tom (MT) is considered a model for research on tomato, since it has a miniature size, short life cycle, and facile genetic transformation. MT can be used to study the interaction with the fungus M. perniciosa, since isolates of biotype-S are able to infect tomato, thus provinding inferences about defense mechanisms of T. cacao to M. perniciosa in a short time, providing some obstacles encountered in biological characteristics of cocoa. Since during the pathogenesis of cocoa, M. perniciosa is able to trigger programmed cell death in infected tissue, it was analyzed the hypothesis that the expression of anti-apoptotic genes diminish or minimize the effects of infection, allowing less susceptibility. To this end, was cloned the protein Bax-inhibitor-1, which acts as a basal attenuator for the progression of cell death, was cloned engineered in a vector for genetic transformation. This gene was detected in a library of interaction M. perniciosa x T. cacao and identified with the complete sequence, and was re-introduced into tomato and cocoa under the control of a constitutive promoter. For the genetic model MT, transgenic plants containing Bax-inhibitor-1, SKP1 and Caffeine synthase were obtained. Transgenic tomato plants containing the gene Bax-inhibitor-1 were inoculated with M. perniciosa and demonstrated a reduction in the number of symptomatic plants (40%) compared MT plants inoculated with the same pathogen (83%). These data corroborate results of inoculations with the necrotroph fungi B. cinerea, S. sclerotium e S. rolfsii. Thus, when transgenic plants were inoculated, it was observed a reduction of 40% in the area of infection, compared to infected MT plants. Taken together, the results indicate that the gene Bax-inhibitor-1 acted in the basal attenuation of progression of cell death in MT, reducing the symptoms of the witches' broom disease, as well as the symptoms of gray mold, white mold and wilt esclerotia. Moreover it was possible to optimize the protocol for somatic embryogenesis and genetic transformation of cocoa, which led to the production of transgenic plants containing the construct Baxinhibitor-1, confirmed by RT-qPCR. Although, a protocol for cocoa transformation was implemented in the laboratory, its the low efficiency and the time required still prevent its widespread use for functional analysis.

Keywords: Somatic embryogenesis; Micro-Tom; Genetic transformation; *Moniliophthora perniciosa*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1. O cacaueiro	20
2.2. A doença vassoura-de-bruxa	21
2.3. Transformação genética do cacaueiro	23
2.4. Micro-Tom: Modelo genético	25
2.5. Morte celular programada	
2.5. Moniliophthora perniciosa x morte celular	
3. OBJETIVOS	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1. Construção dos vetores para expressão nas plantas de cacaueiro e tomateiro	
4.1.1. Bax-inhibitor-1	
4.1.1.1. Desenho de iniciadores	
4.1.1.2. PCR para clonagem de Bax-inhibitor-1 de cacaueiro	
4.1.1.3. Purificação do fragmento e clonagem no vetor de entrada	
4.1.1.4. Minipreparação de DNA plasmidial	40
4.1.1.5. Confirmação de clonagem por restrição enzimática e sequenciamento de DNA	41
4.1.1.6. Recombinação do inserto para os vetores binários Gateway	42
4.1.1.6.1. Vetor binário pMDC32	42
4.1.1.6.2. Vetor binário pK7WG2D	43
4.1.1.7. Introdução das construções em A. tumefaciens	45
4.1.2. Clonagem do promotor do gene SKP1 de cacaueiro	46
4.1.2.1. Clonagem do promotor do gene SKP1 de cacaueiro em vetor binário de tra	nsformação
de plantas	47
4.1.3. Busca do promotor do gene presumível da cafeína sintase de T. cacao e clon	agem 49
4.1.3.1. Clonagem do promotor do gene presumível da cafeína sintase de T. caca	ao em vetor
binário de transformação de plantas	50
4.2. Transformação genética de tomateiro via Agrobacterium tumefaciens	51
4.2.1. Material vegetal	51
4.2.2. Plasmídeos e condições de cultura de A. tumefaciens	51
4.2.3. Inoculação e co-cultura	51

4.2.4. Seleção e obtenção das plantas transformadas	52
4.3. Ensaio de indução de morte celular nas plantas transgênicas de tomateiro	52
4.3.1. Coloração histoquímica com DAB	53
4.4. Ensaio de inoculação de Moniliophthora perniciosa em tomateiro	54
4.4.1. Isolados de <i>M. perniciosa</i> e produção de basidiósporos	54
4.4.2. Preparo das plântulas de tomateiro	54
4.4.3. Inoculação e avaliação de sintomas	55
4.5. Ensaio de patogenicidade de fungos necrotróficos em folhas de tomateiro	55
4.5.1. Isolados de fungos necrotróficos	55
4.5.2. Inoculação de folhas e avaliação de sintomas	55
4.5.3. Inoculação de frutos e avaliação de sintomas	56
4.6. Embriogênese somática de cacaueiro	57
4.6.1. Material vegetal	57
4.6.2. Coleta e esterilização dos botões florais	57
4.6.3. Dissecação dos botões florais e indução de calo	57
4.6.4. Indução e manutenção dos embriões somáticos primários	58
4.6.5. Indução e manutenção dos embriões somáticos secundários	58
4.6.6. Conversão de embriões e estabelecimento das plântulas	59
4.7. Transformação genética de cacaueiro via Agrobacterium tumefaciens	60
4.7.1. Linhagens, plasmídeos e condições de cultura de A. tumefaciens	60
4.7.2. Inoculação e co-cultura	61
4.7.3. Seleção das plantas transformadas	61
4.7.4. Ensaio histoquímico de atividade da enzima β-glucuronidase	62
4.8. Extração de RNA total	63
4.8.1. Extração de RNA total de tomateiro	63
4.8.2. Extração de RNA total de embriões somáticos de cacaueiro	64
4.8.3. Quantificação e análise da integridade do RNA total	64
4.8.4. Tratamento com DNAse	65
4.8.5. Síntese de cDNA	65
4.6.6. Confirmação da eficiência da síntese de cDNA	65
4.9. Determinação da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos r	eversos
(RT-qPCR) para os embriões somáticos transgênicos de cacaueiro e para as	plantas
transgênicas de tomateiro	66
4.10. Análises estatísticas	67

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO68
5.1. Clonagem de <i>Bax-inhibitor-1</i> de cacaueiro
5.2. Transformação genética de tomateiro via A. tumefaciens contendo o gene
Bax-inhibitor-1
5.3. Análise da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos
(RT-qPCR) das plantas transgênicas de tomateiro contendo o gene Bax-inhibitor-177
5.4. Ensaio de indução de morte celular nas plantas transgênicas de tomateiro
5.5. Ensaio de inoculação de <i>Moniliophthora perniciosa</i> em tomateiro
5.6. Ensaio de patogenicidade de fungos necrotróficos em folhas e frutos de tomateiro91
5.7. Clonagem do promotor do gene <i>SKP1</i> de cacaueiro
5.8. Clonagem do promotor do gene presumível da cafeína sintase de cacaueiro103
5.9. Transformação genética de tomateiro via A. tumefaciens contendo os promotores
SKP1 e Cafeína sintase
5.10. Análise da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos
(RT-qPCR) das plantas transgênicas de tomateiro contendo os promotores SKP1 e CAF.114
5.11. Embriogênese somática de cacaueiro116
5.12. Conversão de embriões e estabelecimento das plântulas de cacaueiro
5.13. Transformação genética de cacaueiro via A. tumefaciens
5.14. Análise da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos
(RT-qPCR) dos embriões somáticos transgênicas de cacaueiro contendo o gene
Bax-inhibitor-1
6. CONCLUSÕES130
REFERÊNCIAS131

1. INTRODUÇÃO

A cultura do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) na região sul da Bahia foi dizimada com a introdução da doença vassoura-de-bruxa, causada pelo basidiomiceto *Moniliophtora perniciosa*. A renovação da cultura tem se fundamentado numa única fonte de resistência ('Scavina 6') que, entretanto, tem apresentado crescentes sinais de infecção. Novas fontes de resistência têm sido buscadas na região Amazônica, porém alternativas são necessárias para assegurar a produção de cultivares considerando a variabilidade genética do patógeno. Aliado a essa demanda, a descoberta de genes de resistência e de defesa presumíveis a partir de abordagens genômicas impõe a necessidade de estabelecimento de uma plataforma de análise funcional para comprovar a função dos genes identificados e/ou esclarecimento dos mecanismos envolvidos. A análise funcional de genes requer o desenvolvimento de métodos de manipulação e/ou inserção de genes no cacaueiro, permitindo a superexpressão ou silenciamento de genes de interesse.

O cacaueiro, entretanto tem sido considerado como uma planta recalcitrante ao cultivo *in vitro* e apenas recentemente foi possível obter embriões somáticos de tecidos esporofíticos. Em consequência disso, os primeiros cacaueiros transgênicos só foram desenvolvidos a poucos anos, e a eficiência do processo ainda é limitada. Há grande influência genotípica na capacidade embriogênica, que reduz a eficiência de obtenção de transgênicos.

Para a utilização de uma abordagem genética, baseada em plantas transgênicas, faz se necessário a escolha de um modelo vegetal adequado. O tomateiro, segundo a literatura, é um material adequado para a utilização das técnicas de cultura de tecidos (HILLE et al., 1989; PATIL, 1994). O tomateiro também é uma espécie cultivada de grande importância econômica e apresenta frutos carnosos, o que possibilita estudos sobre o desenvolvimento desse tipo de órgão (HONG; LEE, 1993).

A partir dos últimos anos da década de 90, a cultivar 'Micro-Tom' (MT) têm recebido atenção como um modelo para pesquisas em tomateiro. O MT é uma cultivar miniatura, como modelo para estudos genéticos em *Solanum lycopersicon*, pois é capaz de crescer em altas densidades, além de ter um ciclo de vida curto, podendo produzir de três a quatro gerações por ano. MT possui porte reduzido com cerca de 8 cm de altura e de fácil transformação (PINO et al., 2010), possuindo vantagens semelhantes ao que se tem hoje para *Arabidopsis thaliana*.

A cultivar MT também pode ser usada no estudo da interação com o fungo *M. perniciosa*, visto a disponibilidade de isolados do biótipo-S que infectam o tomateiro (*Solanum lycopersicum*). A utilização de um modelo genético no estudo da doença vassoura-de-bruxa disponibiliza informações dos mecanismos de defesa do *T. cacao* a *M. perniciosa* em um menor tempo, suprindo alguns obstáculos encontrados nas características biológicas do cacaueiro (MARELLI et al., 2009), como ciclo reprodutivo longo, espécie perene arbórea com baixa eficiência para o cultivo *in vitro* (FIGUEIRA; ALEMANNO, 2005).

MT é susceptível a pelo menos quatro fungos (*Athelia rolfsii*, *Botrytis cinerea*, *Oidium* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*), duas espécies de bactérias (*Ralstonia solanacearum* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) e três vírus (*Tomato mosaic virus* - ToMV, *Tomato aspermy virus* - TAV e *Cucumber mosaic virus* - CMV; ARIE et al., 2007). Inoculações realizadas com diversos patógenos como *Botrytis cinerea*, *Oidium* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phytophthora infestans* apresentaram sintomas característicos nas plantas de MT desafiadas, demonstrando a possibilidade de estudos mais aprofundados na caracterização da interação patógeno-hospedeiro em diversas doenças de importância econômica, utilizando-se do modelo MT (TAKAHASHI et al., 2005; ARIE et al., 2007). Fungos hemibiotróficos, como *M. perniciosa*, utilizam estratégia intermediária, primeiramente mantendo as células do hospedeiro vivas, voltando o metabolismo a seu favor, porém com o avanço da doença promovem a morte das células e completam seu ciclo de vida (PURDY; SCHMIDT, 1996; HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000).

Bax-inhibitor-1 é um supressor da morte celular melhor caracterizado e muito conservado entre plantas e animais (HÜCKELHOVEN, 2004; WATANABE; LAM, 2009). A superexpressão de *Bax-inhibior-1* resultou na proteção contra apoptose induzida por certos tipos de estímulos em células de mamíferos, ao passo que a baixa regulação de *Bax-inhibior-1* pela construção antisenso promoveu apoptose de algumas linhagens de tumor (XU; REED, 1998). Subsequentemente, *Bax-inhibitor-1* de arroz e *Arabidopsis* foram isolados e mostrou ser uma proteína evolutivamente conservada que, quando superexpressa em leveduras e plantas, suprime a morte celular induzida por Bax de mamíferos (KAWAI et al., 1999; KAWAI-YAMADA et al., 2001).

Considerando que durante a patogênese do cacaueiro, *M. perniciosa* é capaz de desencadear a morte celular programada (apoptose) do tecido infectado, com sintomas acentuados em estágios avançados de infecção, foi analisada a hipótese de que a expressão de genes anti-apoptóticos diminuiria ou minimizaria os efeitos da infecção, permitindo uma

menor susceptibilidade. Para tal, foi clonado o gene que codifica a proteína *Bax-inhibitor-1*, que atua como atenuador basal para a progressão da morte celular, e desenvolvida uma construção. Esse gene havia sido detectado numa biblioteca da interação *M. perniciosa* x *T. cacao* e identificado com sequência completa (GESTEIRA et al., 2007), e foi re-introduzido em dois sistemas (tomateiro e cacaueiro) sob controle de promotor constitutivo e foi avaliado para seu efeito na susceptibilidade a infecção por *M. perniciosa*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O cacaueiro

O cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) pertence à família Malvaceae senso latu (ALVERSON et al., 1999), e é uma árvore nativa da região amazônica e cultivada nas Américas do Sul e Central, Caribe, África e Ásia (DIAS, 2001). Trata-se de uma espécie diplóide (2n = 20), perene, arbórea, com flores hermafroditas, alógama e umbrófila. Suas amêndoas representam a principal matéria prima para a indústria de chocolate, e também para indústria farmacêutica e de cosméticos pela utilização da manteiga de cacau. Sob o ponto de vista econômico, é considerada uma das principais culturas tropicais em todo o mundo, estimando-se que o valor total da sua produção atinja cerca de três bilhões de dólares anuais (CHARTERS; WILKINSON, 2000). Atualmente a produção de cacau no Brasil está em torno de 233.000 toneladas de amêndoas, situando o país em sexto lugar na produção mundial (FAO, 2010).

O Brasil sempre teve destaque na produção de cacau, e considerado o principal país produtor das Américas (PURDY; SCHIMIDT, 1996). Diversas doenças são responsáveis pela diminuição da qualidade da produção das lavouras cacaueiras, tais como a vassoura-de-bruxa, podridão-parda, monilíase e morte-descendente, sendo a vassoura-de-bruxa o patógeno que se destaca como principal causador da redução da produtividade das plantações de cacaueira no Brasil (DIAS, 2001). Em 1989, o fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, causador da vassoura-de-bruxa, foi introduzido na região sul da Bahia. As perdas de produtividade do cacau, associadas aos baixos preços do produto no mercado internacional, contribuíram para descapitalização dos agricultores ocasionando um descaso e abandono das lavouras. Estes fatores levaram a uma redução na produtividade, afetando toda a região cacaueira (TREVIZAN, 1996).

Com o aparecimento da vassoura-de-bruxa na região cacaueira da Bahia, as pesquisas passaram a ser intensificadas na busca de soluções econômicas e viáveis para o controle da doença (OLIVEIRA, 2000). Contudo, as características biológicas de *T. cacao*, por se tratar de espécie perene arbórea, com ciclo reprodutivo longo, e que possui baixa eficiência para o cultivo *in vitro* (FIGUEIRA; ALEMANNO, 2005), dificultam o estudo da espécie.

2.2. A doença vassoura-de-bruxa

A vassoura-de-bruxa inicialmente teve o seu agente etiológico descrito por Stahel, em 1915, como Marasmius perniciosus. Mais tarde, em 1942, Singer na revisão sistemática do gênero Crinipellis, classificou o patógeno como pertencente а esse gênero (GRIFFITH et al., 1994), passando na ocasião a ser identificado como Crinipellis perniciosa (Stahel) Singer. Recentemente, baseado na sequencia de cinco genes, o fungo foi reclassificado *Moniliophthora* como perniciosa Marasmiaceae (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005). Esse fungo é um basidiomiceto, hemibiotrófico, da ordem Agaricales e família Marasmiaceae (SILVA et al., 2002). O nome da doença provém do sintoma típico que a planta susceptível exibe quando infectado por esse fungo: superbrotamento dos ramos, que se tornam semelhantes a uma vassoura, quando seca.

A doença consiste numa importante enfermidade do cacaueiro, que infecta os lancamentos foliares novos, os frutos em desenvolvimento e as almofadas florais, tornando as sementes impróprias para o beneficiamento, ocasionando queda acentuada na produção, provocando o desenvolvimento anormal, seguido de morte das parte infectadas (PURDY; SCHMIDT, 1996), podendo até provocar a morte da planta quando afetada por sucessivos ciclos patógeno associdados а fatores abióticos (ANDEBRHAN, 1984: do QUEIROZ et al., 2003). A extensa área cultivada com cultivares tradicionais susceptíveis de cacaueiro e a regularidade nas distribuição de chuvas, favorecendo o crescimento das plantas ao longo do ano, são condições propícias para a rápida disseminação do fungo (DIAS, 2001).

O fungo *M. perniciosa* possui vários hospedeiros que permite o classificar em biótipos. Os isolados patogênicos classificados como biótipo-C atingem o cacaueiro e outras espécies dos gêneros *Theobroma* e *Herrania* (Sterculiaceae) (ANDEBRHAN et al., 1995). O biótipo-S infecta espécies do gênero *Solanum* induzindo sintomas característicos da doença, ocorrendo geralmente em áreas de florestas alteradas (BASTOS; EVANS, 1985). O biótipo-B foi identificado no urucum (*Bixa orellana*) cultivado próximo a plantações de cacaueiro (BASTOS; ANDEBRHAN, 1986). Algumas evidências demonstram que o biótipo-B e o biótipo-C são idênticos (LANA, 2004) visto que o biótipo-C foi capaz de induzir sintomas característicos da vassoura-de-bruxa em *Bixa orellana* (BASTOS; ANDEBRHAN, 1986). O biótipo-L pode ser isolado de lianas e cipós, principalmente da família Bignoniaceae,

colonizando tecidos vivos sem induzir sintomas (GRIFFITH; HEDGER, 1994). Os biótipos-S e -C exibem homotalismo primário e causam sintomas característicos em seus hospedeiros; já o biótipo-L geralmente não causa sintomas da doença e apresenta-se heterotálico, com estratégia de reprodução cruzada (GRIFFITH; HEDGER, 1994). Apesar da produção de sintomas entre os biótipos-S e -C em seus hospedeiros, o biótipo-S mostra uma maior semelhança genética com o biótipo-L do que com o biótipo-C, sugerindo que os dois biótipos separadamente, homotálicos evoluíram provavelmente а partir do biótipo-L (GRIFFITH et al., 1994). Em contrapartida, trabalhos recentes relacionaram geneticamente os biótipos-S e -C, concluindo que os isolados de M. perniciosa que infectam solanáceas pertencem ao mesmo grupo filogenético de isolados que atacam T. cacao, T grandiflorum, T. subincatum e Herrania sp (MARELLI et al., 2009). Estudos similares, usando sequências ITS (Internal Transcribed Spacer), também agruparam os biótipos-S e -C em um mesmo clado filogenético (DE ARRUDA et al., 2005), apoiando os relatos de que alguns isolados do biótipo-S induziram sintomas de hiperplasia em 10% de plantas de T. cacao inoculadas (LOPES; LUZ; BEZERRA, 2001).

O fungo M. perniciosa apresenta duas fases de vida; a fase biotrófica (parasítica) e a necrotrófica (saprofítica). A primeira inicia-se quando os esporos, a forma reprodutiva do fungo, aderem inicialmente à superfície dos tecidos dos ramos ou frutos em crescimento e lançam hifa formada por células de um só núcleo. As hifas são capazes de penetrarem diretamente nos tecidos meristemáticos, ou através de ferimentos e estômatos (EVANS, 1979), acomodando-se entre as células do tecido do ramo jovem, bastante pobres em nutrientes, causando hipertrofia e hiperplasia do tecido, perda de dominância apical, e proliferação de brotos, a qual resulta na formação de uma haste anormal denominada de vassoura-verde, sintoma característico da doença (ALBUQUERQUE et al., 2005). A infecção de frutos leva a produção de frutos partenocárpicos, que podem apresentar forma de 'morango' ou 'cenoura', ou mesmo tornarem-se inchados e deformados com sementes impróprias para o consumo, refletindo em prejuízos econômicos para o produtor (PURDY; SCHMIDT, 1996). Algumas semanas após a infecção, no início da segunda fase, saprofítica ou necrotrófica, as folhas do tecido infectado começam a necrosar, e ocorre uma degradação pelo micélio saprofítico, provavelmente com o envolvimento de enzimas hidrolíticas (PURDY; SCHMIDT, 1996). Em torno de 60 a 90 dias após a infecção as parte doentes tornam-se secas (EVANS, 1980). Estas, sob condições de alta umidade (\geq 80%), precipitação de 1.000 a 2.000 mm e temperaturas entre 22 e 28°C produzem os basidiocarpos (PURDY; SCHMIDT, 1996). Ocorre, portanto, uma transição de vassouras verdes para vassouras necróticas (SILVA et al., 2002). A produção de basidiocarpos e formação de esporos pode ocorrer em qualquer tecido necrótico infectado, após alternância de períodos de seca e chuva completando o ciclo da doença (ALMEIDA; CHIACCHIO; ROCHA, 1997; SCARPARI et al., 2005). Adicionalmente, trabalhos de Kilaru e Hasenstein (2005) concluíram que a transição de fase do fungo está correlacionada com o acúmulo de nutrientes. Leal Jr, Albuquerque e Figueira (2007) propôs que a mudança de fase da vassoura-de-bruxa ocorra antes mesmo da manifestação dos sintomas como morte dos tecidos vegetais, visto a expressão diferencial de genes distintos nas fases biotrófica e necrotrófica.

2.3. Transformação genética do cacaueiro

A biotecnologia moderna oferece uma variedade de abordagens para aumentar os programas de melhoramento de plantas. Entre os principais estão cultura de tecidos, seleção assistida por marcadores (SAM) e transformação genética (ESKES; LANAUD, 1997; WILKINSON, 2000). Através da transformação genética, é possível obter plantas transgênicas com características de interesse econômico, como resistência a patógenos (vírus, fungos, bactérias), insetos ou estresses ambientais, diminuição da velocidade de amadurecimento de frutos, bem como na melhoria da qualidade nutricional e produção de metabólicos de interesse.

Para a aplicação das técnicas de transformação genética é necessário que as células ou tecidos transformados sejam regenerados, *in vitro*, em plantas que expressem o gene introduzido. As técnicas de transformação podem ser agrupadas em duas categorias: transferência indireta e direta de genes. A transferência indireta é aquela em que, para intermediar a transformação, utiliza-se um vetor como *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*. A transformação via *Agrobacterium* tem sido o método mais utilizado para obtenção de plantas transgênicas, principalmente dicotiledôneas, com a exceção das leguminosas. A transferência direta de genes, principalmente através do sistema de biobalística, tem sido empregada para espécies pouco susceptíveis às diferentes estirpes de *Agrobacterium*, como as monocotiledôneas e leguminosas.

O cacaueiro demonstrou a susceptibilidade dos tecidos de cacau a A. tumefaciens (PURDY; DICKSTEIN, 1989). Um dos primeiros relatos de transformação genética descreveu a transformação de discos foliares com a cepa de *A. tumefaciens* A281 (SAIN; ODURO; FURTEK, 1994). Posteriormente, um sistema de transformação genética para cacau, capaz de originar plantas inteiras foi estabelecido, onde utiliza a transformação mediada por *A. tumefaciens* e explantes cotiledonares dos embriões somáticos secundários (MAXIMOVA et al., 2003). O gene marcador GFP foi utilizado como meio de identificar os embriões somáticos transgênicos, e com isso otimizar o protocolo para a obtenção de uma série de plantas transgênicas. A inserção do transgene, a expressão do gene e a sua estabilidade mostraram-se similar a outras plantas transgênicas de diferentes espécies (GUILTINAN, 2007). Mais recentemente, embriões somáticos secundários foram utilizados para aumentar a eficiência da transformação de cacau e obter plântulas transgênicas expressando o gene *SN19* da toxina Bt (*Bacillus thuringiensis*) (CHAIDAMSARI, 2005).

Um protocolo de transformação genética para cacaueiro foi desenvolvido no laboratório do Professor Mark Guiltinan (Penn State University) [ANTÚNEZ DE MAYOLO et al., 2003; MAXIMOVA et al., 2003, 2006, 2008]. Transformação de cacau, regeneração de plantas e suas subsequentes análises necessitaram cerca de seis meses, a partir da construção até a obtenção de uma pequena plântula. O protocolo foi baseado na embriogênese somática como um sistema de regeneração de plantas in vitro (LI et al., 1998; MAXIMOVA et al., 2002, 2005, 2008; TRAORE et al., 2003; TRAORE; GUILTINAN, 2006). Bons resultados foram também obtidos usando pétalas a partir de outros genótipos como TSH565 e TSH1188 (SILVA et al., 2008). Cotilédones cortados a partir de embriões somáticos primários foram usados como explantes para o co-cultivo com Agrobacterium contendo plasmídeos binários, os quais continham o gene repórter GFP, o gene de resistência a kanamicina e o gene investigado. Após alguns dias de co-cultivo dos cotilédones dos embriões primários com a Agrobacterium, os explantes foram colocados em meio de seleção contendo antibióticos para eliminar o crescimento da bactéria e selecionar as células transgênicas. Embriogênese secundária foi induzida e embriões começaram a desenvolver ao longo dos próximos meses no escuro. Usando este método, entre uma e dez plantas transgênicas foram rotineiramente obtidas para cada tentativa de transformação.

O trabalho publicado por Silva et al. (2009) teve como objetivo melhorar o método de transformação genética, avaliando os diferentes fatores que afetam a eficiência da embriogênese somática e da transformação em cacau. As variáveis avaliadas incluíram tipos e concentrações de poliaminas e antibioticos ß-lactam (cefotaxima, meropenem e timentin), concentração de higromicina como agente de seleção, diferentes fatores que afetam a

transferência do gene *uidA* no genótipo TSH 565, que ainda não tinham sido estudadas em cacaueiro. Foi demonstrado que as poliaminas putrescina, espermidina e espermina significativamente melhoraram a embriogênese secundária em cacau sem infecção com *Agrobacterium*. Embora nenhuma planta transgênica tenha sido produzida como resultado deste estudo, os resultados indicaram que os antibióticos timentin e meropenem, usados como agentes de seleção para *A. tumefaciens*, tiveram um efeito não prejudicial na embriogênese secundária, visto que o antibiótico cefotaxima, frequentemente utilizado, inibiu a formação de embriões. Higromicina mostrou um forte efeito inibitório sobre a embriogênese somática secundária de cacau (SILVA et al., 2009). Em resumo, esforços têm sido feitos para melhorar o protocolo de transformação de cacaueiro.

2.4. Micro-Tom: Modelo genético

Para a utilização de uma abordagem genética, baseada em plantas transgênicas, faz se necessário a escolha de um modelo vegetal adequado. O tomateiro, segundo a literatura, é um material adequado para a utilização das técnicas de cultura de tecidos (HILLE et al., 1989; PATIL, 1994). Além disso, ele possui um genoma relativamente pequeno (905 Mb), distribuído em 12 cromossomos, mapas cromossômicos bem estruturados com marcadores clássicos e moleculares (RICK; YODER, 1988; TANKSLEY et al., 1992; LIMA et al., 2004), uma ampla riqueza de germoplasma constituída por 9 espécies selvagens do gênero Solanum seção Lycopersicum (LI; CHETELAT, 2010) que podem ser cruzadas com a espécie cultivada (STEVENS; RICK, 1986). O tomateiro também é uma espécie cultivada de grande importância econômica e apresenta frutos carnosos, o que possibilita estudos sobre o desenvolvimento desse tipo de órgão (HONG; LEE, 1993). Além disso, possui mapa de ligação com diversos marcadores associados a traços de importância econômica e biológica, e genoma sequenciado (CAMPOS et al., 2010; THE TOMATO GENOME 0 CONSORTIUM, 2012).

A partir dos últimos anos da década de 90, a cultivar 'Micro-Tom' (MT) têm recebido atenção como um modelo para pesquisas em tomateiro. O MT é uma cultivar miniatura, criada para fins ornamentais (SCOTT; HARBAUGH, 1989), que foi proposta por Meissner et al. (1997) como modelo para estudos genéticos em *Solanum lycopersicon*, pois é capaz de crescer em altas densidades, além de ter um ciclo de vida curto (70-90 dias), podendo produzir de três a quatro gerações por ano. MT possui porte reduzido com cerca de 8 cm de altura e de fácil transformação (PINO et al., 2010), possuindo vantagens semelhantes ao que se tem hoje para *Arabidopsis thaliana*. O ciclo curto de MT pode acelerar a criação de NILs (linhas quase isogênicas), uma vez que esse processo leva pelo menos seis gerações de retrocruzamentos (CARVALHO et al., 2011). Sendo assim, o MT mostra-se um aliado nos estudos de processos de desenvolvimento vegetal, transformação genética (PARK et al., 2003; DAN et al., 2006; SUN et al., 2006; QIU et al., 2007) e nas interações planta-patógeno (ARIE et al., 2007).

Essas vantagens têm feito do tomateiro um excelente modelo para estudar o GRUISSEM, desenvolvimento do fruto (GILLASPY; **BEM-DAVID**; 1993; GIOVANNONI, 2004), processos de amadurecimento (WILKINSON et al., 1995; 2004; al., GIOVANNONI, 2007; ALBA et 2005), metabolismo de açúcar (OHYAMA et al., 1995; CARRARI et al., 2006), biossíntese de carotenóides (BRAMLEY, 2002; ISAACSON et al., 2002), análises de QTLs (DE VICENTE; TANKSLEY, 1993; FRARY et al., 2000) e interações planta-microorganismo (SALMERON et al., 1996; PEDLEY; MARTIN, 2003; ZSÖGÖN et al., 2008). Adicionalmente, MT dispõe de sistema de cultivo in vitro e protocolo de transformação genética estabelecido (PINO et al., 2010).

A capacidade para regeneração *in vitro* em tomateiro pode ser transferida de espécies selvagens (KOORNNEEF et al., 1993; PINO et al., 2010). A cultura de raiz de tomateiro *in vitro* vem sendo realizada com sucesso desde 1934 (WHITE, 1934). Em estudos de regeneração da cultura de calos obtidos a partir de diferentes gerações de híbridos entre *S. peruvianum* e *S. lycopersicum*, Koornneef et al. (1993) observaram que a capacidade de regeneração derivada de *S. peruvianum* é controlada por dois alelos dominantes, denominados *Rg1* e *Rg2*, onde a presença de apenas um desses alelos, *Rg1*, já é suficiente para conferir capacidade de regeneração de gemas caulinares provindas de explantes radiculares e de *hairy roots* transgênicas (PERES et al., 2001). Além disso, somente um reduzido número de espécies selvagens de *Solanum* seção *Lycopersicum* possui a capacidade de regeneração a partir de explantes radiculares, sendo esta característica ausente em tomateiro cultivado (PERES et al., 2001). Este gene *RG1* foi mapeado no cromossomo 3 próximo ao *locus* yellow flesh (*r*) (KOORNNEEF et al., 1993), no qual está localizado um gene específico do fruto para biossíntese de carotenóides (fiteno sintase ou *PSY1*; FRAY; GRIERSON, 1993). O alelo recessivo *r* está presente em frutos de coloração verde (*S. peruvianum*) e confere frutos de

coloração amarelo quando introgredido em *S. lycopersicun*, sendo utilizado dessa maneira como marcador morfológico indicativo da presença de *Rg1* (LIMA et al., 2004).

Fungos fitopatógenos possuem estratégias biotróficas, necrotróficas ou hemibiotróficas para o alojamento em seus hospedeiros. Podendo essa colonização ser iniciada pela invasão de tecidos que se encontram previamente feridos, penetração nos tecidos superficiais por ataque enzimático, ou por orifícios naturais como estômatos. Os fungos biotróficos possuem caráter de vida oposto aos necrotróficos, pois eles necessitam de tecidos vivos para seu estabelecimento enquanto que os necrotróficos têm a necessidade da morte do tecido para o seu desenvolvimento (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997).

MT é susceptível a pelo menos quatro fungos (*Athelia rolfsii*, *Botrytis cinerea*, *Oidium* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*), duas espécies de bactérias (*Ralstonia solanacearum* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) e três vírus (*Tomato mosaic virus* - ToMV, *Tomato aspermy virus* - TAV e *Cucumber mosaic virus* - CMV; ARIE et al., 2007). Inoculações realizadas com diversos patógenos como *Botrytis cinerea*, *Oidium* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phytophthora infestans* apresentaram sintomas característicos nas plantas de MT desafiadas, demonstrando a possibilidade de estudos mais aprofundados na caracterização da interação patógeno-hospedeiro em diversas doenças de importância econômica, utilizando-se do modelo MT (TAKAHASHI et al., 2005; ARIE et al., 2007). Fungos hemibiotróficos, como *M. perniciosa*, utilizam estratégia intermediária, primeiramente mantendo as células do hospedeiro vivas, voltando o metabolismo a seu favor, porém com o avanço da doença promovem a morte das células e completam seu ciclo de vida (PURDY; SCHMIDT, 1996; HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000).

A cultivar MT também pode ser usada no estudo da interação com o fungo *M. perniciosa*, visto a disponibilidade de isolados do biótipo-S que infectam o tomateiro (*Solanum lycopersicum*). A utilização de um modelo genético no estudo da doença vassoura-de-bruxa disponibiliza informações dos mecanismos de defesa do *T. cacao* a *M. perniciosa* em um menor tempo, suprindo alguns obstáculos encontrados nas características biológicas do cacaueiro (MARELLI et al., 2009), como ciclo reprodutivo longo, espécie perene arbórea com baixa eficiência para o cultivo *in vitro* (FIGUEIRA; ALEMANNO, 2005).

2.5. Morte celular programada

Wiliam Councilman, em 1890, foi o primeiro a relatar o processo de apoptose, observando corpos acidófilos vacuolados no fígado de pacientes com febre amarela. Em 1965, Kerr descreveu a forma geneticamente programada da morte celular, analisando histologicamente células do fígado de roedores. Este fenômeno foi então denominado "apoptose" por Kerr, Wyllie e Currie (1972), e teve a denominação derivada do grego, apo – separação e ptosis – queda. Este termo foi utilizado pelos gregos antigos para descrever a queda de flores e folhas das árvores durante o outono (TORRES; VARGAS, 2003).

A morte celular programada (PCD; *Programmed Cell Death*) é um mecanismo utilizado em larga escala nos processos de desenvolvimento e necessário ao crescimento regular de organismos multicelulares. A PCD é um processo de grande complexidade, podendo se manifestar de diferentes formas, tendo características moleculares e morfológicas bastante variadas, dependendo do contexto em que ocorre em plantas e animais (STELLER, 1995; PALLAVAN-UNSAL; BUYUKTUNCER; TUFEKCI, 2003). A morte celular pode ser dividida em três fases, sendo a fase inicial aquela em que a célula recebe estímulos fisiológicos, biológicos, químicos ou físicos que iniciam uma sequência de eventos (TORRES; VARGAS, 2003).

A segunda, fase de execução, surge com ativação de uma rede de sinalização, ativação enzimática, alterações na mitocôndria, com alterações do potencial transmembrana e liberação do citocromo C, aumento nos níveis de espécies de Oxigênio Reativas, fragmentação e contração da cromatina (MITTLER, 1998). A última fase caracteriza-se pela degradação do DNA e das proteínas nas células (TORRES; VARGAS, 2003).

O processo de PCD em plantas é similar ao de mamíferos, embora não haja um padrão comum bem estabelecido. Os fenômenos morfológicos e bioquímicos tendem a ser os mesmos como quebra do citoplasma, condensação nuclear, aumento da permeabilidade de membrana, influxo de cálcio, liberação do citocromo C, ativação de proteases específicas e fragmentação do DNA (SOLOMON et al., 1999; JONES, 2000; ZUPPINI; NAVAZIO; MARIANI, 2004). Esses sintomas são expressos diferencialmente do propósito de controle de morte celular que ocorre nas células das plantas (LAM, 2004).

A morte celular é ativada em diversos processos essenciais de desenvolvimento em plantas, como na embriogênese, senescência das folhas e das pétalas (HONG et al., 2000; COUPE et al., 2004), no desenvolvimento dos tecidos vasculares (PENNELL; LAMB, 1997; MITTLER, 1998; DANGL; DIETRICH; THOMAS, 2000), na determinação sexual (GREENBERG, 1996; PENNELL; LAMB, 1997; MITTLER, 1998), no desenvolvimento e germinação de sementes, assim como durante a interação com o patógeno (RYERSON, HEATH, 1996; DANON et al., 2000), bem como em resposta a estresses bióticos e abióticos (WOLTERING; VAN DER BENT; HOEBERICHTS, 2002; CHICHKOVA et al., 2004; WATANABE; LAM, 2004;). Também é ativada em resposta a uma série de mudanças ambientais, tais como presença de toxinas (WANG; BOSTOCK; GILCHRIST, 1996; STONE et al., 2000), agentes químicos (RYERSON, HEATH, 1996; JONG et al., 2000), estresse mecânico (GARCÊS; DURZAN; PEDROSO, 2001), mudança gravitacional (PEDROSO; DURZAN, 2000).

A Resposta de Hipersensibilidade (HR) é o processo de PCD mais conhecido em plantas e caracteriza-se por uma resposta rápida ocorrida no sítio de infecção levando a formação de uma lesão localizada, delimitada por tecido saudável, visando inibir a dispersão do agente invasor (GREENBERG, 1996; PENNEL; LAMB, 1997; GREENBERG; YAO, 2004). A ativação da resposta de defesa inicia-se com o reconhecimento de moléculas codificadas pelo patógeno denominadas elicitores (peptídeos, proteínas, oligossacarídeos ou outros). A interação dos elicitores do patógeno com os receptores do hospedeiro ativa uma cascata de transdução de sinal, ocasionando respostas bioquímicas e celulares características de morte celular (DANGL; DIETRICH; THOMAS, 2000; QUTOB et al., 2000; JENNINGS et al., 2001; VEIT et al., 2001; FELLBRICH et al., 2002; APEL; HIRT, 2004; HÜCKELHOVEN, 2007). Muitas evidências sugerem que HR resulta da ativação de um processo de PCD, inclusive foi demonstrado que a ativação de morte celular durante a HR requer atividade da maquinaria de transcrição da planta (GREENBERG; YAO, 2004).

Na tentativa de se compreender os mecanismos de sinalização e desencadeamento de PCD tem havido progresso no sentido de identificar possíveis peças deste intricado mecanismo. Por meio de inúmeros estudos, já é possível relacionar a degradação do DNA (RYERSON; HEATH, 1996; KATSUHARA, 1997; NING et al., 2001; COSTA et al., 2008), a explosão oxidativa, liberação de fitoalexinas e compostos fenólicos, presença de NO (Óxido Nítrico), alteração no fluxo de Ca⁺² e outros íons, liberação do citocromo C mitocondrial, hormônios (etileno, ácido jasmônico e ácido salicílico) e suas possíveis

interações com o controle deste sistema (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996; TAIZ; ZEIGER, 2004; KOO et al., 2006).

Dentre as crescentes observações que indicam que o mecanismo funcional de PCD é conservado entre animais e plantas, destaca-se a descoberta da existência de caspases em vegetais (CHICHKOVA et al., 2004). Estas proteínas pertencem a uma classe de cisteína-proteases específicas que mostram um alto grau de especificidade com absoluto requerimento para clivagem adjacente a um resíduo de aspartato e uma sequência de reconhecimento de ao menos 4 aminoácidos N-terminais ao sítio de clivagem (WOLTERING; BENT; HOEBERICHTS, 2002), capazes de clivar outras proteínas e desencadear processos que levam a apoptose da célula. Em plantas, dois tipos de proteases foram identificados como caspases: as metacaspases e as enzimas de processamento vacuolar (VPE) [WOLTERING; BENT; HOEBERICHTS, 2002]. As VPEs foram originalmente descobertas durante a maturação de sementes (HARA-NISHIMURA et al., 2005). Estas enzimas podem funcionar como molécula chave para desencadear o colapso vacuolar levando a morte da célula (SANMARTÍN et al., 2005). Segundo Hatsugai et al. (2004) e Rojo et al. (2004), as VPEs apresentam atividade semelhante a das caspases e regulam a morte da célula em Arabidospsis e Nicotiana. A expressão de VPEs é induzida em condições de PCD como após a infecção pelo vírus do mosaico do tabaco (Tobacco mosaic virus, TMV) em plantas de tabaco (CHICHKOVA et al., 2004), ou durante a senescência e após o ataques de patógenos em Arabidopsis indicando que a regulação de sua atividade pode ser em nível de transcrição (SANMARTÍN et al., 2005).

Muitos sistemas foram desenvolvidos para análise da participação de caspases nos processos de morte celular ocorridos em plantas. Em tomateiro, foi isolado um gene de metacaspase, denominado LeMCA1, sendo que em folhas de tomate infectadas com Botrytis cinerea sofrendo morte celular, houve aumento dos níveis de expressão deste gene (HOEBERICHTS; HAVE: WOLTERING. 2003: WATANABE; LAM. 2004). Solomon et al. (1999) demonstraram que o estresse oxidativo, produzido na morte celular, induz a atividade de cisteínas-proteases em células de soja inoculadas com uma linhagem de Pseudomonas syringae. Assim, a inibição da atividade destas proteínas levou ao bloqueio da PCD, comprovando o envolvimento dessas proteases e seus possíveis inibidores na PCD em plantas. A análise de expressão gênica durante a morte celular em A. thaliana identificou o envolvimento de cisteína-proteases neste processo (SWIDZINSKY; SWEETLOVE; LEAVER, 2002). Estas evidências indicam que assim como em animais, as caspases

executam um papel relevante na morte celular apoptótica em plantas, sendo possivelmente conservadas evolutivamente.

Apesar da descrição do fenômeno ter sido feita em 1965, apenas no início de 1990 o primeiro gene apoptótico (bcl-2) foi descoberto em células animais e foi reconhecidamente caracterizado como supressor de apoptose. Posteriormente, foram descobertos outros genes em animais, sendo caracterizados como supressores (bl-l, bcl-2, bcl-xl, dad I) e ativadores (bax, bad, caspases) de apoptose (TORRES; VARGAS, 2003). Com estas descobertas em animais, buscou-se esclarecer a existência de possíveis elementos homólogos em plantas. Foram então descobertos mutantes, denominados disease lesion mimics, que apresentavam lesões com aparência típica de HR (MITTLER, 1998; DANGL; DIETRICH; THOMAS, 2000). Estas mutações parecem ocorrer em genes de planta que controlam PCD, resultando na ativação ou supressão deste evento. Disease lesion mimics foram isolados de tomate, milho, arroz, cevada e Arabidopsis, sendo caracterizados como mutantes de iniciação, que desenvolvem lesões espontâneas com um limite definido ou de propagação. Acredita-se que mutantes de iniciação sejam desprovidos de regulação da ativação da morte celular, mas não na inibição no limite da lesão. Em consequência, a lesão inicia-se espontaneamente devido à mutação, mas será uma lesão com um limite definido, como observado em cevada (gene mlo) (MITLER, 1998; DANGL; DIETRICH; THOMAS, 2000).

O estudo destes mutantes, específicos de plantas, é de grande relevância para a compreensão da PCD em vegetais. A clonagem destes genes foi a primeira evidência concreta da existência de genes que regulam a morte celular em plantas. Lacomme; Santa Cruz (1999) descreveram que o gene *bax*, regulador pró-apoptótico da família de genes *bcl-2* em animais, expresso em tabaco com a utilização de um vetor viral, foi capaz de induzir fenótipos típicos de HR, e análises mutacionais mostraram que a mitocôndria é provavelmente o sítio alvo de *bax* em plantas.

O inibidor de *bax* de animais (*bl-1*) é supressor de morte celular e possui homólogos em vegetais. Em células de arroz, tratadas com extrato de *Magnaporthe grisea*, analisadas por meio da técnica de SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), a expressão de *bl-1* foi reprimida. Além disso, células de arroz transgênicas superexpressando o gene *bl-1* sobreviveram quando tratadas com elicitor de *M. grisea* (MATSUMURA et al., 2003). Análise da expressão de genes durante a morte celular por meio de microarranjo, identificou os homólogos *bax-inhibitor 1* e 2 em *Arabidopsis* (SWIDZINSKY; SWEETLOVE; LEAVER, 2002).

O gene Bax-inhibior-1 foi primeiramente identificado em bibliotecas de cDNA de humanos como um supressor da morte celular induzida pela proteína pró-apoptótica Bax em levedura (XU; REED, 1998). Bax-inhibitor-1 é um supressor da morte celular melhor caracterizado e muito conservado entre plantas e animais (HÜCKELHOVEN, 2004; WATANABE; LAM, 2009). A superexpressão de Bax-inhibior-1 resultou na proteção contra apoptose induzida por certos tipos de estímulos em células de mamíferos, ao passo que a baixa regulação de Bax-inhibior-1 pela construção antisenso promoveu apoptose de algumas linhagens de tumor (XU; REED, 1998). Subsequentemente, Bax-inhibitor-1 de arroz e Arabidopsis foram isolados e mostrou ser uma proteína evolutivamente conservada que, quando superexpressa em leveduras e plantas, suprime a morte celular induzida por Bax de mamíferos (KAWAI et al., 1999; KAWAI-YAMADA et al., 2001). Logo, os homólogos de Bax-inhibior-1 de muitas espécies de plantas incluindo Arabidopsis, tabaco, nabo, cevada, canola, couve e arroz foram clonados e caracterizados (KAWAI et al., 1999; SANCHEZ; TORRES ZEBALA; GRANT, 2000; KAWAI-YAMADA et al., 2001; BOLDUC; BRISSON, 2002; BOLDUC et al., 2003; HÜCKELHOVEN; DECHERT; KOGEL, 2003; MATSUMURA et al., 2003; COUPE et al., 2004; KAWAI-YAMADA; OHMORI; UCHIMUYA, 2004; ISHIKAWA et al., 2011).

O homólogo de Bax-inhibior-1 de Arabidopsis thaliana, AtBI-1, suprime a morte celular mediada por Bax e H₂O₂ em leveduras, animais e plantas (KAWAI-YAMADA et al., 2001; CHAE et al., 2004; KAWAI-YAMADA; OHMORI; UCHIMUYA, 2004). AtBI-1 é uma proteína citoprotetora de aproximadamente 27 kDa, com 6 domínios transmembrana potenciais, e um domínio C-terminal altamente conservado que contém uma região de ligação para calmodulina, afetando a homeostase de cálcio na regulação da morte celular (KAWAI-YAMADA; OHMORI; UCHIMUYA, 2004; IHARA-OHORI et al., 2007). Esta proteína está localizada principalmente na membrana do retículo endoplasmático (RE) [XU; REED, 1998; LAM; KATO; LAWTON, 2001; BOLDUC et al., 2003; HÜCKELHOVEN; DECHERT; KOGEL, 2003; KAWAI-YAMADA; OHMORI; UCHIMUYA, 2004]. O gene Bax-inhibitor-1 de planta é expresso em vários tecidos e seu nível de expressão é aumentado durante a senescência e sob vários tipos de estresses bióticos e abióticos (SANCHEZ; TORRES ZEBALA; GRANT, 2000; BOLDUC et al., 2003; MATSUMURA et al., 2003; DECHERT; KOGEL, 2003; HÜCKELHOVEN; KAWAI-YAMADA; OHMORI: UCHIMUYA, 2004). Estudos genéticos, moleculares e bioquímicos sugerem uma visão consistente de que Bax-inhibitor-1 é uma proteína transmembrana residente no retículo endoplasmático (RE) que pode interagir com múltiplos parceiros para alterar o controle do fulxo intracelular de Ca^{2+} e a dinâmica de lipídios (ISHIKAWA et al., 2011).

2.6. Moniliophthora perniciosa x morte celular

Em todos os órgãos infectados, a necrose dos tecidos é um dos sintomas mais importante na interação *T. cacao* x *M. perniciosa* (PURDY; SCHMIDT, 1996; ANDEBRHAN et al., 1999; SILVA et al., 2002). Algumas das alterações bioquímicas que ocorrem nos tecidos infectados foram descritos por Scarpari et al. (2005), sendo observados alterações no teor dos açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose), asparagina e alcalóides (cafeína e teobromina), etileno e taninos. As observações nas alterações bioquímicas associadas com a infecção sugerem, na primeira fase, a planta utiliza mecanismos não específicos para tentar eliminar o fungo, tais como o aumento de alcalóides, fenólicos e taninos. No entanto, estes mecanismos parecem não ser suficientes para evitar a infecção e um número de alterações bioquímicas, tais como aumento dos níveis de etileno, asparagina, açúcares, e malondeialdeído (MDA); alterações no perfil dos ácidos graxos e redução dos aminoácidos e pigmentos, sugerindo que uma cascata de eventos foi acionada para causar a morte do tecido infectado (SCARPARI et al., 2005)

Essas informações foram usadas para desenvolver um meio artificial para manter o fungo na fase biotrófica (MEINHARDT et al., 2006). Foi o primeiro relato de crescimento e manutenção do fungo *M. perniciosa* na fase monocariótica em meio de cultura contendo metabólitos (glicerol) encontrados no tecido doente, sugerindo que o glicerol pode ser um componente chave para esta interação, pois não permite a dicariotização do micélio obtido a partir de basidiósporos, mas ainda não demonstrou ser infectivo. Isto foi uma importante descoberta para a compreensão da biologia do fungo durante a fase infecciosa da vassoura-de-bruxa (MEINHARDT et al., 2006).

Análises bioquímicas em tecidos de *T. cacao* infectados com *M. perniciosa* demonstraram aumento nos níveis de diversos compostos, incluindo o hormônio etileno no início da infecção (SCARPARI et al., 2005). Além disso, sabe-se que fungo *Moniliopthora perniciosa* possui em seu genoma a presença dos chamados NLPs (*Nep1-like proteins*), que são peptídeos que funcionam como elicitores aptos a induzir a

planta produzir etileno e causar a necrose nos tecidos do cacaueiro (GARCIA et al., 2007). Dessa forma, concentrações ou níveis elevados de etileno demonstram importância no desenvolvimento de sintomas da vassoura-de-bruxa.

No trabalho de Ceita et al. (2007), foi demonstrado que o processo infectivo de M. perniciosa em cacaueiro leva ao desencadeamento de um evento de morte celular programada, sendo que há um aumento gradativo deste evento durante o desenvolvimento da doença. Os resultados de análise de fragmentação de DNA por eletroforese em gel de garose foi consistente 0 resultado de obtido com fragmentação pelo TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick end labeling), sendo possível diagnosticar um padrão de degradação do DNA crescente ao longo do desenvolvimento da infecção, sendo que em células de meristemas não infectadas não houve qualquer indício de fragmentação do DNA (CEITA et al., 2007). Também foi observado a presença de cristais de oxalato de cálcio em células do tecido de cacaueiro infectado com M. perniciosa ao longo do desenvolvimento da doença, sendo que no estágio terminal de degeneração tecidual (90 dias) foi observada uma maior concentração de cristais na área (CEITA et al., 2007).

Segundo Ceita et al. (2007), a colonização do hospedeiro pelo patógeno apresenta combinações sucessivas de sintomas, começando pelo crescimento hipertrófico e a formação da "vassoura", seguido pela degeneração do tecido e sua morte. Scarpari et al., (2005) demonstrou que, durante a transição de M. perniciosa das fases biotrófica a necrotrófica nos tecidos infectados, aminoácidos foram convertidos em amidas. Este processo de conversão seria um sinal fisiológico para a indução de PCD (DANGL; DIETRICH; THOMAS, 2000) e que poderia ser interpretada como um esforço fisiológico da planta em mobilizar nutrientes dos tecidos degenerados. Assim, a análise microscópica revelou o crescimento inicial do fungo biotrófico intercelular, seguido pelo crescimento intracelular associado com a presença de um aumento no número de núcleos apoptóticos do hospedeiro e cristais de oxalato de cálcio, com subsequente acúmulo de peróxido de hidrogênio e a morte celular (CEITA et al., 2007). Paralelamente, foram identificadas proteínas de M. perniciosa capaz de induzir a morte celular em cacau (GARCIA et al., 2007). Khanna et al. (2007), utilizando suspensões celulares embriogênicas de banana e cana-de- açúcar transformadas com A. tumefaciens contendo genes anti-apoptóticos, sugeriram que estes genes poderiam inibir os fenômenos de PCD e aumentar a frequência de transformação. Com isso, é possível sugerir que a utilização destes genes anti-apoptóticos poderia diminuir ou minimizar os efeitos da infecção de *M. perniciosa* em cacau, permitindo uma menor susceptibilidade, além de um suposto aumento da eficiência na transformação mediada por A. tumefaciens.

3. OBJETIVOS

- Clonagem e obtenção da construção do gene da proteína *Bax-inhibitor-1*, que atua como atenuador basal para a progressão da morte celular, detectado numa biblioteca da interação *M. perniciosa* x *T. cacao*, e identificado com sequência completa, sendo re-introduzido sob controle de promotor constitutivo e avaliado para seu efeito na susceptibilidade à vassoura-de-bruxa.

- Transformação de tomateiro, como modelo genético, usado no estudo da interação com o fungo *M. perniciosa*, visto a disponibilidade de isolados do biótipo-S que infectam o tomateiro (*Solanum lycopersicum*).

- Indução de morte celular com tunicamicina nos controles e transgênicos de tomateiro contendo o gene *Bax-inhibitor-1*.

- Inoculação de *M. perniciosa* nos transgênicos contendo o gene *Bax-inhibitor-1* para avaliar seu efeito na susceptibilidade à vassoura-de-bruxa.

- Inoculação dos fungos necrotróficos: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* e *Botrytis cinerea* nos transgênicos contendo o gene *Bax-inhibitor-1* para avaliar o efeito na morte celular.

- Otimizar a obtenção da embriogênese somática de cacaueiro e sua subsequente transformação genética, visando selecionar materiais para servirem de plataforma para análise funcional de genes presumíveis de resistência ou de defesa.

- Clonagem e obtenção da construção do promotor *SKP1* de cacaueiro, detectado numa biblioteca da interação *M. perniciosa* x *T. cacao*, quando demonstrou ser induzido pela infecção com *M. perniciosa*, e codifica proteína similar a ubiquitina ligase subunidade E3 do complexo SCF. A ser testado para indutibilidade por inoculação artificial com *M. perniciosa*.

- Clonagem e obtenção da construção do promotor cafeína sintase de cacaueiro, que demonstrou ser indutível pela infecção com *M. perniciosa*. A ser testado para indutibilidade por inoculação artificial com *M. perniciosa*.
4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório do Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal (ESALQ/USP) e no Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, SP.

4.1. Construção dos vetores para expressão nas plantas de tomateiro e cacaueiro

4.1.1. Bax-inhibitor-1

Foi clonado o gene que codifica a proteína *Bax-inhibitor-1*, que atua como atenuador basal para a progressão da morte celular, e desenvolvida uma construção. Esse gene havia sido detectado numa biblioteca da interação *M. perniciosa* x *T. cacao* e identificado com sequência completa (GESTEIRA et al., 2007), e foi re-introduzido em dois sistemas (tomateiro e cacaueiro) sob controle de promotor constitutivo e foi avaliado para seu efeito na susceptibilidade a infecção por *M. perniciosa*. O sistema de expressão utilizado foi o *Gateway* (Invitrogen), no qual o segmento de DNA é transferido entre os vetores mediante recombinação sítio-específica baseado no fago λ , utilizando uma mistura de recombinases.

4.1.1.1. Desenho de iniciadores

O gene da proteína Bax-inhibitor-1 foi detectado numa biblioteca de fruto em desenvolvimento do genótipo 'Scavina 6' (emb|cu474721|) [ARGOUT et al., 2008]. Para clonagem, foram desenhados iniciadores específicos para o gene Bax-inhibitor-1. Para isso foi Primer3 (<u>http://fokker.wi.mit.edu/primer3/</u>) e utilizado 0 programa *NetPrimer* (http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html) para verificação da estabilidade dos iniciadores Os iniciadores específicos

(F 5'- ATGGACGCGTTCTCTTCGTTC -3'; R 5'- GTCACTCCGCTCCTTCTTCTT -3') para o gene *Bax-inhibitor-1* de cacaueiro foram projetados para amplificar fragmento de aproximadamente de 850 pb.

4.1.1.2. PCR para clonagem de Bax inhibitor-1 de cacaueiro

A partir da amostra de cDNA de meristemas de cacau 'CAB 214' tratado com etileno foi conduzida a amplificação de *Bax-inhibitor-1* utilizando 1 μ L de cDNA; tampão da enzima PCR *High Fidelity Buffer*; 0,2 mM de dNTPs; 2 mM de MgSO₄; 0,2 μ M de cada *primer* específico; 2 U de *Platinum Taq* DNA Polimerase *High Fidelity* (Invitrogen), em reação de 25 μ L. As etapas da amplificação consistiram de desnaturação inicial a 94°C por 2 min; seguida de 40 ciclos a 94°C por 30 s; 50°C por 30 s e 72°C por 60 s; e extensão final de 72°C por 7 min. O fragmento obtido foi analisado por eletroforese em gel de 1% agarose em tampão 1X SB (10 mM NaOH ph 8,5; ajustado com ácido bórico) [BRODY; KERN, 2004]. A cada uma das amostras foi adicionado um volume adequado de tampão de carregamento (0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol; e 15% ficol tipo 400-DL) corados com *SYBR Gold nucleic acid gel stain* (Molecular Probes) e visualizado por iluminação UV. A aquisição da imagem do gel foi adquirida com câmera digital e processada com o programa Kodak Digital Science 1D (Kodak, Japão).

4.1.1.3. Purificação do fragmento e clonagem no vetor de entrada

O produto da amplificação do tamanho de interesse (~850 pb) foi purificado do gel utilizando o kit *GFX Gel Band Purification* (Amersham Biosciences). Verificou-se a integridade do produto purificado, submetendo o mesmo a eletroforese em gel de 1% agarose em tampão 1X SB. Após a purificação, o fragmento foi clonado no vetor de entrada do sistema Gateway utilizando o kit pCR8/GW/TOPO TA *Cloning* (Invitrogen; Figura 1). A clonagem do fragmento neste vetor de entrada torna possível sua transferência em seguida

para vetores de destino também do tipo *Gateway* (Invitrogen). A reação de ligação contou com o produto amplificado purificado, solução salina diluída (0,3 M NaCl; 15 mM MgCl₂) e o vetor pCR8, num volume final de 6 μ L, sendo foi incubada por 10 min em temperatura ambiente. Em um tubo de 1,5 mL, contendo 40 μ L de células eletrocompetentes de *E. coli* da cepa TOP10, foi adicionado 2 μ L da reação de ligação. Após ligeira homogeneização, a mistura de células e DNA foi transferida para uma cubeta de eletroporação (0,1 μ m), previamente resfriada no gelo. A mesma foi colocada no eletroporação (Micropulser, BIO-RAD) e um pulso de corrente elétrica de 1,8 kV foi aplicado. Imediatamente, foi adicionado à cubeta, 1 mL de meio SOC (2% triptona; 0,5% extrato de levedura; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄ filtro-esterilizados; 20 mM glicose filtro esterilizada; pH 7,0). Após breve mistura, o conteúdo da cubeta foi transferido para um novo tubo e incubado a 37°C por 1 h. As células foram plaqueadas em meio sólido LB (Luria-Bertani, composto de 10 g L⁻¹ triptona, 5 g L⁻¹ extrato de levedura e 10 g L⁻¹ NaCl) contendo espectinomicina (100 mg L⁻¹). As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 12-16 h.



Figura 1 - Vetor pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) utilizado para receber o fragmento de cDNA amplificado pela reação de PCR

4.1.1.4. Minipreparação de DNA plasmidial

Depois desse período, colônias foram selecionadas e colocadas em tubos contendo 5 mL de meio LB contendo espectinomicina (100 mg L⁻¹). Após cultivo a 37°C, em agitador orbital a 120 rpm por 16 h, a cultura líquida foi transferida para tubos novos de 1,5 mL e centrifugadas a 16.000 g por 1 min. Descartado o sobrenadante, o procedimento foi repetido mais uma vez, usando-se o mesmo tubo para aumentar o rendimento da minipreparação. Em seguida, o precipitado de células foi totalmente ressuspenso em 200 µL de solução I (50 mM glicose; 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA) com forte agitação, sendo incubado em temperatura ambiente por 10 min. O próximo passo foi adicionar 200 µL de solução II [0,2 M NaOH; 1,0% dodecil sulfato de sódio (SDS)], misturando por inversão e sendo incubado em temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, foram acrescentados 150 µL de solução III (3 M acetato de potássio pH 5,5), misturando-se por inversão e incubando no gelo por 5 min. Centrifugou-se por 10 min a 16.000 g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novo tubo, ao qual foram adicionados 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) gelado, misturado por inversão e novamente centrifugado por 5 mim a 16.000 g. Após a centrifugação, a fase superior aquosa foi transferida para outro tubo e adicionado 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), misturado por inversão e novamente centrifugado por 5 min a 16.000 g. A nova fase superior foi coletada e transferida para novo tubo, ao qual foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado, sendo misturado por inversão e mantido a -20°C por 30 min, seguido-se de centrifugação a 16.000 g por 15 min a 4°C. Em seguida o etanol foi descartado e o precipitado formado foi lavado com 500 µL de álcool 70% gelado, submetido a centrifugação a 16.000 g por 5 min a 4°C. O tubo foi mantido em temperatura ambiente até que a amostra secasse. Posteriormente, as amostras foram ressuspendidas em 50 µL de TE com ribonuclease A (RNAse A), na concentração de 50 µg mL⁻¹, e incubadas a 37°C por 15 min. O DNA plasmidial foi verificado por eletroforese em gel de 0,8% agarose em tampão 1X SB. A quantificação de DNA foi realizada com leitura de amostra em fluorômetro Hoefer DyNA Quant 200 (Hoefer).

4.1.1.5. Confirmação de clonagem por restrição enzimática e sequenciamento de DNA

Para confirmação da presença do inserto, foram realizadas digestões duplas sequenciais com as enzimas de restrições BglII e EcoRV para liberação do inserto. A reação foi iniciada a partir de 1 µg de DNA plasmidial, 1 U da enzima BglII, 1X tampão adequado, 50 ng μ L⁻¹ albumina do soro bovino (BSA) e água Milli-Q autoclavada em volume de 20 μ L, em banho-maria a 37°C por 1 h. Após o período de incubação, as amostras foram submetidas a precipitação. Para isso, foram adicionados 10 µL de acetato de amônio 7,5 M e 85 µL de etanol absoluto gelado nas amostras. Os tubos foram mantidos a -20°C por 1 h. Após esse período, a mistura foi centrifugada por 15 min a 16.000 g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de etanol 70 % gelado a amostra, sendo misturado por inversão. Centrifugou-se novamente a 16.000 g a 4 °C por 5 min. O etanol foi descartado e as amostras foram incubadas a 37°C por 10 min para a secagem. As amostras foram ressuspendidas com 10 µL de água MQ autoclavada e, assim, iniciada a segunda reação de digestão enzimática. A segunda reação continha com o DNA plasmidial digerido com BglII e precipitado, 1 U da enzima EcoRV, 1X tampão adequado e água Milli-Q autoclavada em volume de 20 µL, em banho-maria a 37°C por 1 h. O resultado da digestão foi analisado por eletroforese em gel de 1,5% agarose em tampão 1X SB, misturando as amostras um volume adequado de tampão de carregamento contendo SYBR Gold nucleic acid gel stain.

Os plasmídeos positivos para a presença de inserto foram então sequenciados utilizando kit *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences). A reação se sequenciamento consistiu de 100-150 ng de DNA, 1x tampão *save* \$, 1,0 μ L *mix kit*, 0,25 μ M oligonucleotídeo produzidos no presente trabalho e água Milli-Q autoclavada para volume final de 10 μ L. A reação foi submetida a 95°C por 20 s, 50°C por 15 s, 60°C por 1 min (30 ciclos) em termociclador. Posteriormente, as amostras foram submetidas a precipitação. Para isso, foram adicionados 80 μ L de 65% isopropanol, seguindo-se com leve agitação. A mistura foi incubada em temperatura ambiente, no escuro, por 15 min. Centrifugou-se a 16.000 *g* por 30 min. O sobrenadante foi descartado com auxílio de micropipeta. Foi adicionado 150 μ L de 60% etanol gelado, seguido de nova centrifugação por 15 min. Novamente o sobrenadante foi descartado e, então, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente, no escuro, por 1 h e, em seguida, armazenadas a -20°C até o

sequenciamento. Para carregamento no sequenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems), a cada tubo foram acrescentados 10 µL de formamida, seguindo-se com agitação (Laboratório de Biotecnologia Animal, ESALQ/USP). As sequências obtidas pelo sequenciamento foram analisadas por Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para verificar similaridade com os dados depositados no NCBI e banco do do CIRAD no genoma cacau (http://cocoagendb.cirad.fr/gbrowse/tools.html). Após a confirmação de clonagem do Bax-inhibitor-1 no vetor de entrada, por digestão e sequenciamento, foi realizada a reação de recombinação para os plasmídeos binários.

4.1.1.6. Recombinação do inserto para os vetores binários Gateway

Foi realizada a transferência do inserto *Bax-inhibitor-1* via recombinação para os vetores de destino *Gateway*, os plasmídeos pMDC32 e pK7WG2D (Figuras 2 e 3), binários para *A. tumefaciens* para transformação de plantas (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002; CURTIS; GROSSNIKLAUS, 2003).

4.1.1.6.1. Vetor binário pMDC32

O vetor pMDC32 permite a recombinação e inserção de gene a ser regulado pelo promotor constitutivo 2X 35S, selecionado por conter o gene de seleção em plantas higromicina (Figura 2). A reação de transferência do inserto continha 150 ng do vetor de entrada pCR8 contendo inserto; 150 ng do vetor de destino pMDC32 e *Gateway LR Clonase II Enzyme Mix*. A reação foi incubada em temperatura ambiente por 1 h, e em seguida, foi adicionada 1 μ L de solução de proteinase K (2 μ g μ L⁻¹), incubada por 10 min a 37°C para a degradação das proteínas. Bactérias da cepa de TOP10 de *E. coli* foram eletroporadas com o produto resultante da reação de recombinação. Para confirmação da transferência do inserto do vetor de destino, colônias positivas foram crescidas em meio LB

contendo kanamicina para produzir o plasmídeo pMDC32::*Bax-inhibitor-1*, que foram purificados por lise alcalina, e usados em duas reações de digestão com as enzimas de restrição *XbaI*, *BglII* e *Eco*RV, sendo posteriormente sequenciado. Plasmídeos positivos contendo o inserto foram então eletroporados em células de *Agrobacterium* LBA4404 e EHA105.



Figura 2 - Mapa do vetor pMDC32 (CURTIS; GROSSNIKLAUS, 2003), destinado a formação de vetor de destino para transformação de plantas sob controle de promotor constitutivo 35S

4.1.1.6.2. Vetor binário pK7WG2D

O mesmo vetor de entrada contendo *Bax-inhibitor-1* foi usado para a construção de um segundo vetor a partir do vetor binário pK7WG2D (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002) por possuir gene de resistência a kanamicina para seleção em plantas, mais apropriado para o protocolo estabelecido para tomateiro (PINO et al., 2010). A expressão do gene de interesse nesse vetor é regulada pelo promotor constitutivo 35S. A reação de recombinação do inserto continha 23 ng do vetor de entrada pCR8*::Bax-inhibitor-1*, 169 ng do vetor de destino pK7WG2D e 2 µL de *Gateway LR Clonase II Plus mix*. A reação foi incubada a 25°C por

16 h. Após esse período, foi adicionado 1 μ L de solução de proteinase K (2 μ g μ L⁻¹) e incubado por 10 min a 37°C. Bactérias da cepa de TOP10 de *E. coli* foram eletroporadas com o produto resultante da reação de recombinação.

Para a confirmação da transferência do inserto do vetor de entrada para o vetor de destino, colônias positivas foram crescidas em meio LB contendo espectinomicina (100 mg L⁻¹) para produzir o plasmídeo pK7WG2D::*Bax-inhibitor-1*, que foram purificados por lise-alcalina e usados em reações de digestão com as enzimas de restrição *Spe*I e *Nhe*I, sendo posteriormente sequenciado. Após a confirmação de clonagem, o plasmídeo pK7WG2D::*Bax-inhibitor-1* foi usado para eletroporar células eletrocompetentes de *Agrobacterium* LBA4404 e EHA105.



Figura 3 - Mapa do vetor pK7WG2D (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002), destinado a formação de vetor de destino para transformação de plantas sob controle de promotor constitutivo 35S

4.1.1.7. Introdução das construções em A. tumefaciens

As duas construções contendo o gene de interesse, pMDC32::Bax-inhibitor-1 e pK7WG2D::Bax-inhibitor-1, foram eletroporadas em duas estirpes de Agrobacterium LBA4404 e EHA105, as quais foram utilizadas na transformação de plantas. Em condições assépticas, em um tubo contendo 40 µL de células eletrocompetentes de A. tumefaciens LBA4404 ou EHA105, foi adicionado 2 µL da miniprep, e transferidas para uma cubeta de eletroporação. Imediatamente após o pulso, foi adicionado a cubeta 1 mL de meio SOC, sendo a mistura incubada, sob agitação de 120 rpm por 2 h a 28°C. O volume de 100 µL foi plaqueado em meio LB sólido contendo rifampicina (100 mg L^{-1}) e kanamicina (100 mg L^{-1}) para a construção pMDC32::Bax-inhibitor-1, e rifampicina (100 mg L⁻¹) e espectinomicina (100 mg L⁻¹) para a outra construção pK7WG2D::Bax-inhibitor-1. As placas foram incubadas durante 2 a 3 dias a 28°C. Depois desse período, colônias foram selecionadas e crescidas em meio LB com os antibióticos necessários, para que fosse realizada a mini-preparação por lisealcalina e amplificação da cultura crescida overnight. Para confirmar a presença do plasmídeo pMDC32::Bax-inhibitor-1 foi realizada reação de digestão utilizando a enzima de restrição EcoRV. A presença da construção pK7WG2D::Bax-inhibitor-1 foi demonstrada por amplificação usando os iniciadores específicos de Bax-inhibiotr-1 a partir de culturas crescidas overnight. Para tal, um µL da cultura crescida foi diluído a 10 µL de H₂O MiliQ autoclavada e aquecido por 10 min a 95°C em termociclador. A reação de amplificação foi preparada com 2,5 µL de tampão 10 X da enzima; 2 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP; 0,2 µM de cada primer especifico; 1 U de Taq DNA Polymerase (Fermentas), em reação de 25 µL. A reação foi submetida à programação térmica de 2 min a 94°C; seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 s; 50°C por 30 s; 72°C por 1 min, e extensão final de 7 min a 72°C. O fragmento obtido foi analisado por meio de eletroforese em gel 1,5% agarose em tampão 1X SB.

4.1.2. Clonagem do promotor do gene SKP1 de cacaueiro

O gene *SKP1* foi detectado numa biblioteca da interação *M. perniciosa* x *T. cacao* (EH057769.1; LEAL JR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007), quando demonstrou ser induzido pela infecção com *M. perniciosa*, e codifica proteína similar a ubiquitina ligase subunidade E3 do complexo SCF, que gerou a sequencia NCBI UniGene Tcc.2492 de *T. cacao*. Para a clonagem do promotor de *SKP1* a ser testado para indutibilidade por inoculação artificial com *M. perniciosa*, foi empregada abordagem de *Genome Walking* (ZHANG et al., 2000).

Para a abordagem de *Genome Walking* (ZHANG et al., 2000), um μ g de DNA genômico de 'CAB 214' foi digerido com as enzimas *Nhe*I, *Spe*I e *Xba*I separadamente compondo 3 bibliotecas. Em cada população de DNA digerido, foram acoplados os adaptadores *Pad1* e *PPR1*, utilizando a enzima T4 DNA ligase, e a reação foi conduzida a 12°C por 60 min e 25°C por 20 min por 6 ciclos, seguido de 8°C por 120 min. A enzima foi inativada aquecendo a reação a 70°C por 6 min. As distintas bibliotecas de DNA digerido foram diluídas para 5 ng μ l⁻¹ e com alíquotas destas diluições foram conduzidas amplificações.

Para obter o fragmento que incluía a região 5' do gene foi utilizada nas duas etapas de reações de PCR (denominadas de PCR-1 e PCR-2) a combinação do iniciadores geneespecífico SKP1-R1 (TGCCGTTATCGGCGCAATCG) contra o iniciador *PP1* no PCR-1 e no PCR-2 a combinação do mesmo SKP1-R1 com *PP2* (ZHANG et al., 2000). A reação de PCR-1 foi conduzida nas seguintes condições: 94°C a 2 s e 72°C a 3 min por 3 ciclos; 94°C a 2 s e 70°C a 3 min por 3 ciclos; 94°C a 2 s e 68°C a 3 min por 3 ciclos; 94°C a 2 s, 66°C a 20 s, 68°C a 3 min por 26 ciclos e 68°C for 8 min. Os produtos da PCR-1 foram diluídos 40 vezes, e uma alíquota foi utilizada para realizar uma segunda reação para amplificações de fragmentos denominado PCR 2, nas mesmas condições do PCR-1. Os produtos do PCR-1 e PCR-2 foram submetidos à eletroforese em gel de 1,2 % agarose e os fragmentos maiores obtidos do PCR-2 foram purificados do gel utilizando o kit de purificação *GFX PCR DNA* (Amersham) e para a clonagem foi utilizado o vetor pGEM-T Easy (Promega). Essas clonagens foram eletroporadas em células eletrocompetentes de *E. coli* TOP 10 e submetidas a extração do DNA plasmidial. Colônias brancas positivas foram então sequenciadas. Após analisar as sequencias obtidas, foram desenhados dois iniciadores no sentido senso (SKP1-F1g e SKP1-F2g), que amplificaram conjuntamente com o mesmo reverso (SKP1-Rg), fragmentos de cerca de 900 ou 600 pb, respectivamente.

4.1.2.1. Clonagem do promotor do gene *SKP1* de cacaueiro em vetor binário de transformação de plantas

Para clonagem em vetor binário de transformação de plantas foi empregado o sistema Gateway. Para tal, dois iniciadores específicos no sentido senso foram desenhados para amplificar SKP1-F1g а região promotora, sendo 0 primer (AGAACTGGTGCTAAAGATTGC) junto com 0 primer reverso SKP1-Rg (CGTTTTCGCTATCGAATTCTTC) produzindo um fragmento de cerca de 900 pb, enquanto que o primer senso SKP1-F2g (GAATCAAGAAGGGATGACTTC) junto com o mesmo SKP1-R produziu um fragmento de cerca de 600 pb, para obter a sequencia completa do promotor SKP1. Amostras de DNA genômico de 'CAB 214' e 'ICS 39' foram amplificadas em reações com volume final de 25 µL, contendo 20 ng de DNA; 1,5 mM MgSO4; 100 µM de cada dNTP; 0,2 µM de cada iniciador; e 1 U Platinum High Fidelity Taq DNA Polimerase (Invitrogen). A amplificação ocorreu com ciclo inicial de 94°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 40 s, 58°C por 40 s e 72°C por 1 min e 30 s, finalizando a 72°C por 7 min quando foi adicionado 1 μ L de *Taq* polimerase comum e 1 μ L de dATP (10 mM) em cada amostra. Os fragmentos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de 1,2% agarose em tampão 1X TAE (50X TAE: 242 g de Tris base; 57,1 mL de ácido acético glacial; 100 mL de 0,5 M EDTA, pH 8,0), e o tamanho dos fragmentos foi inferido por comparação com a migração de marcadores de peso molecular. Os fragmentos de interesse foram recortados e purificados utilizando PureLinkQuick Gel Extraction Kit (Invitrogen). O DNA purificado foi visualizado em gel de 1,2% agarose.

Após a purificação, o fragmento de DNA obtido foi clonado no vetor de entrada pCR8 (Figura 1). Para a clonagem do promotor *SKP1-CAB* e *SKP1-ICS* no vetor, foi utilizado o produto purificado de cada DNA; solução salina diluída; vetor pCR8, num volume final da ligação de 6 μ L, que foi incubada por 5 min em temperatura ambiente. As reações de ligação foram usadas para transformar bactérias da cepa TOP10 de *E. coli* por eletroporação.

As colônias positivas foram crescidas em meio LB contendo espectinomicina (100 mg L⁻¹) para purificação dos plasmídeos contendo o fragmento de DNA de interesse por As amostras de DNA foram quantificadas por fluorometria usando o lise-alcalina. fluorômentro Hoefer DyNa Quant 200. Os plasmídeos foram então digeridos com enzimas de restrições específicas, usando 1 µg de amostra de DNA; 1 U da enzima, 1X tampão da enzima em volume final de 20 µL. Foram empregadas as enzimas RsaI para digerir as duas construções de forma a evidenciar clonagem e direcionamento do inserto, enquanto que a combinação de BamHI e EcoRI foi usada apenas para o fragmento de 'CAB214', e a enzima HpaIII apenas para 'ICS39'. As reações foram conduzidas a 37°C por 1 h. Após a reação, o resultado da digestão foi analisado por eletroforese em gel de 1,5 % agarose. Após a confirmação da clonagem por digestão, as amostras foram sequenciadas com os iniciadores específicos, usando 100 ng de amostra de DNA, 2,0 µL de tampão Save\$ (2,5x), 2,0 µL de Mix Kit, 1,0 µL de primer (5 µM; SKP1-F1g e SKP1-Rg) e H₂O miliQ autoclavada para completar o volume de 10 µL. A reação de sequenciamento foi realizada em 30 ciclos de 95°C por 20 s, 50°C por 15 s e 60°C por 1 min. Após realizar a reação, as amostras foram precipitadas e encaminhadas para sequenciador ABI-3100 (Laboratório de Biotecnologia Animal, ESALQ/USP).

Após as diversas etapas de confirmação de clonagem (sequenciamento e digestão), foi conduzida a transferência do inserto maior (*ca.* 900 pb) contendo o promotor *SKP1* via recombinação para o vetor Gateway binário de destino pKGWFS7, que possui como gene de seleção em plantas a resistência a kanamicina e genes repórteres *uidA* (GUS) e *gfp* sob o controle do fragmento clonado (Figura 4). As reações de recombinação continham 25 ng do vetor de entrada pCR8::*SKP1-CAB* ou pCR8::*SKP1-ICS*, 168 ng do vetor de destino pKGWFS7 e 2 μ L de *Gateway LR Clonase II Plus mix*. As reações foram incubadas a 25°C por 16 h. Após esse período, foi adicionado 1 μ L de solução de proteinase K (2 μ g μ L⁻¹) e incubado por 10 min a 37°C. Bactérias da cepa de DB3.1 de *E. coli* foram eletroporadas com o produto resultante da reação de recombinação.

Para a confirmação da transferência do inserto do vetor de entrada para o vetor de destino foram conduzidos ensaios de digestão e sequenciamento. Colônias positivas foram crescidas em meio LB contendo espectinomicina (100 mg L⁻¹) para produzir o plasmídeo pKGWFS7::*SKP1-CAB* ou pKGWFS7::*SKP1-ICS*, que foram purificados por lise-alcalina, quantificadas e usados em reações de digestão com a enzima de restrição *Dra*I para confirmar a presença do inserto. Os plasmídeos positivos foram sequenciados utilizando *primer*

específico senso ou antisenso. As sequências obtidas foram analisadas por BLAST. Após a confirmação de identidade dos novos plasmídeo formados pKGWFS7::*SKP1-CAB* e pKGWFS7::*SKP1-ICS* foram eletroporadas em células da cepa de *A. tumefaciens* EHA105, para serem utilizadas na transformação genética de tomateiro.



Figura 4 - Mapa do vetor pKGWFS7 (KARIMI; INZÉ; DEPICKER, 2002), destinado a formação de vetor de destino para transformação de plantas para análise de promotor

4.1.3. Busca do promotor do gene presumível da cafeína sintase de T. cacao e clonagem

Com o intuito de clonar e caracterizar a região promotora do gene cafeína sintase de *T.cacao* (EH057645.1; LEAL JR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007), que demonstrou ser indutível pela infecção com *M. perniciosa* (LEAL JR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007), foram desenhados três conjuntos de iniciadores (Tabela 1) com a ajuda dos programas *OligoPerfect* e *NetPrimer*, e foram utilizados para amplificação empregando como molde DNA genômico dos acessos considerados resistentes ('CAB 214'; 'CAB 208'; 'SCA6') e de dois susceptíveis ('ICS39' e 'PA195'). Os produtos de amplificação obtidos foram clonados no vetor de entrada pCR8 na cepa de *E. coli* TOP10.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para amplificação da provável região promotora da cafeína sintase
presumível de *Theobroma cacao* tendo como base a sequência do locus *Tc10_g001800*
com os tamanhos dos fragmentos esperados.

Nome iniciador	Sequência	pb
Tc10g001800-caff-F1	5'-TAGAGGGGGGCAACTATTTTTT	648
Tc10g001800-caff-R1	5'-CAATGAGACAAAGGCAATGG	
Tc10g001800-caff-F2	5'-CCATTGCCTTTGTCTCATTG	723
Tc10g001800-caff-R2	5'-CTGTATCTGGCGTGTTGTGG	
Tc10g001800-caff-F3	5'-CCACAACACGCCAGATACAG	604
Tc10g001800-caff-R3	5'-CTTGTCCCATCGTTTTCTTTG	

4.1.3.1. Clonagem do promotor do gene presumível da cafeína sintase de *T. cacao* em vetor binário de transformação de plantas

O fragmento clonado do 'CAB 214' no vetor pCR8 foi transferido via recombinação para o vetor Gateway binário de destino pKGWFS7 (Figura 4). A reação de recombinação continha 32 ng do vetor de entrada pCR8::*CAF*, 168 ng do vetor pKGWFS7 e 2 μ L de *Gateway LR Clonase II Plus mix*. A reação foi incubada a 25°C por 16 h. Após esse período, foi adicionado 1 μ L de solução de proteinase K (2 μ g μ L⁻¹) e incubado por 10 min a 37°C. Bactérias da cepa de DB3.1 de *E. coli* foram eletroporadas com o produto resultante da reação de recombinação.

Para a confirmação da transferência do inserto do vetor de entrada para o vetor de destino foram conduzidos ensaios de digestão e sequenciamento. Colônias positivas foram crescidas em meio LB contendo espectinomicina (100 mg L⁻¹) para produzir o plasmídeo pKGWFS7::*CAF*, que foram purificados por lise-alcalina, quantificadas e usados em reações de digestão com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Not*I. Os plasmídeos positivos para a presença de inserto foram sequenciados utilizando *primer* específico senso ou antisenso. As sequências obtidas foram analisadas por BLAST. Após a confirmação de identidade dos novos plasmídeo formados pKGWFS7::*CAF* foram eletroporadas em células da cepa de *A. tumefaciens* EHA105, para serem utilizadas na transformação genética de tomateiro.

4.2. Transformação genética de tomateiro via Agrobacterium tumefaciens

4.2.1. Material vegetal

Para os ensaios de transformação genética de tomateiro empregando o gene *Bax-inhibitor-1* de cacaueiro, foram empregados os genótipos Micro-Tom (MT) e MT-*Rg1* com alta capacidade organogênica (LIMA et al., 2004; PINO et al., 2010).

4.2.2. Plasmídeos e condições de cultura de A. tumefaciens

Foi seguido o protocolo de Pino et al. (2010). Colônias de *Agrobacterium* EHA105 (pK7WG2D::*Bax-inhinitor-1*), crescidas por dois dias em placas foram inoculadas em 50 mL do meio LB suplementado com espectinomicina (100 mg L⁻¹) e rifampicina (100 mg L⁻¹), e crescidas sob agitação constante de 120 rpm a 28°C *overnight*. Após esse período, a suspensão foi colocada num tubo estéril e foi sedimentada a 1.900 rpm a 20°C por 15 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e a *Agrobacterium* ressuspendida em meio MS líquido, suplementado com sacarose (30 g L⁻¹) e a OD_{600nm} foi ajustada para 0,2-0,3; 10 min antes do co-cultivo, 100 μ M de acetosiringona foi adicionado à suspensão de *Agrobacterium*.

4.2.3. Inoculação e co-cultura

Explantes cotiledonares foram retirados de plântulas com 8 dias de idade e colocados em placas de Petri contendo meio MS suplementado com vitaminas B5; sacarose (30 g L⁻¹); 0,4 μ M de ANA; 100 μ M de acetosiringona. Uma ou duas gotas da suspensão bacteriana foram colocadas sobre os explantes. Após 10 min, a suspensão foi removida, e para a retirada do excesso de *Agrobacterium*, duas folhas de papel filtro estéril foram colocadas sobre os

4.2.4. Seleção e obtenção das plantas transformadas

Após esse período, os explantes foram transferidos para meio MS suplementado com vitaminas B5; sacarose (30 g L⁻¹); 5 μ M de BAP e antibióticos (25 mg L⁻¹ meropenem, para controle da *Agrobacterium*, e 100 mg L⁻¹ de kanamicina, para seleção das plantas) e foram mantidos em sala de luz sob fotoperíodo de 16 h a 25°C. A cada duas semanas, os explantes foram transferidos para meio de regeneração novo, suplementado com antibióticos. Quando as gemas adventícias formadas nos explantes estavam com tamanho maior que 5 mm, elas foram isoladas e transferidas para frascos contendo meio MS suplementado com os mesmos antibióticos. Os brotos foram mantidos *in vitro* até a formação de raízes e foram aclimatizados. As plantas transgênicas produzidas *in vitro* e aclimatizadas (T₀) foram autofecundadas e produziram sementes T₁. Estas sementes foram germinadas e as plântulas T₁ e T₂ com 14 dias de idade foram selecionadas borrifando solução de 400 mg L⁻¹ de kanamicina, durante 3 dias consecutivos, com observação de plantas T₂ resistentes foram consideradas homozigotas, sendo utilizadas posteriormente para teste com patógenos.

4.3. Ensaio de indução de morte celular nas plantas transgênicas de tomateiro

Plântulas de tomate controle e transgênicas foram mantidas em meio contendo ou não o antibiótico Tunicamicina (TM; Sigma) para avaliar a indução de morte celular nas raízes das plântulas. Sementes dos controles MT e MT-*Rg1*, e transgênicas MT-*Bax-inhibitor-1* (eventos #1, #2 e #3) e MT-*Rg1 Bax-inhibitor-1* foram esterilizadas por agitação em 100 mL de 30% (v/v) em água sanitária comercial (2,7% de hipoclorito de sódio), mais duas gotas de detergente comercial, durante 15 min, seguido de três lavagens com água estéril. As sementes foram germinadas em meio contendo metade dos sais MS, 1/2 da quantidade de vitaminas B5

(50 mg L⁻¹ Myo-Inositol; 0,5 mg L⁻¹ Ácido nicotínico; 5 mg L⁻¹ Tiamina HCl; 0,5 mg L⁻¹ Piridoxina HCl), 15 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar. Cerca de 60 sementes foram semeadas por frasco contendo 30 mL de meio. As culturas foram incubadas a $25 \pm 1^{\circ}$ C no escuro por 4 dias, seguido de 4 dias sob fotoperíodo de 16 h. Dez plântulas com raiz de 8 dias de idade foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL do mesmo meio líquido descrito acima suplementado com diversas combinações de tunicamicina e PBA (ácido 4-fenilbutírico; Sigma) por um período de 6 h. Os tratamentos consistiram de controle (meio sem adição de nenhum reagente), 1 mM de PBA; 0,5 μ g mL⁻¹ de TM; 1 mM de PBA + 0,5 μ g mL⁻¹ de TM. Após o período de tratamento, as raízes das plântulas foram secas em papel de filtro estéril e transferidas horizontalmente para placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura sólido na ausência desses reagentes. Essas placas foram mantidas durante cinco dias em sala de crescimento com fotoperíodo controlados, onde foram avaliadas e fotografadas. A medição do comprimento inicial e final foi realizada pelo *software* ImageJ, onde foi obtida a média do comprimento de cada tratamento.

4.3.1. Coloração histoquímica com DAB

Plântulas de tomate controle e transgênicas, que foram mantidas em meio contendo ou não o antibiótico tunicamicina, foram coloridas histoquimicamente com 3,3-diaminobenzidina (DAB; Sigma) para avaliar a indução de morte celular nas raízes. Plântulas inteiras foram transferidas para a solução contendo 1 mg ml⁻¹ DAB-HCl (pH 5,6) por 2 h em temperatura ambiente no escuro. As plântulas foram lavadas e clareadas por ebulição por 5 min em etanol 96%. Imagens foram obtidas ao microscópio estereoscópico Leica EZ4D, onde imagens digitalizadas foram obtidas (Laboratório Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas, CENA/USP).

4.4. Ensaio de inoculação de Moniliophthora perniciosa em tomateiro

4.4.1. Isolados de M. perniciosa e produção de basidiósporos

Para produção de basidiósporos de M. perniciosa do biótipo-S foram coletadas de de lobeira vassouras secas de ramos naturalmente infectados plantas (Solanum lycocarpum) obtidas em Tiradentes, Minas Gerais. As vassouras foram expostas a ciclo alternado de umidade e seca (12 h) para induzir a formação de basidiocarpos. Os basidiocarpos produzidos foram então colhidos regularmente, tiveram seus estipes removidos e foram fixados pelo píleo por gel de silicone na tampa de placas de Petri para liberação de basidiósporos sobre tampão de armazenamento (16% glicerol; 0,01M MES, pH 6,1; 0,01% Tween 20). Após 16 h, a suspensão de esporos foi coletada e armazenada em tubos criogênicos em nitrogênio líquido. A concentração de basidiósporos foi estimada em Câmara de Neubauer ao microscópio óptico Axiovert 35 (Zeiss, Jena, Alemanha).

4.4.2. Preparo das plântulas de tomateiro

Sementes dos controles MT e MT-Rg1, e das plantas transgênicas homozigotas contendo 0 gene de cacaueiro Bax-inhibitor-1 (pK7WG2D::Bax-inhibitor-1), MT-Bax-inhibitor-1 (eventos #1, #2 e #3) e MT-Rg1 Bax-inhibitor-1, foram germinadas em vasos de 250 mL contendo substrato PlantMax HT + vermiculita expandida (1:1) (detalhes em http://www.esalq.usp.br/tomato/MMTCap2.pdf). Após 14 dias da semeadura, as plântulas foram transplantadas para vasos de 150 mL com mesmo substrato. Dois dias após o transplante, as plantas foram inoculadas, com auxílio de uma micropipeta. O volume de 60 µL da suspensão de basidiósporos na concentração de 10^5 foi aplicado nas regiões meristemáticas (meristema apical e gemas axilares das folhas) de cada planta, sendo em seguida mantidas em câmara úmida por 24 h montadas com garrafas PET 600 mL cortadas.

4.4.3. Inoculação e avaliação de sintomas

As inoculações foram realizadas com isolado do biótipo-S, para caracterização sintomatológica do MT e das plantas transgênicas. Os experimentos foram delineados de forma inteiramente casualizada e continham preferencialmente 30 plantas inoculadas e cinco plantas controle não-inoculadas. A avaliação do surgimento de sintomas teve início cinco dias após a inoculação, sendo realizada a cada cinco dias até os 35 dias posteriores a inoculação. As plantas foram avaliadas periodicamente em busca de parâmetros fisiológicos que caracterizassem a resposta da interação das plantas controle (MT e MT-Rg1) e as transgênicas com o fungo *M. perniciosa*, incluindo o engrossamento da haste principal, que foi avaliada com o auxílio de um paquímetro, e o aparecimento de vassouras laterais.

4.5. Ensaio de patogenicidade de fungos necrotróficos em folhas de tomateiro

4.5.1. Isolados de fungos necrotróficos

Isolados dos fungos necrotróficos *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* foram obtidos da Clínica Fitopatológica da ESALQ/USP. Os isolados foram cultivados em meio BDA (200 g L⁻¹ Batata; 20 g L⁻¹ Dextrose e 20 g L⁻¹ ágar) mantidos em BOD a 25°C com fotoperíodo.

4.5.2. Inoculação de folhas e avaliação de sintomas

Folhas de plantas transgênicas MT-*Bax-inhibitor-1* (eventos #1, #2 e #3) e MT-*Rg1 Bax-inhibitor-1* e seus respectivos controle MT e MT-*Rg1* com sete semanas de idade foram destacadas e esterilizadas e colocadas em tubos contendo álcool 70% por 3 min e,

em seguida, transferidas para uma solução 30% (v/v) em água sanitária comercial, durante 15 min, seguido de três lavagens com água estéril. Estas folhas foram secas em papel de filtro e colocadas em placas de Petri de vidro estéril, contendo papel de filtro estéril umedecido. Em cada folha foram colocados quatro *plugs* (4 mm) de ágar contendo o micélio dos fungos necrotróficos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* crescidos em meio BDA. Esses discos contendo micélio foram retirados da borda das colônias com o auxílio de um furador de rolhas de 0,7 cm de diâmetro, e inoculados nas folhas de forma invertida, ou seja, a superfície que continha o micélio foi colocada em contato com a folha. Essas placas foram mantidas em BOD com fotoperíodo controlados por 7 dias. Após esse período, as folhas foram avaliadas em relação à resistência ao fungo, pela incidência de folhas com sintomas aos 7 dias após a inoculação, medindo a área total e a área infectada utilizando o *software* Image J, onde foi obtida a porcentagem de infecção de cada tratamento.

4.5.3. Inoculação de frutos e avaliação de sintomas

Frutos maduros foram inoculados conforme descrito por Cantu et al. (2008a). Frutos de tomateiro das plantas transgênicas MT-Bax-inhibitor-1 (eventos #1, #2 e #3) e MT-*Rg1 Bax-inhibitor-1* e seus respectivos controles MT e MT-*Rg1* foram colhidos maduros, lavados em água corrente, e em seguida imersos em solução 2% (v/v) de água sanitária comercial, durante 5 min para desinfecção da superfície. Após esse período, os frutos foram secos e então perfurados em 4 lesões equidistantes região equatorial na (6 mm de profundidade e 1,6 mm de diâmetro). Estes frutos foram imersos em solução contendo 500 conídios mL⁻¹ de conídios de Botrytis cinerea, durante 5 min. Após a inoculação, os frutos foram secos e acondicionados em caixas plásticas do tipo 'gerbox', as quais foram mantidas em BOD a 21°C com alta umidade por até 6 dias. Após esse período da inoculação, os frutos foram avaliados em relação à incidência de lesões com sintomas da doença (% lesões infectadas). Conídios de B. cinerea, foram coletados do meio de crescimento (BDA), contados e diluídos para 500 conídios mL-1 para as inoculações A concentração dos conídios foi estimada em Câmara de Neubauer ao microscópio óptico Axiovert 35 (Zeiss, Jena, Alemanha).

4.6. Embriogênese somática de cacaueiro

4.6.1. Material vegetal

Botões florais fechados e imaturos de 5 a 8 mm de comprimento (de acordo com o genótipo), foram coletados de manhã entre 8 e 10 h, semanalmente entre os meses de outubro a fevereiro, de acordo com a época de floração, no campo da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ-USP) em Piracicaba, SP. Em ensaio realizado em Itabuna, BA, foram também coletados botões florais dos acessos 'Catongo', 'TSH 565', 'Parazinho', 'NO-14', 'AMAZ-1515', 'UF667', 'MOACI-01', 'SIC 628', 'SIAL 84' e 'CA 1.4' para iniciar culturas embriogênicas.

4.6.2. Coleta e esterilização dos botões florais

Os botões florais imaturos foram colocados em tubos de 50 mL contendo água gelada. Utilizando fluxo laminar, a água gelada foi decantada e os botões florais foram imersos por 1 min em álcool 70% com Tween 20, secos em papel de filtro estéril e imersos em solução de 1% (p/v) de hipoclorito de cálcio, onde permaneceram por 20 min. Os botões florais foram lavados em água estéril por quatro vezes. Após a lavagem, os botões florais foram transferidos para placas de Petri e imersos em água estéril para prevenir dessecamento.

4.6.3. Dissecação dos botões florais e indução de calo

Em cima de papel de filtro estéril, os botões florais foram cortados transversalmente numa posição de cerca de 1/3 do seu comprimento a partir da base, de onde foi possível retirar os estaminóides e a base das pétalas da parte superior do botão floral, removendo todos os tecidos da parte basal do explante. Estaminóides e bases de pétalas foram cultivados em placa de Petri contendo 25 mL de meio primário de crescimento de calo (PCG), composto por sais e vitaminas DKW (DRIVER; KUNIYUKI, 1984), suplementado com glicose (20 g L⁻¹); glutamina (250 mg L⁻¹); myo-inositol (100 mg L⁻¹); 9 μ M 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4 D); 0,022 μ M thidiazuron (TDZ) e solidificado com phytagel (2 g L⁻¹), pH 5,8 (LI et al., 1998). As culturas foram mantidas no escuro a 25 ± 2°C por 14 dias. Após esse período, os explantes foram transferidos para o meio secundário de crescimento de calo (SCG) composto por sais WPM McCown's (LLOYD; MCCOWN, 1981); vitaminas (GAMBORG, 1966); glicose (20 g L⁻¹); 9 μ M 2,4 D; 1,4 μ M benzilaminopurina (BA) e solidificado com phytagel (2,2 g L⁻¹), pH 5,8, onde permaneceram por 14 dias no escuro a 25 ± 2°C.

4.6.4. Indução e manutenção dos embriões somáticos primários

Para indução e manutenção da embriogênese somática empregou-se o protocolo descrito por Li et al. (1998) e Maximova et al. (2002). Após o período de indução, os explantes de estaminóides e base de pétalas e os calos foram transferidos para placa de Petri contendo o meio de desenvolvimento de embriões (ED; LI et al., 1998) constituído por sais e vitamina DKW, suplementado com sacarose (20 g L⁻¹); glicose (1 g L⁻¹) e solidificado com phytagel (2 g L⁻¹), pH 5,8. As culturas foram mantidas no escuro a $25 \pm 2^{\circ}$ C por 14 dias com subcultivos regulares a cada duas semanas. Nessa fase, vários embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento foram produzidos dos calos embriogênicos. Os embriões somáticos primários com cotilédones desenvolvidos foram individualizados e transferidos para outra placa contendo meio ED, sendo cultivados nas mesmas condições, com subcultivos regulares de 14 dias até que os embriões somáticos atingissem a maturidade.

4.6.5. Indução e manutenção dos embriões somáticos secundários

Os embriões somáticos primários maduros com seus cotilédones desenvolvidos foram cortados em pedaços de 4 mm², e subsequentemente cultivados no meio SCG por 14 dias no escuro a $25 \pm 2^{\circ}$ C (MAXIMOVA et al., 2002). Após esse período, os explantes foram

transferidos para meio ED, nas mesmas condições, sendo subcultivados a cada 14 dias para meio novo até o surgimento de embriões somáticos secundários. Esses embriões secundários foram utilizados para a regeneração das plântulas e para a transformação genética.

4.6.6. Conversão de embriões e estabelecimento das plântulas

Os embriões somáticos maduros foram selecionados (até 2 cm de comprimento) com cotilédones distinguíveis (MAXIMOVA et al., 2002). Foram transferidos até 5 embriões por placa contendo meio de conversão de embriões primários (PEC) composto por sais e vitaminas DKW suplementado com glicose (20 g L⁻¹); KNO₃ (0,3 g L⁻¹); 1 mL L⁻¹ de solução estoque de amino-ácidos (1000X = 2,5 μ M de cada um dos amino ácidos arginina, leucina, glicina, lisina e triptofano) e solidificado com Phytagel (1,75 g L⁻¹). Os embriões foram mantidos horizontalmente, em sala de crescimento sob fotoperíodo controlado (16 h luz), e foram subcultivados em intervalos de 20 dias até a emergência de brotos. Os embriões que produziram brotos com 2 folhas verdes foram transferidos para frascos contendo 30 mL do meio de conversão de embriões secundários (SEC), constituído por sais e vitaminas DKW com glicose (5 g L⁻¹); sacarose (2,5 g L⁻¹); KNO₃ (0,2 g L⁻¹) e solidificado com Phytagel (2 g L⁻¹). As culturas foram então mantidas em sala de crescimento a 26 ± 2°C com fotoperíodo de 16 h de luz por 30 dias até a formação da parte aérea e de raízes.

Alternativamente, foi testado outro protocolo de regeneração de embriões somáticos de cacaueiro baseado em Li et al. (1998). Embriões somáticos maduros foram selecionados nas mesmas condições descritas acima. Foram transferidos 3 embriões horizontalmente por frasco contendo 30 mL de meio de regeneração de plantas (PR) composto por 1/5 de sais e vitaminas DKW; glicose (10 g L⁻¹); sacarose (5 g L⁻¹); KNO₃ (0,2 g L⁻¹) e solidificado com Phytagel (1,75 g L⁻¹). Os embriões foram mantidos em sala de luz sob 16 h de fotoperíodo, e foram subcultivados para meio PR fresco em intervalos de 20 dias até a formação de folhas, sendo então individualizados em frascos contendo 30 mL do meio PR. Os frascos foram mantidos em sala de luz sob 16 h de fotoperíodo, e foram subcultivados para meio PR fresco em intervalos de 20 dias até a formação de folhas, sendo então individualizados em frascos contendo 30 mL do meio PR. Os frascos foram mantidos em sala de luz sob 16 h de fotoperíodo, e foram subcultivados para meio PR fresco em intervalos de 20 dias até a formação de folhas, sendo então individualizados em frascos contendo 30 mL do meio PR. Os frascos foram mantidos em sala de luz sob 16 h de fotoperíodo, e foram subcultivados para meio PR fresco em intervalos de 20 dias até a formação de presco em intervalos de 20 dias até a formação de presco em intervalos de 20 dias até a formação de presco em intervalos de 20 dias até a formação de presco em intervalos de 20 dias até a formação da parte aérea e de raízes.

Posteriormente, foi adaptado um protocolo baseado em Li et al. (1998), que emprega meio ED, seguido por cultivo em meio de regeneração (REG) composto por 1/4 da quantidade de sais e vitamina DKW suplementado com sacarose (20 g L^{-1}); glicose (1 g L^{-1}) e

solidificado com phytagel (2 g L⁻¹), pH 5,8. Foram transferidos até 6 embriões somáticos secundários maduros horizontalmente por placa contendo meio ED, que foram mantidos em sala de luz sob 16 h de fotoperíodo por 14 dias. Após esse período, esses embriões foram transferidos horizontalmente para placa contendo meio REG, por 14 dias nas mesmas condições. Os embriões foram então individualizados em frascos contendo 30 mL do meio REG fechados com tampas 'B-cap' e subcultivados para o mesmo meio em intervalos de 20 dias até a formação da parte aérea e de raízes. As plântulas com folhas verdes em desenvolvimento com mais de 3 cm de comprimento, e raízes com mais de 2 cm de comprimento foram aclimatadas. Esse mesmo protocolo foi usado para regenerar embriões somáticos adequados para selecionar as plântulas.

4.7. Transformação genética de cacaueiro via Agrobacterium tumefaciens

4.7.1. Linhagens, plasmídeos e condições de cultura de A. tumefaciens

Para а transformação do cacaueiro foram usadas as construções pMDC32::Bax-inhibitor-1 e pK7WG2D::Bax-inhinitor-1, ambas nas cepas de A. tumefaciens LBA4404 e EHA105. Como controles da transformação foram utilizados os plasmídeos binários pCAMBIA1301 (resistência em planta a higromicina) e pCAMBIA2301 (resistência em planta a kanamicina), e os vetores originais (pMDC32 e pK7WG2D). Foi seguido o protocolo de Maximova et al. (2003), com modificações. Colônias de Agrobacterium crescidas por dois dias em placas foram inoculadas em 20 mL do meio bacteriano 523 (DANDEKAR et al., 1989), contendo seus respectivos antibióticos, e crescidas sob agitação orbital constante de 120 rpm a 28°C até que a cultura alcançasse a fase logarítmica de crescimento (O.D.600nm) igual a 0,5. A suspensão foi sedimentada por centrifugação a 800 g por 20 min a 25°C, e ressuspendida, no mesmo volume, em meio de indução, e a O.D.600nm foi ajustada para 0,5. O meio de indução foi constituído por sais e vitaminas DKW; sacarose (30 g L^{-1}); glicose (1 g L^{-1}); 100 μ M de acetoseringona; 1,3 mM de prolina e pH ajustado para 5,2. A virulência foi induzida sob agitação constante de 100 rpm, 25°C por 5 h.

4.7.2. Inoculação e co-cultura

Após a indução, 120 explantes cotiledonares de cacau foram transferidos a 20 mL de cultura de *A. tumefaciens* em tubos de 50 mL, para cada construção gênica. Os explantes foram sonicados (Bransonic B220-50/60 Hz, 125 W) por 30 s em banho-maria, e após esse período, esses tubos foram transferidos para um agitador orbital e mantidos sob agitação constante de 50 rpm, a 22°C por 20 min. Após a infecção, a suspensão bacteriana foi retirada e os explantes foram secos em papel de filtro estéril, transferidos para meio semi-sólido SCG e incubados no escuro a 25°C por 48 h de co-cultivo. Para cada ensaio de transformação foram utilizadas seis placas de Petri contendo 20 explantes cada para cada construção gênica.

4.7.3. Seleção das plantas transformadas

Após o período de co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio semi-sólido SCG, contendo meropenem (6,25 mg L^{-1}) para controle da A. tumefaciens e higromicina (20 mg L⁻¹) ou kanamicina (100 mg L⁻¹) para a seleção de eventos transgênicos. Essas culturas foram mantidas por 14 dias no escuro a $25 \pm 2^{\circ}$ C. Após esse período, os explantes foram transferidos para meio semi-sólido ED contendo os mesmos antibióticos para seleção nas mesmas condições, até o surgimento de embriões somáticos primários presumivelmente transgênicos. Estes embriões somáticos primários transgênicos com cotilédones desenvolvidos foram individualizados dos calos e transferidos para outra placa com meio ED contendo somente o antibiótico higromicina ou kanamicina, sendo cultivados nas mesmas condições, com subcultivos regulares de 14 dias até que os embriões somáticos atingissem a maturidade. Os cotilédones desenvolvidos dos embriões somáticos primários transgênicos foram cortados em pedaços de 4 mm², e cultivados no meio SCG, contendo o antibiótico adequado, por 14 dias no escuro a $25 \pm 2^{\circ}$ C. Após esse período, os explantes foram transferidos para meio ED, contendo o mesmo antibiótico, nas mesmas condições, sendo subcultivados a cada 14 dias para meio novo para o surgimento de embriões somáticos secundários presumivelmente transgênicos.

Esses embriões foram transferidos horizontalmente para placas de Petri contendo meio ED suplementado pelo antibiótico de seleção, e foram mantidos em sala de luz sob 16 h de fotoperíodo por 14 dias. Após esse período, esses embriões foram transferidos horizontalmente para uma nova placa contendo meio de regeneração (REG) suplementado pelo mesmo antibiótico, por 14 dias nas mesmas condições. Após esse período, os embriões foram individualizados em frascos contendo 30 mL do meio REG suplementado com antibiótico de seleção, fechados com tampas 'B-cap' e subcultivados para o mesmo meio em intervalos de 20 dias até a formação da parte aérea e de raízes. As plântulas com folhas verdes em desenvolvimento com mais de 3 cm de comprimento, e raízes com mais de 2 cm de comprimento foram aclimatadas.

4.7.4. Ensaio histoquímico de atividade da enzima β-glucuronidase

Em teste preliminar, foi realizado ensaio histoquímico de atividade da β-glucuronidase (GUS) para detectar expressão gênica em explantes cotiledonares de cacau com plasmídeos pCAMBIA 1301 e 2301. Estes plasmídeos possuem um gene repórter *uid*A cuja atividade da enzima resultante foi avaliada histoquímicamente. O ensaio histoquímico é um método qualitativo, baseado na clivagem do substrato cromogênico ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolilβ-D-glucurônico (X-gluc) pela enzima GUS, produzindo um precipitado azul (JEFFERSON; KAVANAGH; BEVAN, 1987). O tecido transformado foi imerso no tampão X-gluc (100 mM NaH₂PO₄.7H₂O pH 7,0; 10 mM EDTA pH 7,0; 0,5 mM K₃Fe(CN)₆ pH 7,0; 0,5 mM K₄[Fe(CN)₄].3H₂O pH7,0; 0,1% Triton X-100; 1 mM X-gluc). Os explantes foram incubados em microtubos contendo a solução X-gluc e mantidos a 37°C *overnight*. Após esse período, esta solução foi retirada, adicionado etanol 70% e mantido *overnight*. Após isso, o etanol foi substituído por etanol 100% e foi possível visualizar pontos azuis em todo o tecido.

4.8. Extração de RNA total

Todo procedimento de extração de RNA foi realizado na bancada livre de ribonucleases, usando-se luvas de látex descartáveis, com utensílios exclusivos de manipulação de RNA. Pistilos, cadinhos e espátulas foram lavados com solução 0,01% SDS (p/v), e enxaguados com água, água destilada e água ultrapura (milli-Q). O material foi incubado com água tratada com 0,01% dietilpirocarbonato (DEPC) ativo por 2 h na capela e secos, antes de serem embalados com papel alumínio, autoclavados a 120°C por 20 min e secos na estufa (80°C). Todas as soluções utilizadas na extração de RNA foram preparadas com água 0,01% DEPC inativa (autoclavada) e autoclavadas novamente.

4.8.1. Extração de RNA total de tomateiro

O RNA total foi extraído de folhas de plantas de MT e das transgênicas *Bax-inhibitor-1*. Todas as extrações foram baseadas no protocolo do TRIzol (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante. Brevemente, 100 mg de tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e transferido para um tubo de centrífuga de 2 mL, onde foi adicionado 1 mL de TRIzol e vortexado. Após a homogeneização, incubou-se por 5 min em temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se uma centrifugação a 9000 *g* por 15 min a 4°C. Posteriormente a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, sendo adicionado 200 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após 5 min em temperatura ambiente, foi realizada uma nova centrifugação a 9000 *g* por 15 min a 4°C. Na fase superior transferida para um novo tubo, foram adicionados 500 μ L de isopropanol, e a amostra foi novamente centrifugada. O *pellet* foi lavado três vezes com etanol 75% e centrifugado 9000 *g* por 10 min a 4°C, e posteriormente ressuspendido em 20 μ L de água DEPC.

4.8.2. Extração de RNA total de embriões somáticos de cacaueiro

RNA total de embriões somáticos de cacau controle e presumivelmente transgênicos protocolo (pMDC32::*Bax-inhibitor-1*), foi extraído usando 0 proposto por Verica et al. (2004). Brevemente, cerca de 100 mg de tecido vegetal foi macercado em nitrogênio líquido em cadinho gelado, e transferido para um tubo de centrífuga de 50 mL, no qual foi adicionado 10 mL de tampão de extração (2 % CTAB; 2 M NaCl; 100 mM Tris pH 8,0; 5 mM EDTA; 2 % PVP (MW 10000); 2 % β-mercaptoetanol), preparado em água 1% DEPC. O extrato foi então mantido em banho a 65°C por 30 min. Em seguida adicionou-se 10 mL clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), homogeneizando o extrato, e centrifugou-se a 9.000 g por 20 min a 4°C. Cerca de 5 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 50 mL, no qual foi adicionado 0,54 mL de solução 8 M de cloreto de lítio, homogeneizando-se e incubando-se a 4°C overnight. O RNA total foi então coletado por centrifugação a 9.000 g por 30 min a 4ºC e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 0,5 mL de álcool 75% e submetido a centrifugação a 9.000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante descartado e repetiu-se o procedimento da lavagem. O RNA total foi ressuspendido em 20 µL de água DEPC.

4.8.3. Quantificação e análise da integridade do RNA total

Para conferir a integridade e a concentração do RNA, as amostras foram observadas por eletroforese em gel 1,2% agarose com tampão 1X SB a 3 V cm⁻¹. Para determinação da concentração e pureza do RNA total extraído, uma alíquota de 1 μ L de RNA foi submetida à leitura em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA).

4.8.4. Tratamento com DNAse

Para digerir ácido desoxirribonucléico contaminante (DNA), 2 µg do RNA total de cada amostra foi tratado com DNAase I (Fermentas). A enzima foi utilizada na concentração de 1 U μ L⁻¹ com 40 U de *Ribolock RNase Inhibitor* (Fermentas), 1X de tampão da DNAase e água (Milli-Q) estéril tratada com 0,01% DEPC, para completar um volume final da reação de 10 μ L. A reação foi incubada no termociclador *GeneAmp PCR System* 9700 (Applied Biosystems) a 37°C por 30 min. Para que ocorresse a inativação da enzima, adicionou-se 2 μ L de 25 mM EDTA, incubando a 65°C por 10 min, seguido de resfriamento a 4°C. Em seguida, a metade do volume do RNA total tratado foi utilizado para a síntese de cDNA e a outra metade guardada em ultrafreezer (- 80°C).

4.8.5. Síntese de cDNA

O RNA tratado com DNAse foi preparado para a síntese de cDNA, com adição de 1 μ L de 50 μ M *primer* poli-T (oligo-dT 18 pb); 1 μ L de dNTP a 10 mM, num volume final de 10 μ L, seguida de incubação à 65°C por 5 min e resfriado à 4°C por 5 min. A transcrição reversa foi conduzida numa reação contendo tampão da enzima 5X *RT Buffer* (Fermentas), e 200 U de *RevertAid Premium Reverse Transcriptase* (Fermentas) e 20 U de *Ribolock RNase Inhibitor* (Fermentas) tendo como volume final da reação 20 μ L. A reação de transcrição reversa foi incubada a 50°C por 30 min, 85°C por 5 min; e mantida a 4°C posteriormente. Depois de sintetizados, os cDNAs foram armazenados a -20°C.

4.8.6. Confirmação da eficiência da síntese de cDNA

A qualidade da síntese foi verificada por uma reação de RT-PCR, utilizando o par de iniciadores específicos para o gene *Tubulina* e *Actina* (PINHEIRO et al., 2011), com eficiência e especificidade previamente testadas. A reação seguiu os seguintes parâmetros: 1 μ L de cDNA na concentração 10⁻¹ ou 1 μ L de RNA tratado com DNAse I (controle

negativo para presença de DNA na amostra); 1 U de *Taq* DNA Polimerase; 1X tampão de *Taq* DNA Polimerase; 2 mM MgCl₂; 200 μ M de dNTP; 0,2 μ M de cada iniciador (*Tubulina* F – 5'-ATTCCCCCGTCTTCACTTCT-3'; R – 5'-TCTGCTCATCACCTCTTTGG-3'; *Actina* F – 5'-TCCTCTTCCAGCCATCTCTC-3'; R – 5'-TCTCCTTGCTCATTCGGTCT-3') e água ultrapura (Mili-Q) estéril, totalizando 25 μ L de reação. As etapas de amplificação consistiram de desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 60 s; com extensão final à 72°C por 5 min. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de 1% agarose em tampão 1X SB contendo o SYBR *Gold nucleic acid gel stain*.

4.9. Determinação da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) para as plantas transgênicas de tomateiro e para os embriões somáticos transgênicos de cacaueiro

Os iniciadores específicos de Bax-inhibitor-1 e o gene de referência Proteína fosfatada 2^a subunidade catalítica (PP2A) foram empregados para análise da expressão gênica nas plantas transgênicas e não transgênicas (controle) de tomateiro contendo a construção pK7WG2D::Bax-inhibitor-1. Os iniciadores específicos nptII (gene de resistência a kanamicina) e o gene de referência Actina foram empregados para análise de expressão nas plantas transgênicas e não transgênicas (controle) de tomateiro contendo a construção pKGWFS7::SKP1-CAB e pKGWFS7::CAF. Já os iniciadores específicos de Bax-inhibitor-1 de cacaueiro, resistência higromicina; F 5'hptII (gene de а R 5'-GCTGGGGCGTCGGTTTCCACTATCCG-3'; CGCATAACAGCGCTCATTGACTGGAGC-3') e o gene de referência Actina (LEAL JR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007; PINHEIRO et al., 2011) foram empregados para análise de expressão em embriões somáticos presumivelmente transgênicos e não transgênicos (controle) de cacaueiro contendo a construção pMDC32::Bax-inhibitor-1. As análises de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) foram realizadas em termociclador centrífugo Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Austrália), a partir de diluição 10⁻¹ do cDNA total, derivado da transcrição reversa das amostras de RNA. As reações de amplificação foram realizadas no volume final de 10 µL utilizando-se 1 µl de cDNA;

0,5 μM dos iniciadores gene-específicos e 1X de *Platinum SYBR-green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen). A amplificação foi conduzida em incubações iniciais a 50°C por 2 min, 95°C por 2 min e seguidas de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 30 s, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. Após o término dos ciclos de reações, foram determinadas as curvas de dissociação de cada produto amplificado entre 72°C e 95°C (curva de *melting*). Os experimentos incluíram controle negativo contendo água sem cDNA. A aquisição dos dados em tempo real foi efetuada com o programa *Rotor-Gene Real-Time Analysis 6.0* (Corbett Research, Austrália). Os valores dos Cq (*Quantification cycle*) foram utilizados para determinar a presença do gene *Bax-inhibitor-1* e hptII nos embriões somáticos presumivelmente transgênicos e não transgênicos de cacaueiro. Para a expressão do gene alvo *Bax-inhibitor-1* e/ou hptII, foi utilizada a diferença de expressão entre os transgênicos e o gene de referência escolhido de acordo com o método "Delta Delta" (Livak & Schmittgen, 2001): razão =2 -^Δ (ΔCt)</sup> sendo ΔC_T = C_T (gene alvo) – C_T (gene referência) e o Δ (ΔC_T) = ΔC_T (transgênico) - ΔC_T (controle não transgênico).

4.10. Análises estatísticas

Nos experimentos de eficiência de embriogênese, foi utilizado delineamento estatístico completamente ao acaso com tratamentos consistindo de diferentes genótipos no meio primário e secundário de crescimento de calo. Nos experimentos de eficiência de transformação, foram analisados parâmetros vetores de transformação, em esquema fatorial. Os resultados obtidos nos ensaios de transformação foram analisados por ANOVA em nível de significância de 5% (StatView5). As médias dos tratamentos foram agrupadas de acordo com o teste estatístico de Tukey (5%).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Clonagem de Bax-inhibitor-1 de cacaueiro

Foi clonado o gene que codifica a proteína *Bax-inhibitor-1* de cacaueiro, que atua como atenuador basal para a progressão da morte celular, e desenvolvida uma construção. Esse gene havia sido detectado numa biblioteca da interação *M. perniciosa* x *T. cacao*, e identificado como sequencia completa (GESTERIRA et al., 2007). A partir de uma amostra de cDNA sintetizado de uma planta resistente 'CAB 214', foram utilizados os iniciadores propostos para amplificação do gene. A amplificação foi conduzida utilizando *Platinum Taq* DNA Polymerase *High Fidelity*, resultando num fragmento de aproximadamente 850 pb (Figura 5).



Figura 5 - Gel de agarose 1% contendo fragmento de cDNA obtido através de reação de PCR para o gene *Bax-inhibitor-1*. λ: marcador de peso molecular de λ DNA/*Hind*III Fragments (Fermentas);
100 pb: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas); cDNA CAB: cDNA 'CAB 214' do gene *Bax- inhibitor-1*; Br: controle negativo sem DNA molde

O fragmento de cDNA do gene *Bax-inhibitor-1* foi então purificado utilizando kit GFX, e clonado no vetor de entrada pCR8 do sistema *Gateway*, que foi transferido em bactérias da cepa TOP10 de *E. coli* por eletroporação. Vinte e uma colônias obtidas foram usadas para realizar a purificação do plasmídeo, as quais foram digeridas sequencialmente

com as enzimas *Bgl*II e *Eco*RV (Figura 6). Com a digestão foram gerados fragmentos de tamanho equivalente ao gene *Bax-inhibitor-1* (~850 pb). Como pode ser observado na figura 6, apenas as amostras 1, 2, 4, 6, 8, 10, 11, 13, 16 e 21 apresentaram esse fragmento no sentido senso. Assim, a partir dessas informações, somente estas amostras foram submetidas ao sequenciamento. As sequências obtidas foram analisadas por BLAST, e apresentaram similaridade satisfatória (75%), entre a sequência fornecida e a depositada no banco de dados GenBank do gene *ATBI-1* de *Arabidopsis* (NM_124083). Posteriormente, com a publicação dos dados de sequenciamento do genoma de *T. cacao,* foi possível confirmar que a sequência apresentou 98% de identidade com o genoma de cacau (ARGOUT et al., 2011). Isso indicou que estes plasmídeos continham o inserto alvo e podia ser utilizados para dar continuidade na clonagem do gene *Bax-inhibitor-1* nos vetores binários.



Figura 6 - Gel de agarose 1,5% contendo fragmentos de cDNA do gene *Bax-inhibitor-1* no vetor de entrada pCR8 obtidos através de reação de digestão com enzimas *Bgl*II e *Eco*RV. λ : marcador de peso molecular de λ DNA/*Hind*III Fragments (Fermentas); **100 pb**: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas)

Após confirmar a clonagem, o próximo passo foi a transferência do inserto para o vetor binário pMDC32. A mostra 6, contendo o gene Bax-inhibitor-1 no vetor pCR8 foi a selecionada. A reação de recombinação foi conduzida e utilizada para transformar bactérias eletrocompetentes da cepa TOP10. As colônias positivas foram usadas para produzir plasmídeos por lise alcalina, que foram analisadas por digestão com BglII e EcoRV (Figura 7) ou XbaI (Figura 8) para confirmação da presença do inserto. Baseado no programa pDRAW, a digestão virtual do plasmídeo pMDC32 (11.752 pb) sem a presença do gene Bax-Inhibitor-1 quando digerido com BglII e EcoRV gerou fragmentos de 6.059, 3.069 e 2.624 pb. Já o plasmídeo contendo o gene Bax-Inhibitor-1 (10.824 pb), digerido com as mesmas enzimas, gerou fragmentos de 6.059, 2.624, 1.891 e 250 pb. A análise de gel dos fragmentos gerados pela digestão (~6.000, 2.600, 2.000 e 250 pb) confirmaram a presença do inserto na construção pMDC32:: Bax-inhibitor-1 (Figura 7), o que indicou sucesso no processo de clonagem no vetor de destino. Uma nova reação de digestão foi realizada com a enzima de restrição Xbal, para que ocorresse a liberação do fragmento (Figura 8). Foram analisados 12 plasmídeos de colônias distintas, e todos foram positivos para a presença do inserto pelas duas digestões.



Figura 7 - Gel de agarose 1,5 % contendo fragmentos do gene Bax-inhibitor-1 mais o vetor de destino pMDC32 obtidos através de reação de digestão com enzima BglII e EcoRV. λ: marcador de peso molecular de λ DNA/HindIII Fragments (Fermentas); 1 Kb: marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas)



Figura 8 - Gel de agarose 1% contendo fragmentos do gene Bax-inhibitor-1 mais o vetor de destino pMDC32 obtidos através de reação de digestão com enzima XbaI. 1 Kb: marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas); 100 pb: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas)

Duas amostras de plasmídeos (2 e 12) foram submetidas ao sequenciamento, e apresentaram satisfatória similaridade (76%) com a sequência do gene *ATBI-1* de *Arabidopsis* depositada no GenBank (NM_124083) e apresentou 98% de identidade com o genoma de cacau. Isso indicou que estas amostras 2 e 12 continham o inserto alvo e podiam ser utilizadas na clonagem do gene *Bax-inhibitor-1* nas cepas de *Agrobacterium* LBA4404 e EHA105.

Porém, o sistema de transformação de tomateiro otimizado no Laboratório do Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal do Prof. Lázaro Peres (ESALQ/USP), emprega a seleção para resistência a kanamicina em plantas, inexistente no vetor binário pMDC32, o qual possui gene de resistência a higromicina. Por essa razão, o gene *Bax-inhibitor-1* de cacaueiro foi também clonado em outro vetor binário pK7WG2D, que possui sítios de recombinação do sistema *Gateway*, e que possui sistema de resistência a kanamicina expresso em plantas.

Para tal, o vetor de entrada pCR8 contendo o gene *Bax-inhibitor-1* (~850 pb), amostra 6, foi recombinado para o vetor de destino pK7WG2D. Bactérias eletrocompetentes da cepa
TOP10 de *E. coli* foram transformadas com a reação de recombinação, e em seguida foram plaqueadas em meio LB sólido contendo o antibiótico espectinomicina (100 mg L⁻¹). Os três plasmídeos obtidos com a mini-preparação foram digeridos em uma reação contendo duas enzimas de restrição, *SpeI* e *NheI*, para confirmar a presença do inserto. Baseado no programa pDRAW, a digestão virtual do plasmídeo pK7WG2D (12.794 pb) sem a presença do gene *Bax-Inhibitor-1* quando digerido com *SpeI* e *NheI* gerou fragmentos de 4.721, 3.409, 2.467 e 2.197 pb. Para o plasmídeo contendo o gene *Bax-Inhibitor-1* (12.230 pb), digerido com as mesmas enzimas, gerou fragmentos de 4.721, 3.409, 2.467 e 1.633 pb. A análise de gel dos fragmentos gerados pela digestão (~4.700, 3.400, 2.400 e 1.600 pb; Figura 9) confirmaram a presença do inserto na construção pK7WG2D::*Bax-inhibitor-1*, o que indicou sucesso no processo de clonagem no vetor de destino.



Figura 9 - Gel de agarose 1% contendo fragmentos do gene Bax-inhibitor-1 no vetor de destino pK7WG2D obtidos através de reação de digestão com as enzimas SpeI e NheI. λ: marcador de peso molecular de λ DNA/HindIII Fragments (Fermentas)

A partir das informações obtidas com a reação de digestão, as três amostras contendo o gene de interesse foram sequenciadas. As sequências obtidas foram analisadas por BLASTn, e apresentaram satisfatória similaridade (76%) com a sequência do gene *ATBI-1* de *Arabidopsis* depositada no GenBank (NM_124083) e apresentou 98% de identidade com o genoma de cacau. Isso indicou que estes plasmídeos, continham o inserto alvo e podiam ser utilizados para dar continuidade na clonagem do gene *Bax-inhibitor-1* nas cepas de *Agrobacterium* LBA4404 e EHA105.

As duas construções (pMDC32::*Bax-inhibitor-1* e pK7WG2D::*Bax-inhibitor-1*) contendo o gene de interesse foram eletroporadas nas duas cepas de *Agrobacterium*, LBA4404 e EHA105, para serem utilizadas na transformação de plantas. Após a eletroporação, as bactérias foram incubadas por 3 dias a 28°C. Depois desse período, nove colônias da construção pMDC32::*Bax-inhibitor-1* foram selecionadas e seus plasmídeos foram purificados e digeridos com *Eco*RV (Figura 10). A digestão virtual do plasmídeo pMDC32 (11.752 pb) sem a presença do gene *Bax-Inhibitor-1* quando digerido com *Eco*RV gerou fragmentos de 6.059, 3.069 e 2.624 pb. O mesmo plasmídeo contendo o gene *Bax-Inhibitor-1* (10.824 pb), digerido com a mesma enzima, gerou fragmentos de 6.059, 2.624 e 2.141 pb. A análise de gel dos fragmentos gerados pela digestão (~6.000, 2.600 e 2.100 pb) confirmaram a presença do inserto na construção pMDC32::*Bax-inhibitor-1* nas cepas de *Agrobacterium* (Figura 10).



Figura 10 – Gel de eletroforese dos produtos de digestão com *Eco*RV das construções pMDC32::*Bax-inhibitor-1 em Agrobacterium* LBA4404 e EHA105. λ: marcador de peso molecular de λ DNA/*Hind*III Fragments (Fermentas)

As colônias de LBA4404 e da EHA105 contendo a segunda construção (pK7WG2D::*Bax-inhibitor-1*) foram analisadas por amplificação, empregando iniciadores específicos para *Bax-inhibitor-1* de modo a confirmar a presença do gene (Figuras 11 e 12). Houve a confirmação da presença do inserto nos plasmídeos por amplificação, com fragmentos de tamanho equivalente ao cDNA do gene *Bax-inhibitor-1* (~850 pb). Assim, a amostra 18, LBA4404 (pK7WG2D::*Bax-inhibitor-1*), e amostra 3, EHA105 (pK7WG2D::*Bax-inhibitor-1*), dos plasmídeos contendo o gene de interesse foram utilizadas para iniciar a transformação genética de cacaueiro e tomateiro.



Figura 11 - Amplificação de culturas bacterianas de LBA4404 (pK7WG2D::Bax-inhibitor-1) empregando iniciadores específicos para o gene Bax-inhibitor-1. λ: marcador de peso molecular de λ DNA/HindIII Fragments (Fermentas); 1 Kb: marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen); C+: miniprep 12 da construção pK7WG2D::Bax-inhibitor-1; Br: controle negativo sem DNA molde



Figura 12 - Amplificação de culturas bacterianas de EHA105 (pK7WG2D::Bax-inhibitor-1) empregando iniciadores específicos para o gene Bax-inhibitor-1. λ: marcador de peso molecular de λ DNA/HindIII Fragments (Fermentas); 1 Kb: marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen); C+: miniprep 2 da construção pK7WG2D::Bax-inhibitor-1; Br: controle negativo sem DNA

74

5.2. Transformação genética de tomateiro via A. tumefaciens contendo o gene Baxinhibitor-1

Pino-Nunes (2009) desenvolveu um protocolo otimizado de transformação genética de tomateiro utilizando *Agrobacterium*, que em 105 dias é possível obter sementes T_1 contendo o gene de interesse e o de seleção kanamicina em plantas. Neste presente trabalho, foi utilizado o mesmo protocolo e após a inoculação dos explantes cotiledonares de tomateiro MT e MT-*Rg1* com *Agrobacterium* contendo a construção de interesse, esses foram transferidos para meio de regeneração contendo antibióticos (meropenem e kanamicina), e foram mantidos em sala de luz. Após duas semanas, os explantes foram transferidos para meio de regeneração, suplementado com antibióticos de seleção e de controle de crescimento de *Agrobacterium* (Figura 13A-C). Quando as gemas adventícias formadas nos explantes elongaram mais do que 5 mm, elas foram isoladas e transferidas para frascos contendo meio MS suplementado com os mesmos antibióticos (Figura 13D-E). Os brotos foram mantidos *in vitro* até a formação de raízes, e as plântulas derivadas foram aclimatizadas. Plantas MT e MT-*Rg1* presumivelmente transgênicas (definidas pela resistência a kanamicina *in vitro*), contendo o gene *Bax-inhibitor-1* de cacaueiro sob o controle do promotor constitutivo *35S*, foram obtidas.

As plantas transgênicas produzidas *in vitro* e aclimatizadas (T_0) foram autofecundadas e produziram sementes T_1 . Estas sementes foram germinadas e as plântulas T_1 e T_2 com 14 dias de idade foram selecionadas borrifando solução de kanamicina (400 mg L⁻¹), durante 3 dias consecutivos, com observação de plantas cloróticas (não resistentes) no quinto dia. Linhagens T_1 que geraram 100% de plantas T_2 resistentes foram consideradas homozigotas.

As sementes T_2 e T_3 foram germinadas e selecionadas da mesma forma, com aplicações de kanamicina até a obtenção de uma linhagem homozigota de todos os eventos (Figura 13F-G), para posterior inoculação com o patógeno e avaliação de resposta. A confirmação das plantas transgênicas foi realizada por análise de expressão de *Bax-inhibitor-1* por RT-qPCR. Com isso, foram obtidas plantas homozigotas de tomateiro MT e MT-*Rg1* transgênicas empregando a construção pK7WG2D::*Bax-inhibitor-1*, sendo três eventos em MT e um evento em MT-*Rg1* sob o controle do promotor constitutivo *35S*.



Figura 13 - Formação de gemas caulinares em explantes cotiledonares de tomateiro. A. Controle MT.
B. Genótipo MT transformado com a construção EHA105 (pK7WG2D::Bax-inhibitor-1).
C. Genótipo MT-Rg1 transformado com a construção EHA105 (pK7WG2D::Bax-inhibitor-1).
D. Gemas transgênicas do genótipo MT cultivadas em meio de enraizamento. E. Gemas transgênicas do genótipo MT-Rg1 cultivadas em meio de enraizamento. F. Plantas transgênicas T₂ de tomateiro Genótipo MT-Rg1 e MT-Rg1 Bax-inhibitor-1. G. Genótipo MT e MT-Bax-inhibitor-1 eventos #1; #2; #3 respectivamente

5.3. Análise da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) das plantas transgênicas de tomateiro contendo o gene *Bax-inhibitor-1*

Folhas de plantas transgênicas T₂ e seus respectivos controles não transgênicos de tomateiro foram usadas para extração de RNA total para avaliar a presença e a quantidade de transcritos derivados do transgene Bax-inhibitor-1. Foram analisadas plantas 'MT-Bax-inhibitor-1 dos três eventos em T₂ (n=4 plantas dos eventos 1 e 2; 6 plantas do evento 3) e de 'MT-Rg1 Bax-inhibitor-1' (n=6 plantas). Plantas não transformadas MT e MT-Rg1 foram utilizadas como controle negativo. A qualidade do cDNA obtido das amostras foi analisado pela amplificação por RT-PCR do gene da Proteína fosfatada 2ª subunidade catalítica ('PP2A'), com a produção de fragmento específico de ~200 pb do gene em todas as amostras de cDNA. Para quantificar os transcritos derivados dos transgenes 'Bax-inhibitor-1' e do gene de referência PP2A, foram conduzidos ensaios de RT-qPCR. A quantificação dos transcritos foi baseada na expressão relativa do gene alvo em relação ao gene de referência (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLE, 2002).

As amostras provenientes de plantas MT e MT-Rg1 não transformadas apresentaram perfil de amplificação similar ao controle negativo da reação com os C_q observados superiores a 40, com produção de fluorescência eventualmente captada pela formação de dímeros de oligonucleotideos. Os dados de expressão das plantas transgênicas foram comparados entre si em relação ao *backgound* genético (MT ou MT-Rg1). As linhas de 'MT-*Bax-inhibitor-1*' do evento 1, 2 e 3 (Figura 14) exibiram uma alta expressão relativa do transgene *Bax-inhibitor-1*, sendo mais expresso no evento 3 com expressão relativa de 34.091.427,08 vezes do transgene. Nas linhas 'MT-Rg1 *Bax-inhibitor-1*', a expressão relativa do transgene *Bax-inhibitor-1* foi de 736 vezes (Figura 14), que apesar de ser numericamente inferior àqueles eventos em MT, os valores indicam que o gene *Bax-inhibitor-1* é de fato expresso em MT-Rg1. Houve maior nível de abundância do transcrito do gene *Bax-inhibitor-1* nos transgênicos, mas diferenças entre os eventos puderam ser observadas (Figura 14). Desse modo, confirmando que todos os esventos são transgênicos.



Figura 14 - Análise de expressão relativa do gene *Bax-inhibitor-1* em plantas MT e MT-*Rg1* transgênicas e não transgênicas. O eixo y representa a taxa de expressão relativa em relação ao gene referência *PP2A*. Os valores foram calculados a partir de Cq médio das plantas de cada evento de transformação. MT Bax #1 = MT-*Bax-inhibitor-1* evento 1 (n=4); MT Bax #2 = MT-*Bax-inhibitor-1* evento 2 (n=4); MT Bax #3 = MT-*Bax-inhibitor-1* evento 3 (n=6); MT-Rg1 Bax = MT-*Rg1 Bax-inhibitor-1* (n=6). MT e MT-*Rg1* = controles não transgênicos

5.4. Ensaio de indução de morte celular nas plantas transgênicas de tomateiro

Com o intuito de demonstrar que a presença do gene *Bax-inhibitor-1* possui ação protetiva quanto a indução de morte celular, foi empregado o composto tunicamicina (TM), potencial indutor de estresse de retículo endoplasmático (RE) e de morte celular (ISHIKAWA et al., 2011), como desencadeador desse processo. Como antídoto, foi empregada a chaperona química PBA (ácido 4-fenilbutírico), com habilidade de reverter esse processo. Para tal, foram conduzidos ensaios onde plântulas de tomate controle e transgênicas contendo o gene *Bax-inhibitor-1* de cacaueiro, de todos os eventos, foram analisadas para a indução de morte celular programada empregando o agente indutor TM com ou sem reversão pela chaperona química PBA.

Nos ensaios, dez plântulas de 8 dias após germinação dos controles MT e MT-Rg1 e transgênicas MT-Bax-inhibitor-1 eventos 1, 2 e 3 e MT-Rg1 Bax-inhibitor-1 foram

transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio MS suplementado com diferentes combinações de TM e PBA por 6 h. Os tratamentos consistiram de controle (meio MS sem adição de nenhum agente); 1 mM de PBA; 0,5 μ g mL⁻¹ de TM; e 1 mM de PBA + 0,5 μ g mL⁻¹ de TM. Após a imposição dos tratamentos, as plântulas foram transferidas para placas contendo meio MS sólido sem a presença destes reagentes e mantidas por cinco dias em sala de crescimento com fotoperíodo controlados, onde estas placas foram distribuídas aleatoriamente. As plântulas foram avaliadas para a sobrevivência e o crescimento das raízes. A medição do comprimento inicial e final foi realizada pelo *software* ImageJ, onde foi obtida a média do comprimento de cada tratamento (Figura 15).

Nos ensaios não houve diferença de crescimento radicular entre os diversos genótipos (transgênicos ou não) para o tratamento controle ou com a adição de PBA (Figuras 15 e 16A-B). A adição de TM claramente afetou o desenvolvimento radicular dos controles não transformados, mas os três eventos transgênicos MT-*Bax-inhibitor-1* e MT-*Rg1 Bax-inhibitor-1* não foram afetados pela presença de TM na concentração testada de $0,5 \ \mu g \ mL^{-1}$ (Figuras 15 e 16C). A adição de PBA reverteu o efeito de TM no crescimento radicular das plantas não transgênicas MT e MT-*Rg1* (Figuras 15 e 16D). Foi notada uma pequena alteração morfológica nas raízes, principalmente das linhas transgênicas MT-*Bax-inhibitor-1* na presença de PBA (Figura 16B-D), com o aparecimento de raízes laterais mais pilosas e horizontais. De qualquer forma, a presença do transgene *Bax-inhibitor-1* de cacaueiro foi antagônico ao tratamento contendo TM (Figuras 15 e 16C-D) sugerindo a funcionalidade desse gene.



Figura 15 - Média do crescimento radicular das plântulas tratadas com TM ou não. A medição do comprimento foi realizada pelo *software* ImageJ, onde a média do comprimento foi obtida pela diferença do comprimento final menos o inicial de cada tratamento



Figura 16 - Plantas controle MT (controle 1) e MT-*Rg1* (controle 2) e transgênicas contendo o gene *Bax-inhibitor-1* tratadas com TM na presença ou ausência de PBA após 5 dias do tratamento. A – Controle; B – PBA (1 mM); C – TM (0,5 μg mL⁻¹); D – PBA (1 mM) + TM (0,5 μg mL⁻¹); E1: planta transgênica MT-*Bax-inhibitor-1* evento 1; E2: planta transgênica MT-*Bax-inhibitor-1*

evento 2; E3: transgênica MT-Bax-inhibitor-1 evento 3; E4: planta transgênica MT-Rg1 Bax-inhibitor-1

Plântulas de tomateiro controle não transgênicas e transgênicas, que foram tratadas ou não com TM, foram coloridas histoquimicamente com DAB para avaliar a indução de morte celular nas raízes. DAB é um corante indicador de morte celular. Foi possível observar a coloração marrom, característica de que houve morte celular, nas raízes das plântulas controle não transgênicas tratadas com TM (Figuras 17C-18C), enquanto que nas transgênicas, a coloração ficou bem mais clara no mesmo tratamento (Figuras 17C-18C). Já nas raízes dos controles MT e MT-*Rg1* tratadas com TM+PBA, houve uma redução na coloração amarronzada, porém esta continuou com uma tonalidade superior as transgênicas, confirmando desta forma, a ocorrência de morte celular nas raízes controle não transgênicas tratadas com TM (Figuras 17D-18D).



Figura 17 - Plantas controle MT e transgênicas contendo o gene Bax-inhibitor-1 tratadas com TM na presença ou ausência de PBA após 5 d do tratamento e coradas histoquimicamente com DAB. A – Controle; B – PBA (1 mM); C – TM 0,5 μg mL⁻¹; D – PBA (1 mM) + TM 0,5 μg mL⁻¹.



Figura 18 - Plantas controle MT-*Rg1* e transgênica contendo o gene *Bax-inhibitor-1* tratadas com TM na presença ou ausência de PBA após 5 d do tratamento e coradas histoquimicamente com DAB. **A** - Controle; **B** - PBA (1 mM); **C** - TM 0,5 μ g mL⁻¹; **D** - PBA (1 mM) + TM 0,5 μ g mL⁻¹. Diversos estudos têm mostrado que cultura de células vegetais tratadas com agentes indutores de estresse no RE, tais como a tunicamicina (TM), resulta na diminuição do crescimento e provoca morte celular (ZUPPINI; NAVAZIO; MARIANI, 2004; IWATA; KOIZUMI, 2005). O impacto do estresse no RE induzido por drogas no crescimento e na sobrevivência de plantas de *Arabidopsis* foi estudado (WATANABE; LAM, 2008). Foi mostrado que TM afetou o desenvolvimento radicular, incluindo o alongamento das raízes primárias e secundárias e a formação de raízes laterais, concomitantemente com a perda de viabilidade celular e a indução de fenótipos de PCD (WATANABE; LAM, 2008). Notavelmente, foi constatado que tais efeitos letais de TM podem ser reduzidos pela administração de duas chaperonas químicas diferentes, PBA e ácido tauro-ursodesoxicólico (TUDCA), mesmo na presença de uma dose letal de TM (WATANABE; LAM, 2008). Esses resultados sugerem que TM afeta o crescimento radicular. Esta idéia é suportada por um relato recente que TUDCA pode reverter fenótipo sensível ao calor de mutantes *AtBAG7* e *AtBip2*, os quais são defeituosos no membro da família da Heat-Shock 70 (HSP70) presentes no RE e exibiram sensibilidade aumentada a TM (WILLIAMS et al., 2010).

Além disso, o envolvimento de AtBI-1 na resposta ao estresse no RE e a relação com a via de morte celular nas raízes de *Arabidopsis* foi comprovada geneticamente. Foi mostrado que PCD mediado por estresse no RE pode ser manipulado pela interupção da proteína AtBI-1 ou superexpressão AtBI-1, resultando em PCD acelerado ou atenuado, respectivamente (WATANABE; LAM, 2008). Além disso, um estudo recente revelou que AtBI-1 tem um papel no desenvolvimento da arquitetura radicular em resposta ao estresse hídrico, o que desencadeia estresse no RE e PCD em raízes de *Arabidopsis* (DUAN et al., 2010). Durante o estresse hídrico, plantas de *Arabidopsis* iniciaram PCD nas células meristemáticas nas raízes primárias, e que após certo tempo estimulou o desenvolvimento de raízes laterais para a sua sobrevivência. Essas evidências, portanto corroboram com os resultados aqui encontrados, onde as plantas não transgênicas apresentaram crescimento radicular retardado em relação às transgênicas contendo o gene *Bax-inhibitor-1*, na presença de TM e TM + PBA.

5.5. Ensaio de inoculação de Moniliophthora perniciosa em tomateiro

Plantas transgênicas de tomateiro contendo o gene *Bax-inhibitor-1* de todos os eventos nos dois *backgound* genéticos (MT ou MT-*Rg1*) e seus respectivos controles não transgênicos foram inoculadas com isolado do biótipo-S de *M. perniciosa*. Nos ensaios foi empregado um total de 35 plantas, sendo 30 inoculadas e cinco como controle. Cinco dias após a inoculação, as avaliações das plantas foram iniciadas para a presença de sintomas e medição do engrossamento do caule. Essa avaliação foi realizada a cada cinco dias até 35 dias após a inoculação.

Nas avaliações realizadas, 83,4% (25 em 30) das plantas inoculadas de MT não transgênicas apresentaram sintomas de engrossamento com 35 dias (Tabela 2). Inicialmente foi observado, com 10 dias após a inoculação, brotações laterais pouco desenvolvidas (menor que 0,5 cm) que só foi possível confirmar como sintoma de vassoura aos 20 dias após a inoculação, quando estavam bem desenvolvidas (maior que 4 cm). O número máximo de 'vassouras-verdes' presentes nas plantas inoculadas foi de duas vassouras por planta. Os primeiros sintomas de engrossamento foram observados aos 10 dias em 19 plantas, o qual com 35 dias atingiram um engrossamento médio de 0,98 cm, enquanto nas plantas controle não inoculadas o engrossamento médio foi de 0,61 cm, portanto uma variação de 0,37 cm (Figura 19 e 20A).

Para as plantas transgênicas MT-*Bax-inhibitor-1* evento 1, entre as 30 plantas inoculadas, 12 foram sintomáticas (40%; Tabela 2). O engrossamento médio do caule foi de 0,85 cm contra 0,53 do controle não-inoculado de MT-*Bax-inhibitor-1* evento 1, uma diferença entre diâmetros de 0,32 cm (Figura 19 e 20B). Para as plantas transgênicas MT-*Bax-inhibitor-1* evento 2, entre as 30 plantas inoculadas, 14 apresentaram sintomas (46,7%; Tabela 2). O engrossamento médio do caule foi de 0,97 cm contra 0,66 do controle não-inoculado de MT-*Bax-inhibitor-1* evento 2, uma diferença entre diâmetros de 0,31 cm (Figura 19 e 20C). Para as plantas transgênicas MT-*Bax-inhibitor-1* evento 3, entre as 30 plantas inoculadas, 11 foram sintomáticas (36,7%; Tabela 2). O engrossamento médio do caule foi de 0,79 cm contra 0,58 do controle não-inoculado de MT-*Bax-inhibitor-1* evento 3, entre as 30 plantas inoculadas, 11 foram sintomáticas (36,7%; Tabela 2). O engrossamento médio do caule foi de 0,79 cm contra 0,58 do controle não-inoculado de MT-*Bax-inhibitor-1* evento 3, entre as 30 plantas inoculadas, 11 foram sintomáticas (36,7%; Tabela 2). O engrossamento médio do caule foi de 0,79 cm contra 0,58 do controle não-inoculado de MT-*Bax-inhibitor-1* evento 3, uma diferença entre diâmetros de 0,21 cm (Figura 19 e 20D).

No genótipo MT foi possível observar a hiperplasia em algumas plantas aos 10 dias após a inoculação, enquanto que nas plantas MT-*Bax-inhibitor-1* dos três eventos foi possível observar sintomas somente com 15 dias após a inoculação. Associado ao engrossamento do

caule observou-se o engrossamento dos pecíolos das folhas próximas ao local da inoculação. Após 35 dias de inoculação, as plantas infectadas e sintomáticas completaram o seu ciclo produzindo frutos, juntamente com as plantas MT. A doença não causou a morte de nenhuma planta (Figura 20A-D), também não apresentou sintomas de necrose nos frutos.

Nas avaliações realizadas, 76,7% (23 em 30) das plantas inoculadas de MT-Rg1 não transgênicas apresentaram sintomas de engrossamento com 35 dias (Tabela 2). Inicialmente foi observado com 15 dias após a inoculação, brotações laterais pouco desenvolvidas (menor que 0,4 cm) que só foi possível confirmar como sintoma de vassoura aos 20 dias após a inoculação, quando estavam bem desenvolvidas (maior que 5 cm). O número máximo de 'vassouras-verdes' presentes nas plantas inoculadas foi de duas vassouras por planta. Os primeiros sintomas de engrossamento foram observados aos 15 dias em 18 plantas, o qual com 35 dias atingiram um engrossamento médio de 1,17 cm, enquanto nas plantas controle não inoculadas o engrossamento médio foi de 0,61 cm, portanto uma variação de 0,56 cm (Figura 19 e 20E).

Para as plantas transgênicas MT-*Rg1 Bax-inhibitor-1*, entre as 30 plantas inoculadas, 22 apresentaram sintomas (73,4%; Tabela 2). O engrossamento médio do caule foi de 1,01 cm contra 0,64 do controle não-inoculado de MT-*Rg1 Bax-inhibitor-1*, uma diferença entre diâmetros de 0,37 cm (Figura 19 e 20F). Nas plantas MT-*Rg1* e MT-*Rg1 Bax-inhibitor-1* foi possível observar a hiperplasia em algumas plantas com 15 dias após a inoculação. Associado ao engrossamento do caule observou-se o engrossamento dos pecíolos das folhas próximas ao local da inoculação. Após 35 dias de inoculação, as plantas infectadas e sintomáticas completaram o seu ciclo produzindo frutos, juntamente com as plantas MT-*Rg1*. A doença não causou a morte de nenhuma planta (Figura 20E-F), também não apresentou sintomas de necrose nos frutos.

Esses resultados indicam que não houve diferença expressiva no desenvolvimento da doença entre os transgênicos e o controle avaliado pelo espessamento de caule. Por outro lado, os eventos dos transgênicos MT-*Bax-inhibitor-1* apresentaram um número menor de plantas infectadas, sugerindo um possível efeito desse gene na infecção. Já o transgênico MT-*Rg1 Bax-inhibitor-1* apresentou um número igual de plantas infectadas ao *background* MT-*Rg1*, sendo possível sugerir que esse gene nesse *background* não tenha funcionalidade com *M. perniciosa*. A falha no controle da expressão de sintomas sugere que a fase necrotrófica dependente da morte celular pode ser reduzida no patossistema de tomateiro MT, e com isso inócuo ao controle de *M. perniciosa*. Essas observações também foram feitas com base em análises de microscopia, demonstrando evidente aumento no volume celular e

desorganização das células nas plantas infectadas por *M. perniciosa* (DEGANELLO, 2012). Outros patógenos necrotróficos de tomateiro foram também avaliados para investigar o efeito da expressão de *Bax-inhibitor-1*.

As plantas transgênicas de tomateiro contendo o gene *Bax-inhibitor-1* as quais foram inoculadas com *M. perniciosa* demonstraram redução no número de plantas sintomáticas (40%), quando comparadas as plantas de MT inoculadas com o mesmo patógeno (83,4%). Desse modo, pode-se concluir que o gene *Bax-inhibitor-1* teve um papel importante na redução dos sintomas da vassoura-de-bruxa, podendo inibir a morte celular das plantas transgênicas por conter o crescimento e desenvolvimento do fungo inoculado em tomateiro.

Tabela 2 - Genótipos (MT e MT-*Rg1*) e transgênicos inoculados (n = 30) com basidiósporos do fungo*M. perniciosa* do biótipo-S e número de plantas sintomáticas

Genótipos	Nº plantas doentes	Porcentagem de plantas sintomáticas (%)
MT	25	83,4
MT-Bax-inhibitor-1 #1	12	40
MT-Bax-inhibitor-1 #2	14	46,7
MT-Bax-inhibitor-1 #3	11	36,7
MT- <i>Rg1</i>	23	76,7
MT-Rg1 Bax-inhibitor-1	22	73,4



Figura 19 - Acompanhamento do aumento do diâmetro do caule de plantas inoculadas (linha preta) em relação às plantas-controle não inoculadas, controle (linha cinza), avaliadas a cada cinco dias após a inoculação para os genótipos controles não transgênicos MT e MT-*Rg1* e para os trangênicos MT-*Bax-inhibitor-1* eventos #1; #2; #3 e MT-*Rg1 Bax-inhibitor-1*



Figura 20 - Plantas MT, MT-*Rg1* controle não trasgênicas e transgênicas contendo o gene *Bax-inhibitor*-1, inoculadas ou não com *M. perniciosa* 35 dias após a inoculação. A. Plantas MT não transgênica não inoculada (superior) e inoculada com sintomas (inferior), caule com engrossamento; B. Plantas MT-*Bax-inhibitor-1* evento 1 não inoculada (superior) e inoculada com sintomas (inferior); C. Plantas MT-*Bax-inhibitor-1* evento 2 não inoculada (superior) e inoculada com sintomas (inferior); D. Plantas MT-*Bax-inhibitor-1* evento 3 não inoculada (superior) e inoculada com sintomas (inferior); E. Plantas MT-*Rg1* não inoculada (superior) e inoculada (superior) exibindo sintomas, caule com engrossamento; F. Plantas MT-*Rg1 Bax-inhibitor-1* não inoculada (superior) e inoculada com sintomas (inferior); C. Plantas MT-*Rg1* não inoculada (superior) e inoculada com sintomas (inferior); C. Plantas MT-*Rg1* não inoculada (superior) e inoculada (superior) e inoculada com sintomas (inferior); C. Plantas MT-*Rg1* não inoculada (superior) e inoculada (superior) e inoculada com sintomas (inferior); C. Plantas MT-*Rg1* Bax-inhibitor-1 não inoculada (superior) e inoculada (superior) e

5.6. Ensaio de patogenicidade de fungos necrotróficos em folhas e frutos de tomateiro

Folhas foram destacas de plantas controle MT e MT-*Rg1* e transgênicas MT-*Bax-inhibitor-1* eventos 1, 2 e 3 e MT-*Rg1 Bax-inhibitor-1* com 7 semanas de idade e foram esterilizadas superficialmente. Estas folhas foram inoculadas com três a quatro plugs (4 mm) de ágar contendo o micélio dos fungos necrotróficos *Sclerotinia sclerotiorum* ou *Sclerotium rolfsii* crescidos em cultura BDA e incubadas em BOD a 25°C com fotoperíodo controlado de 16 h de luz por 7 dias.

Num primeiro ensaio foram empregadas 10 folhas destacadas de plantas controles MT e MT-Rg1 não transgênicas e transgênicas MT-Bax-inhibitor-1 eventos 1, 2 e 3 e MT-Rg1 Bax-inhibitor-1 inoculadas com Sclerotium rolfsii. As folhas apresentaram uma clorose e murcha acentuada não permitindo avaliar o efeito da infecção. Com isso, outro ensaio foi conduzido utilizando folhas mais jovens com até 7 semanas de idade. Nesse segundo ensaio, folhas destacadas dos controles não transgênicos MT e MT-Rg1 quando inoculados com o fungo Sclerotium rolfsii, com apenas dois dias após a inoculação apresentaram crescimento de micélio ao redor do plug (Figura 21A-E), enquanto que nos transgênicos MT-Bax-inhibitor-1 eventos 1 e 2 com 7 dias após a inoculação não observou-se a presença deste micélio (Figura 21B-C). O crescimento do fungo nectrotrófico foi mais evidente no transgênico MT-Bax-inhibitor-1 evento 3 (Figura 21D), com 22% da área total infectada (Figura 22), já para o transgênico MT-Rg1 Bax-inhibitor-1 (Figura 21F), a área total infectada foi superior, 42% de todas as 10 folhas (Figura 22).

Já na inoculação com *Sclerotinia sclerotiorum*, foi observado nos controles não transgênicos MT e MT-*Rg1* com quatro dias após a inoculação, que o micélio tinha atingido quase toda a superfície das folhas (Figura 21G-K). Nas folhas dos transgênicos MT-*Rg1 Bax-inhibitor-1* (Figura 21L), todos os plugs apresentaram crescimento dos micélios, porém, um crescimento inferior quando comparado ao seu *background* MT-*Rg1*. No transgênico MT-*Bax-inhibitor-1* evento 1 com 7 dias após a inoculação, foi possível observar a presença destes micélios apenas ao redor dos plug, de forma reduzida (Figura 21H). Já para os eventos 2 e 3 (Figura 21I-J), a área infectada foi superior, sendo 18 e 44% (Figura 22), respectivamente. Os resultados corroboram o efeito funcional do gene *Bax-inhibitor-1* de cacaueiro em resposta a infecção por fungos necrotróficos.

A murcha-de-esclerócio, causada pelo fungo de solo (LUTRELL, 1974) *Sclerotium rolfsii*, é uma doença de difícil controle (AGRIOS, 2005), que predomina em regiões de clima tropical e subtropical, com temperaturas altas e umidade seguida de períodos de seca, ocasionando tombamento, podridão radicular e murcha em mais de 500 espécies de plantas cultivadas no mundo (PUNJA, 1985). O mofo branco ou podridão-de-sclerotinia é causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, os quais produzem estruturas de resistência denominadas escleródios, quando cultivados em solos contaminados e em temperatura amena e de muita umidade. Esses dois fungos necrotróficos causam podrião no tomateiro. Esses dados juntos podem mostrar que o gene *Bax-inhibitor-1* em MT agiu de forma basal na atenuação da progressão da morte celular.



Figura 21 - Plantas MT, MT-Rg1 controle não trasgênicas e transgênicas contendo o gene Bax-inhibitor-1, inoculadas ou não com plugs dos fungos necrotróficos Sclerotium rolfsii (A-F) e Sclerotinia sclerotiorum (G-L) 7 dias após a inoculação. A. Plantas MT não transgênica; B. Plantas MT-Bax-inhibitor-1 evento 1; C. MT-Bax-inhibitor-1 evento 2; D. MT-Bax-inhibitor-1 evento 3; E. MT-Rg1 não transgênica; F. MT-Rg1 Bax-inhibitor-1; G. MT não trasgênica; H. MT-Bax-inhibitor-1 evento 1; I. MT-Bax-inhibitor-1 evento 2; J. MT-Bax-inhibitor-1 evento 3; K. MT-Rg1 não transgênica; L. MT-Rg1 Bax-inhibitor-1



Figura 22 - Porcentagem da área infectada das folhas tratadas com os fungos necrotróficos Sclerotium rolfsii e Sclerotinia sclerotiorum 7 dias após a inoculação. A medição da área foi realizada pelo software ImageJ, medindo a área total e a área infectada de cada tratamento, obtendo a porcentagem de infecção

Primeiramente, folhas das plantas controle MT e MT-*Rg1* e transgênicas MT-*Bax-inhibitor-1* eventos 1, 2 e 3 e MT-*Rg1 Bax-inhibitor-1* com 7 semanas de idade foram utilizadas para o ensaio com o fungo necrotrófico *Botrytis cinerea*, porém, não houve desenvolvimento do fungo nas folhas, não sendo o melhor método de inoculação. Por esse motivo, foi realizada a inoculação nos frutos maduros para observação dos sintomas, baseado no trabalho de Cantu et al. (2008a).

Frutos maduros foram destacados de plantas controle MT e MT-*Rg1* e transgênicas MT-*Bax-inhibitor-1* eventos 1, 2 e 3 e MT-*Rg1 Bax-inhibitor-1*. Estes frutos maduros foram inoculados com 500 conídios mL⁻¹ dos fungo *B. cinerea*, e foram incubados em BOD a 21°C com alta umidade por até 6 dias. No ensaio foram empregados pelo menos 10 frutos de cada planta controle não transgênica MT e MT-*Rg1* e transgênicas MT-*Bax-inhibitor-1* eventos 1, 2 e 3 e MT-*Rg1 Bax-inhibitor-1*, sendo divididas em dois grupos como repetição.

Após dois dias, os frutos MT e MT-Rg1 apresentaram sintomas típicos da doença do mofo cinza nos pontos perfurados. Com seis dias, esse fungo ficou mais evidente nos controles não transgênicos inoculados MT e MT-Rg1 (Figura 23A-E), apresentando crescimento de micélio ao redor dos pontos perfurados, com 64 e 70% da área infectada respectivamente (Figura 24). Enquanto que nos transgênicos MT-*Bax-inhibitor-1* eventos 1 e 3 com 7 dias após a inoculação, não observou-se a presença deste micélio (Figura 23B-D). Já para o transgênico MT-*Bax-inhibitor-1* evento 2, com 7 dias após a inoculação, alguns pontos apresentaram o crescimento do micélio (Figura 23C), onde apenas um dos quatro pontos foi observado com sintomas, representando 35% das lesões infectadas (Figura 24).

Nos frutos dos transgênicos MT-*Rg1 Bax-inhibitor-1* (Figura 23F), houve um maior crescimento do fungo nos pontos, apresentam 43% de área infectada (Figura 24). O crescimento foi reduzido em relação ao controle não transgênico inoculado, MT-*Rg1*, pórem em relação aos outros transgênicos inoculados, a porcentagem foi superior, podendo concluir que MT-*Rg1 Bax-inhibitor-1* não é um bom modelo para ser usado nesta interação.

O gênero *Botrytis*, agente causal do mofo cinzento, afeta um grande número de plantas frutíferas, oleráceas e ornamentais. Comum em cultivo protegido, a doença também pode alcançar níveis consideráveis em campo aberto e câmaras de armazenamento. Afeta, principalmente, flores e frutos, porém, mas também pode causar manchas foliares, tombamento em plântulas, cancros em caules, pecíolos e hastes, bem como podridões em bulbos, cormos, rizomas, tubérculos e raízes. Apesar dos sintomas do mofo cinzento variarem em função do hospedeiro e do órgão afetado, esses são quase sempre caracterizados pela descoloração dos tecidos, aspecto úmido e necrótico das lesões e presença de um crescimento cotonoso acinzentado (conídios e conidióforos) sobre as áreas afetadas (TÖFOLI et al., 2011). Para que ocorra a infecção, o patógeno necessita de temperatura entre 18 e 23°C, sendo que temperaturas acima de 24°C inibem a germinação dos conídios (VALE et al., 2004). *B. cinerea* causou a acumulação de peróxido de hidrogênio em torno dos locais inoculados, indicando resposta de necrose nos frutos (CANTU et al., 2009).

B. cinerea, um fungo patogênico que induz morte celular em diversas plantas (JARVIS, 1980). É um fungo necrótico que mata as células e depois alimenta-se das mesmas. Infecção de *A. thaliana* com *B. cinerea* induziu estresse oxidative e morte celular (GOVRIN; LEVINE, 2000). O processo de infecção é severamente inibido em plantas mutantes deficientes na morte celular, sugerindo que a indução de PCD como parte da resposta da planta, contribui para a infecção de *B. cinerea* em *A. thaliana* (GOVRIN; LEVINE, 2000). Também, plantas transgênicas de tabaco expresssando *BCL2* ou *BCL-xl* humano, *CED9* de nematóide, ou baculovírus *Op-IAP* (genes que regulam negativamente a apoptose animal) exibiu um aumento na resistência a *B. cinerea*, apoiando um papel crucial na via de PCD na susceptibilidade das plantas a *B. cinerea* (DICKMAN et al., 2001). Outro recente estudo relatou sobre a função de *TPK1b*

(proteína kinase de tomate) na defesa contra *Botrytis* e insetos herbívoros de tobaco. A redução na expressao do gene *TPK1b* resultou no aumento da susceptibilidade ao *B. cinerea* (ABUQAMAR et al., 2008). Desta forma, os resultados aqui observados, onde a incidência da doença foi maior nos controles não transgênicos inoculados, em relação aos transgênicos inoculados, corroboram com o efeito funcional do gene *Bax-inhibitor-1* de cacaueiro em resposta a infecção por fungos necrotróficos.



Figura 23 - Frutos inoculados com suspensão do fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* 6 d após a inoculação.
A - MT; B - MT-*Bax-inhibitor-1* evento 1; C - MT-*Bax-inhibitor-1* evento 2;
D - MT-*Bax-inhibitor-1* evento 3; E - MT-*Rg1*; F - MT-*Rg1 Bax-inhibitor-1*



Figura 24 - Porcentagem de lesões infectadas dos frutos inoculados com o fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* 6 dias após a inoculação

5.7. Clonagem do promotor do gene SKP1 de cacaueiro

O gene SKP1 foi detectado numa biblioteca da interação M. perniciosa x T. cacao (EH057769.1; LEAL JR; ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2007), quando demonstrou ser induzido pela infecção com M. perniciosa, e codifica proteína similar a ubiquitina ligase subunidade E3 do complexo SCF, que gerou a sequência NCBI UniGene Tcc.2492 de T. cacao. Para a clonagem do promotor de SKP1 a ser testado para indutibilidade por inoculação artificial com M. perniciosa, foi empregada abordagem de Genome Walking (ZHANG; GURR, 2000). Inicialmente, foi realizada a determinação do menor fragmento obtido por amplificação das bibliotecas que contivesse o início do gene e região promotora. O tamanho é considerado mínimo, pois pode ocorrer a presença de íntrons. A sequência disponível de SKP1 continha o início do gene e foi projetado um iniciador que anelava a 20 pb do ATG inicial. Foi possível ampliar um fragmento de cerca de 1.000 pb, que foi clonado e sequenciado. Foram obtidas as sequências da região distal ao gene com 377 pb e outra proximal com 294 pb (Figura 25). Foi conduzida análise preditiva de elementos regulatórios dos dois fragmentos pela plataforma Database for PLAnt Regulatory Cis-acting regulatory Elements PLACE (http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/), que revelou a presença de elementos regulatórios específicos (Figura 25) que corroboram a provável função fisiológica desempenhada pelo gene em estudo na planta. Além da presença de motivos básicos de regiões promotoras de eucariotos, como o TATA-box, normalmente presente a 30 pb do ponto de início da transcrição, e elementos proximais tipicamente localizados a aproximadamente 100 pb (CCAAT-box) e 200 pb (GC-box) abaixo do ponto de início da transcrição, outros elementos chaves foram encontrados, especialmente aqueles relacionados com a indução por fatores abióticos e principalmente bióticos como WRKY, ERF, bZIP, MYB e MYC, fatores estes considerados chaves na resposta de defesa de plantas (Figura 25). Novos iniciadores foram desenhados baseados na região distal para obter um fragmento único completo contendo o provável promotor para ser sequenciado e analisado.

A partir da sequência do promotor *SKP1* obtida por *Genome Walking*, foram desenhados iniciadores específicos para gerar fragmentos de cerca de 900 ou 600 pb. Amostras de DNA genômico de 'CAB214' e 'ICS39' foram empregadas para amplificação utilizando *Platinum Taq* DNA *Polymerase High Fidelity* de forma a minimizar erros de sequência. Foram obtidos os fragmentos dos tamanhos esperados (Figura 26). Após visualizar os fragmentos de interesse, as quatro bandas foram recortadas do gel, purificadas e quantificadas para clonagem no vetor de entrada pCR8. Após a transformação de *E. coli*, os clones contendo insertos foram purificados por lise-alcalina e analisados.



Figura 25 - Localização dos elementos regulatórios encontrados nas extremidades do promotor do gene SKP1-CAB por análise comparativa com banco de dados PLACE. Região mais distal (fragmento com 377 pb) do promotor foi amplificada pelo iniciador PP1, específico ao adaptador acoplado a região 5' do fragmento, e a região mais proximal do ATG (294 pb) foi amplificada por iniciador específico ao gene SKP1-CAB que anela na região codante (linha pontilhada) do gene próximo ao ATG



Figura 26 - Produtos de amplificação para o promotor *SKP1*. 100 pb: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas); 1Kb: marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen); DNA C: DNA 'CAB214' do promotor *SKP1*; DNA I: DNA 'ICS39' do promotor *SKP1*; B: controle negativo sem DNA molde. Fragmentos identificados por 1 equivalem a iniciadores que amplificaram a região de ~900 pb, e como 2 para o de ~600 pb

Seis amostras (clones) do plasmídeo contendo os insertos foram então digeridas com enzimas de restrições distintas para confirmar a clonagem e a direção, e depois sequenciadas. Para os fragmentos clonados de 'CAB214' e 'ICS39' foi empregada a enzima RsaI, enquanto que a combinação de BamHI e EcoRI foi usada para analisar apenas 'CAB214', e HpaIII foi usada para analisar apenas 'ICS39', previstas por análise virtual de digestão empregando o programa pDRAW. Pela digestão virtual do vetor pCR8 contendo o gene SKP1-CAB (3.730 pb) quando digerido com RsaI gerou fragmentos de 1.187, 879, 483, 451, 418, 213, 91 e 8 pb. Na análise de gel dos fragmentos gerados pela digestão (RsaI) foram gerados fragmentos de tamanho de aproximadamente de 1.200, 800, 400 e 200 pb (primeira coluna, Figura 27). Pela análise virtual, digerido com as enzimas BamHI e EcoRI, gerou fragmentos de 2.799 e 931 pb. Na análise de gel dos fragmentos gerados pela digestão (BamHI e EcoRI) foram gerados fragmentos de aproximadamente de 2.800 e 1.000 pb (segunda coluna; Figura 27), o que indicou sucesso no processo de clonagem do promotor SKP1 do DNA 'CAB 214' no vetor pCR8.



Figura 27 - Gel de eletroforese dos produtos de digestão do vetor de entrada pCR8 contendo o DNA 'CAB 214'. Primeira coluna: enzima *RsaI*. Segunda coluna: enzimas *Bam*HI e *Eco*RI. 1 Kb: marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen); 100 pb: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas)

Pelo programa, a digestão virtual do vetor pCR8 contendo o gene *SKP1-ICS* (3.729 pb) quando digerido com *Rsa*I gerou fragmentos de 1.187, 877, 483, 451, 418, 213, 92 e 8 pb. Usando a enzima *Rsa*I foram gerados fragmentos de tamanho de aproximadamente de 1.200, 800, 400 e 200 pb (primeira coluna, Figura 28). Pela análise virtual, digerido com a enzima *Hpa*III, gerou fragmentos de 1.507, 773, 557, 312, 190, 147, 130, 53, 34 e 26 pb. Na análise de gel dos fragmentos geradoas pela digestão (*Hpa*III) foram gerados fragmentos de aproximadamente de 1.500, 800, 600, 300, 200 e 100 pb (segunda coluna; Figura 28), o que indicou sucesso no processo de clonagem do promotor *SKP1* do DNA 'ICS 39' no vetor de entrada pCR8.



Figura 28 – Gel de eletroforese dos produtos de digestão do vetor de entrada pCR8 contendo o DNA 'ICS 39'.
 Primeira coluna: enzima *Rsa*I. Segunda coluna: enzima *Hpa*III. 1 Kb: marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen); 100 pb: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas)

Após confirmar a clonagem, as amostras foram sequenciadas e tiveram sua identidade confirmada. O fragmento obtido de 'CAB 214' possuía 904 pb e de 'ICS 39' 927 pb para um par de iniciador, e 691 pb a partir de 'CAB 214' e de 682 pb de 'ICS 39' com o outro par de iniciadores. Após a confirmação da clonagem, o próximo passo foi a transferência dos insertos para o vetor binário de destino pKGWFS7.0 (Figura 4). Bactérias eletrocompetentes da cepa DB3.1 de *E. coli* foram transformadas com a reação de recombinação, sendo em seguida plaqueadas em meio LB sólido contendo espectinomicina (100 mg L⁻¹). Após o período de incubação de 16 h a 37°C, quatro colônias de *SKP1-CAB* e duas colônias de *SKP1-ICS* foram utilizadas para análise. Os seis plasmídeos obtidos com a mini-preparação foram digeridos com *Dra*I, e confirmaram a presença do inserto (Figura 29). Essas mesmas seis amostras foram sequenciadas com confirmação de identidade.



Figura 29 – Gel de eletroforese dos produtos de digestão do vetor de destino pKGWFS7 contendo o DNA 'CAB 214' (amostras 1 a 4) e DNA 'ICS 39' (amostras 7 e 8) digeridos com a enzima *DraI*.
1 Kb: marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen); 100 pb: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas)

As construções foram então transformadas na cepa EHA105 de *Agrobacterium*. Colônias positivas, multiplicadas em meio LB sólido contendo rifampicina (100 mg L⁻¹) e espectinomicina (100 mg L⁻¹) foram usadas para purificação de plasmídeos. Esses plasmídeos de pKGWFS7::*SKP1-CAB* e pKGWFS7::*SKP1-ICS* obtidos foram digeridos com *Dra*I, que confirmou a presença do inserto baseado na análise virtual da digestão empregando o pDRAW (Figura 30). Baseado no programa de digestão virtual, o plasmídeo pKGWFS7 (12.700 pb) sem a presença do promotor *SKP1* digerido com a enzima *Dra*I, geraria fragmentos de 4.821, 3.853, 3610, 339 e 77 pb. Já os plasmídeos contendo o promotor *SKP1* (12.140 pb) digerido com a mesma enzima, gerariam fragmentos de 5.099, 3.610, 2.991, 363 e 77 pb. Com a digestão, foram gerados fragmentos de tamanho de aproximadamente de 5.100, 3.600, 3.000, 400 e 70 pb, o que indicou sucesso no processo de clonagem em *Agrobacterium* para as duas construções pKGWFS7::*SKP1-CAB* e pKGWFS7::*SKP1-ICS*, pois apenas o controle gerou fragmentos diferentes do plasmídeo pKGWFS7::*SKP1-ICS*) e 6 de EHA105 (pKGWFS7::*SKP1-ICS*) foram utilizadas para a transformação genética de tomateiro.



Figura 30 - Digestão dos plasmídeos EHA105 (pKGWFS7::SKP1-CAB) (amostras 1 a 5), e EHA105 (pKGWFS7::SKP1-ICS) (amostras 6 a 10) com enzima DraI. VF: vetor fechado pKGWFS7; 1
Kb: marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen); 100 pb: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas)

5.8. Clonagem do promotor do gene presumível da cafeína sintase de cacaueiro

Foram empregadas como isca oito das nove sequências gênicas e das proteínas de chá (Camellia sinensis) e café (Coffea arabica L.) relatadas por Ashihara; Sano; Crozier (2008) (NCBI AB048793), CmXRS1 (AB034699), [CaXMT CaMXMT1 (AB048794), CTS1 (AB034700), CaMXMT2 (AB084126), CTS2 (AB054841), CaDXMT1 (AB84125), CCS1 (AB086414), CtCS7 (AB086415)]. No final, foram usadas oito sequências porque AB048793 e AB034699 correspondem à mesma proteína com 100% de identidade. Essa busca visou identificar e classificar as diversas sequências codificadoras para essas metil transferases associadas ao metabolismo de alcalóides do tipo purina em T. cacao. Para cada uma das sequências, foram encontrados os mesmos vinte e dois genes de cacaueiro no banco de dados do CIRAD (Cocoagendb) [Tabela 3].

Tabela 3 - Locos de Theobroma cacao encontrados no banco de dados do genoma do cacau
(ARGOUT et al., 2011) correspondentes ao gene para metil transferases, possivelmente
associadas ao metabolismo de alcalóides do tipo purina

	Nome do Locus	Gene
1	Tc00_g008060	Putative Jasmonate O-methyltransferase
2	Tc00_g067960	Putative Benzoate carboxyl methyltransferase
3	Tc01_g001380	Putative Jasmonate O-methyltransferase
4	Tc01_g002730	Putative Jasmonate O-methyltransferase
5	Tc01_g002750	Putative Jasmonate O-methyltransferase
6	Tc01_g002770	Putative Benzoate carboxyl methyltransferase
7	Tc01_g002800	Putative Benzoate carboxyl methyltransferase
8	Tc01_g002850	Putative Jasmonate O-methyltransferase
9	Tc02_g006610	Putative Jasmonate O-methyltransferase
10	Tc02_g030100	Putative Probable S-adenosylmethionine-dependent
11	Tc02_g030140	methyltransferase (At5g38100) Putative Probable S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase (At5g38100)
12	Tc02_g030150	Putative Probable S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase (At5g37990)
13	Tc04_g013450	Putative Probable S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase (At5g38780)
14	Tc04_g013460	Putative Probable S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase (At5g38780)
15	Tc04_g013470	Putative Probable S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase (At5g37990)
16	Tc04_g013500	Putative Probable S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase (At5g37990)
17	Tc07_g002480	Putative Benzoate carboxyl methyltransferase
18	Tc08_g002470	Jasmonate O-methyltransferase
19	Tc08_g002490	Jasmonate O-methyltransferase
20	Tc10_g001800	Putative Benzoate carboxyl methyltransferase
21	Tc10_g001820	Putative Jasmonate O-methyltransferase
22	Tc10_g015830	Putative Probable S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase (At5g37990)

As sequências traduzidas para proteína destes genes foram obtidas e suas identidades confirmada por BLASTp no banco de dados do NCBI. Também no NCBI, foram selecionadas as 100 primeiras sequências protéicas de menor *e-value* obtidas com cada uma das oito sequências de proteínas relatadas acima. Após análise e descarte das sequências redundantes, foram selecionadas 111 sequências distintas (Tabela 4) para alinhamento e obtenção de árvore filogenética junto com as 22 sequências de *T. cacao* e as oito sequências diferentes de café e chá usadas como iscas (ASHIHARA; SANO; CROZIER, 2008).

GeneBank Nome da Enzima Organismo 1 A4GE69.1 7-methylxanthosine synthase 1 *Coffea canephora 3*,7-dimethylxanthine N-2 A4GE70.1 *Coffea canephora* methyltransferase 3 AAM18503.1 *N-methyltransferase* Coffea Arabica 4 AAM18505.1 N-methyltransferase *Coffea canephora* 5 AAM18506.1 *N-methyltransferase Coffea canephora* 6 AAM18507.1 *N-methyltransferase* Coffea liberica 7 *N-methyltransferase* AAM18508.1 *Coffea liberica* 8 *N-methyltransferase* AAM18509.1 Coffea liberica 9 AAM18510.1 *N-methyltransferase* Coffea liberica putative S-adenosyl-L-10 AAO27257.1 *methionine:salicylic acid carboxyl* Pisum sativum methyltransferase S-adenosyl-L-methionine:benzoic acid 11 AAO45012.1 acid/salicylic carboxyl Petunia x hybrida methyltransferase *S-adenosyl-L-methionine:benzoic* 12 AAO45013.1 acid/salicylic acid carboxyl *Petunia x hybrida* methyltransferase Arabidopsis lvrata 13 AAP57211.1 methyl transferase subsp. lyrata Coffea liberica var. 14 AAQ94895.1 putative N-methyltransferase dewevrei 15 AAQ94896.1 putative N-methyltransferase *Coffea canephora* Brugmansia sp. SAMT 16 AAW66831.1 Robadey 027 Petunia 17 AAW66834.1 SAMT nyctaginiflora Schizanthus 18 AAW66835.1 SAMT pinnatus 19 AAW66840.1 SAMT *Capsicum annuum* Browallia 20 AAW66841.1 SAMT americana Streptosolen 21 AAW66842.1 SAMT jamesonii 22 AAW66843.1 SAMT Juanulloa mexicana 23 SAMT Nicotiana tabacum AAW66850.1 24 *Camellia sinensis* AAW88351.1 *caffeine* synthase 25 AAX07284.1 *N-methyltransferase Coffea canephora* 26 AAX07285.1 putative N-methyltransferase *Coffea canephora* 27 AAX07286.1 putative N-methyltransferase *Coffea canephora* Coffea canephora AAY56107.1 28 *N-methyltransferase*

Tabela 4 - Sequências codantes identificadas de metiltransferases encontrados em banco de dados NCBI, para diversas espécies vegetais, selecionados a partir de similaridade com as seqüências relatadas por Ashihara; Sano; Crozier (2008)

continua

			continuação
29	ABC74575.1	N-methyltransferase	Coffea canephora
30	ABD33161.2	Beta-ketoacyl synthase; SAM dependent carboxyl methyltransferase	Medicago truncatula
31	ABF50941.1	S-adenosyl-L-methionine:benzoic acid/salicylic acid carboxyl methyltransferase	Petunia x hybrida
32	ABO71012.1	benzoic acid/salicylic acid methyltransferase	Protoschwenkia mandonii
33	ABO71014.1	benzoic acid/salicylic acid methyltransferase	Schwenckia americana
34	ABO71015.1	salicylic acid/benzoic acid carboxyl methyltransferase	Datura wrightii
35	ABO71017.1	salicylic acid/benzoic acid carboxyl methyltransferase	Protoschwenkia mandonii
36	ABU88887.2	S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase	Chimonanthus praecox
37	ABZ89568.1	carboxyl methyltransferase 4	Humulus lupulus
38	ACF33514.1	salicylic acid methyl transferase- like protein	Glycine max
39	ACH88356.1	S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase 1	Nicotiana tabacum
40	ACJ84582.1	Unknown	Medicago truncatula
41	ACP20216.1	salicylic acid carboxyl methyltransferase	Mikania micrantha
42	ACZ55217.1	S-adenosyl-L-methionine:benzoic acid/salicylic acid carboxyl methyltransferase	Nicotiana suaveolens
43	ACZ55219.1	S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase S adenosyl L methionine:benzoie	Nicotiana alata
44	ACZ55220.1	acid/salicylic acid carboxyl methyltransferase	Nicotiana alata
45	ACZ55222.1	S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase	Nicotiana sylvestris
46	ACZ55223.1	acid/salicylic acid carboxyl methyltransferase	Nicotiana sylvestris
47	ACZ55224.1	S-adenosyl-L-methionine:nicotinic acid carboxyl methyltransferase	Nicotiana gossei
48	ADB54832.1	S-adenosyl-L-methionine: salicylic acid carboxyl methyltransferase	Solanum lycopersicum
49	ADR30037.1	putative caffeine synthase	Coffea canephora
50	BAB39396.1	S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase	Atropa belladonna
52	BAC43758.1	tentative caffeine synthase 3	Coffea arabica
53	BAC43759.1	tentative caffeine synthase 4	Coffea arabica
55	BAC75665.1	Xanthosine N-methyltransferase	Coffea arabica

106

continua

			continuação
56	BAE79731.1	theobromine synthase	Camellia irrawadiensis
57	BAE79733.1	theobromine synthase	Camellia ptilophylla
58	BAG84614.1	theobromine synthase	Camellia granthamiana
59	BAG84616.1	theobromine synthase	Camellia lutchuensis
60	CAC33768.1	S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase	Stephanotis floribunda
61	CAD70190.1	carboxyl methyltransferase	Bixa orellana
62	CAF31508.1	S-adenosyl-L-methionine:benzoic acid/salicylic acid carboxyl methyltransferase	Nicotiana suaveolens
63	CAI05934.1	S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase	Hoya carnosa
64	CAN82906.1	hypothetical protein	Vitis vinifera
65	CBI17336.3	unnamed protein product	Vitis vinifera
66	CBI17468.3	unnamed protein product	Vitis vinifera
67	CBI17469.3	unnamed protein product	Vitis vinifera
68	CBI17473.3	unnamed protein product	Vitis vinifera
69	CBI17477.3	unnamed protein product	Vitis vinifera
70	CBI17480.3	unnamed protein product	Vitis vinifera
71	CBI28448.3	unnamed protein product	Vitis vinifera
72	NP_001031831. 1	S-adenosyl-L-methionine- dependent methyltransferase-like protein	Arabidopsis thaliana
73	NP_195365.1	S-adenosyl-L-methionine- dependent methyltransferase-like protein	Arabidopsis thaliana
74	NP_196057.1	S-adenosyl-L-methionine- dependent methyltransferase-like protein	Arabidopsis thaliana
75	NP_196058.1	S-adenosyl-L-methionine- dependent methyltransferase-like protein	Arabidopsis thaliana
76	NP_201444.1	S-adenosyl-L-methionine- dependent methyltransferase-like protein	Arabidopsis thaliana
77	Q68CM3.1	Probable caffeine synthase 2	Camellia sinensis
78	Q9AVK1.1	Theobromine synthase 3	Coffea arabica
79	Q9AVL9.1	Probable caffeine synthase 4	Coffea arabica
80	Q9SPV4.1	Salicylate O-methyltransferase;	CLABR
81	XP_002262676. 1	PREDICTED: hypothetical protein	Vitis vinifera
82	XP_002262759. 1	PREDICTED: hypothetical protein	Vitis vinifera

continua
			continuação
83	XP_002263018. 1	PREDICTED: hypothetical protein	Vitis vinifera
84	XP_002263123. 1	PREDICTED: hypothetical protein, partial	Vitis vinifera
85	XP_002263459. 1	PREDICTED: hypothetical protein	Vitis vinifera
86	XP_002264863. 1	PREDICTED: hypothetical protein	Vitis vinifera
87	XP_002265519. 1	PREDICTED: hypothetical protein	Vitis vinifera
88	XP_002265637. 1	PREDICTED: hypothetical protein	Vitis vinifera
89	XP_002265700. 1	PREDICTED: hypothetical protein	Vitis vinifera
90	XP_002265889. 1	PREDICTED: hypothetical protein	Vitis vinifera
91	XP_002267308. 1	PREDICTED: hypothetical protein	Vitis vinifera
92	XP_002281566. 1	PREDICTED: hypothetical protein	Vitis vinifera
93	XP_002281579. 1	PREDICTED: hypothetical protein	Vitis vinifera
94	XP_002281588. 1	PREDICTED: hypothetical protein	Vitis vinifera
95	XP_002307671. 1	predicted protein	Populus trichocarpa
96	XP_002310819. 1	predicted protein	Populus trichocarpa
97	XP_002310820. 1	predicted protein	Populus trichocarpa
98	XP_002325354. 1	predicted protein	Populus trichocarpa
99	XP_002325355. 1	predicted protein	Populus trichocarpa
100	XP_002510424. 1	Jasmonate O-methyltransferase, putative	Ricinus communis
101	XP_002512934. 1	Benzoate carboxyl methyltransferase, putative	Ricinus communis
102	XP_002521540. 1	Benzoate carboxyl methyltransferase, putative	Ricinus communis
103	XP_002521542. 1	Benzoate carboxyl methyltransferase, putative	Ricinus communis
104	XP_002522163. 1	Jasmonate O-methyltransferase, putative	Ricinus communis
105	XP_002529241. 1	Benzoate carboxyl methyltransferase, putative	Ricinus communis
106	XP_002529636. 1	Jasmonate O-methyltransferase, putative	Ricinus communis
107	XP_002534327. 1	Jasmonate O-methyltransferase, putative	Ricinus communis
108	XP_002534362. 1	Benzoate carboxyl methyltransferase, putative	Ricinus communis
		, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	continua

			CON	nclusão
109	XP_002868812.	S-adenosyl-L-methionine: carboxyl	Arabidopsis	lyrata
107	1	methyltransferase family protein	subsp. lyrata	
110	XP_002869034.	S-adenosyl-L-methionine:carboxyl	Arabidopsis	lyrata
	1	methyltransferase family protein	subsp. lyrata	
111	XP_002871090.	S-adenosyl-L-methionine:carboxyl	Arabidopsis	lyrata
	1	methyltransferase family protein	subsp. lyrata	

Paralelamente, as sequências EH057742.1 e EH057645.1 encontradas por Leal Jr; Albuquerque; Figueira, (2007) nos genótipos de cacau resistentes e susceptíveis a M. perniciosa, respectivamente, foram alinhadas no DFCI Cocoa Gene Index (http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=cocoa) e foram identificadas como componentes do TC3991 (Tentative consensus). Este TC foi usado no banco de dados do genoma do cacau (CIRAD) para encontrar o gene homólogo. As sequências correspondentes aos Tc00 g008060 e Tc10 g001800, previamente identificados (Tabela 3), apresentaram maior identidade. A sequência Tc10 g001800 apresentou menor e-value e foi escolhida para caracterizar a possível sequência promotora do gene. Procurando pelo nome do locus Tc10 g001800 na ferramenta GENOME BROWSER, obtiveram-se as sequências correspondentes de DNA genômico, cDNA e proteína, assim como a localização no pseudochromosome (Tc10:1005202..1016082 (+ strand)). O primeiro nucleotídeo da sequência genômica está localizado na posição 1.005.202, portanto uma região envolvendo 100 nucleotídeos do DNA genômico (1.005.302) e aproximadamente 2.000 nucleotídeos no sentido 5' (1.003.202) foi selecionada para identificar a região promotora putativa (Figura 31).



Figura 31 - Sequência prevista representando aproximadamente 2.000 pb da região promotora putativa do gene para cafeína sintase de *T. cacao*. Em negrito e sublinhado, encontram-se as sequências dos iniciadores utilizados para amplificação por PCR. As setas ponteadas indicam o sentido dos iniciadores e os elementos cis TATA-box, início de transcrição e início de tradução

Três conjuntos de iniciadores foram desenhados (Tabela 5). Após série de otimizações para reação em cadeia da polimerase (PCR), foram obtidos fragmentos amplificados com cada par de iniciadores (dado não mostrado), mais as combinações F1-R3 e F2-R3 (Tabela 5; Figura 32), a partir de DNA genômico de cinco genótipos de cacau distintos, sendo dois resistentes ('CAB214'; 'CAB208'), dois susceptíveis ('ICS39'; 'PA195') e um de resposta intermediária a doença vassoura-de-bruxa ('Scavina 6').

Tabela 5 - Iniciadores utilizados para amplificação da provável região promotora da cafeína sintasepresumível de *Theobroma cacao* tendo como base a sequência do locus *Tc10_g001800*com os tamanhos dos fragmentos esperados.

Nome iniciador	Sequência	pb
Tc10g001800-caff-F1	5'-TAGAGGGGGGCAACTATTTTT	648
Tc10g001800-caff-R1	5'-CAATGAGACAAAGGCAATGG	
Tc10g001800-caff-F2	5'-CCATTGCCTTTGTCTCATTG	723
Tc10g001800-caff-R2	5'-CTGTATCTGGCGTGTTGTGG	
Tc10g001800-caff-F3	5'-CCACAACACGCCAGATACAG	604
Tc10g001800-caff-R3	5'-CTTGTCCCATCGTTTTCTTTG	





Figura 32 - Produtos de amplificação a partir de cinco genótipos de *T. cacao* (CAB214; CAB208; ICS39; PA195; Sca6). A. Fragmentos de ~1.970 pb obtidos pela combinação dos iniciadores Tc10g001800-caff-F1/Tc10g001800-caff-R3 (Tabela 5); B. Fragmentos de ~1.310 pb obtidos pela combinação dos iniciadores Tc10g001800-caff-F2/Tc10g001800-caff-R3 (Tabela 5).
1 Kb: marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen); BR: controle negativo de amplificação

O fragmento de promotor a partir de DNA genômico do genótipo resistente 'CAB214' foi amplificado utilizando *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity*, de forma a minimizar erros de sequência. Após obter o fragmento de interesse (~2.000 pb), a banda foi recortada do gel, purificada e quantificada para clonagem no vetor pCR8. Após a transformação de *E. coli*, os clones contendo insertos foram purificados por lise-alcalina e analisados por digestão e sequenciamento.

Pelo programa, a digestão virtual do vetor pCR8 contendo o gene *CAF* (4.817 pb) quando digerido com *Eco*RV e *Xho*I gerou fragmentos de 2.803, 1.269 e 745 pb. Na análise de gel dos fragmentos gerados pela digestão usando as mesmas enzimas foram obtidos fragmentos de aproximadamente de 2.800, 1.300 e 800 pb (Figura 33), o que indicou sucesso no processo de clonagem do promotor *CAF* do DNA 'CAB 214' no vetor pCR8 somente para as amostras 3, 4 e 5, as quais confirmaram a clonagem no sentido senso.



Figura 33 - Digestão do vetor de entrada pCR8 contendo o promotor presumível da cafeína sintase de *T. cacao* (amostras 1 a 5) com enzima *Eco*RV e *XhoI*. 1 Kb: marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen); 100 pb: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas)

Após a confirmação da clonagem e identidade no vetor de entrada, o inserto foi transferido para o vetor binário de destino pKGWFS7. Bactérias eletrocompetentes da cepa DB3.1 de E. coli foram transformadas com a reação de recombinação, em seguida foram plaqueadas em meio LB sólido contendo espectinomicina (100 mg L⁻¹). Seis colônias foram multiplicadas em 5 mL de meio LB líquido e tiveram seu DNA plasmidial extraídos. Para a confirmação de identidade, os plasmídeos foram analisados por digestão e sequenciados. Clones positivos contendo o plasmídeo pKGWFS7::CAF foram digeridos com as enzimas EcoRI e NotI para confirmar a presença do inserto, previstas por análise virtual de digestão empregando o programa pDRAW. Pela digestão virtual do vetor pKGWFS7 (12.700 pb) sem a presença do gene quando digerido com EcoRI e NotI gerou fragmentos de 5.115, 4.298, 1.532, 1.290, 320 e 145 pb. Usando as enzimas de restrição EcoRI e NotI foram gerados fragmentos de tamanho de aproximadamente de 5.100, 4.300, 1.500, 1.300, 300 e 150 pb (Figura 34). Pela digestão virtual do vetor pKGWFS7 contendo o promotor CAF (12.204 pb) quando digerido com EcoRI e NotI gerou fragmentos de 4.408, 4.298, 1.532, 1.290 e 676 pb. Na análise de gel dos fragmentos gerados pela digestão com as mesmas enzimas foram obtidos fragmentos de aproximadamente de 4.400, 4.300, 1.500, 1.300 e 700 pb (Figura 34), o que indicou sucesso no processo de clonagem do promotor CAF no vetor de destino pKGWFS7.



Figura 34 - Digestão do vetor de destino pKGWFS7 contendo o promotor presumível da cafeína sintase de *T. cacao* (amostras 1 a 6). p1: DNA plasmidial do vetor de destino pKGWFS7. p2: DNA plasmidial do vetor de entrada pCR8 contendo o gene presumível da cafeína sintase de *T. cacao*. 1 Kb: marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen); 100 pb: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas)

O plasmídeo positivo, amostra 6, para a presença do inserto foi sequenciado utilizando *primers* específicos senso ou reverso, e as sequências obtidas foram analisadas por BLAST e com o banco de dados do genoma de cacau (CIRAD). Após a confirmação de identidade, o plasmídeo pKGWFS7::*CAF* foi eletroporado em células da cepa EHA105 de *A. tumefaciens* para serem utilizadas na transformação genética de tomateiro.

5.9. Transformação genética de tomateiro via *A. tumefaciens* contendo os promotores *SKP1* e Cafeína sintase

Plantas de tomateiro MT transgênicas foram obtidas com as construções pKGWFS7::*SKP1-CAB*, pKGWFS7::*SKP1-ICS* e pKGWFS7::*CAF* para análise dos promotores. Explantes cotiledonares do genótipo MT foram utilizados para a transformação com as construções EHA105 (pKGWFS7::*SKP1-CAB*) e EHA105 (pKGWFS7::*SKP1-ICS*), e em outro experimento EHA105 (pKGWFS7::*CAF*). No primeiro experimento, somente foi possível regenerar explantes contendo a construção EHA105 (pKGWFS7::*SKP1-CAB*). Já com a construção EHA105 (pKGWFS7::*SKP1-ICS*) houve um excessivo crescimento de *Agrobacterium* nos explantes, os quais foram perdidos. Depois de repetir alguns experimentos de transformação com esta construção, plantas contendo pKGWFS7::*SKP1-ICS* foram

obtidas. No segundo experimento, também foram obtidas plantas contendo a construção pKGWFS7::CAF.

Plantas MT presumivelmente transgênicas (definidas pela resistência à kanamicina), foram produzidas *in vitro* e aclimatadas (T_0), tendo sido autofecundadas e produziram sementes T_1 para as três construções em período diferentes. Estas sementes foram germinadas e as plântulas T_1 com 14 dias de idade foram selecionadas a partir da aplicação de kanamicina. As sementes T_2 das construções pKGWFS7*::SKP1-CAB* e pKGWFS7*::CAF* foram germinadas e selecionadas da mesma forma. Já para a construção pKGWFS7*::SKP1-ICS*, as sementes T_1 foram obtidas e semeadas, produzindo sementes T_2 que serão germinadas e selecionadas, até a obtenção de uma linhagem homozigota para todos os eventos, para posterior inoculação com o *M. perniciosa* e análise de controle de promotor. A confirmação das plantas transgênicas também foi conduzida por expressão gênica de *nptII* por RT-qPCR. O nível basal de expressão desses dois promotores será analisado por avaliação histoquímica e/ou fluorescência inicialmente. Após essa avaliação, a indutibilidade dos promotores será avaliada por inoculação com *M. perniciosa*, e com outros fungos patogênicos necrotróficos, tratamento hormonal, ferimento mecânico e outros estresses abióticos.

5.10. Análise da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) das plantas transgênicas de tomateiro contendo os promotores *SKP1* e *CAF*

Folhas de plantas transgênicas T_2 para as construções pKGWFS7::*SKP1-CAB* e pKGWFS7::*CAF*, e o controle MT não transgênico de tomateiro foram usadas para extração de RNA total para avaliar a presença e a quantidade de transcritos derivados do transgene *SKP1* e *CAF*. Foram analisadas plantas 'MT-*SKP1-CAB*' dos três eventos em T_2 (n=4 plantas do evento 2; 6 plantas dos eventos 1 e 3) e plantas 'MT-*CAF*' dos quatro eventos em T_2 (n=5 plantas dos eventos 1 e 2; 6 plantas dos eventos 3 e 4). Plantas MT não transgênicas foram utilizadas como controle negativo. A qualidade do cDNA obtido das amostras foi analisado pela amplificação por RT-PCR do gene de referência *Actina*, com a produção de fragmento específico de ~200 pb do gene em todas as amostras de cDNA. Para quantificar os transcritos derivados dos transgenes '*SKP1*' e '*CAF*' e do gene de referência *Actina*, foram conduzidos ensaios de RT-qPCR. A quantificação dos transcritos foi baseada na expressão

relativa do gene alvo em relação ao gene de referência (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLE, 2002).

As amostras provenientes de plantas MT não transgênicas apresentaram perfil de amplificação similar ao controle negativo da reação com os C_q observados superiores a 40, com produção de fluorescência eventualmente captada pela formação de dímeros de oligonucleotídeos. Os dados de expressão das plantas transgênicas foram comparados entre si em relação ao *backgound* genético (MT). As linhas de 'MT-*SKP1-CAB*' dos eventos 1, 2 e 3 (Figura 35) exibiram uma alta expressão relativa do transgene *SKP1-CAB*, sendo mais expresso no evento 1 com expressão relativa de 299.078,77 vezes do transgene. Nas linhas 'MT-*CAF*' dos eventos 1, 2, 3 e 4 exibiram uma alta expressão relativa de 70.694,22 vezes do transgene.



Figura 35 - Análise de expressão relativa do gene SKP1-CAB em plantas MT transgênicas e não transgênicas. O eixo y representa a taxa de expressão relativa em relação ao gene referência Actina. Os valores foram calculados a partir de Cq médio das plantas de cada evento de transformação. MT SKP1-CAB #1 = evento 1 (n=6); MT SKP1-CAB #2 = evento 2 (n=4); MT SKP1-CAB #3 = evento 3 (n=6); MT-CAF #1 = evento 1 (n=5); MT-CAF #2 = evento 2 (n=5); MT-CAF #3 = evento 3 (n=6); MT-CAF #4 = evento 4 (n=6). MT = controle não transgênico.

5.11. Embriogênese somática de cacaueiro

Botões florais fechados e imaturos foram coletados no período da manhã (Figura 36A), semanalmente entre os os meses de outubro a fevereiro, de 2008 a 2011, no campo experimental da Escola Superior "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP) em Piracicaba, SP, para determinar qual dos materiais coletados seria mais embriogênico. As flores coletadas no campo da ESALQ/USP derivam de árvores sem identificação de genótipo, que presumivelmente representam híbridos fornecidos pelo IAC na década de 1980. Por esse motivo, foram escolhidas aleatoriamente 17 árvores, e etiquetadas de A a Q. Como explante inicial foram utilizados estaminóides e base da pétala de flores fechadas (Figura 36A).

Estas flores foram dissecadas, em condições assépticas, e os explantes introduzidos em placas de Petri contendo meio PCG (Figura 36B-C). Depois de duas semanas no meio PCG, o tamanho do estaminóide aumentou de duas a três vezes quando comparado ao tamanho do explante inicial. Após esse período, os explantes foram transferidos para o meio SCG, e no decorrer dos 14 dias, calos compactos se desenvolveram em toda a superfície do estaminóide e da base da pétala. Após esse período, os calos foram transferidos para meio ED, sendo subcultivado para meio novo a cada 14 dias. Após duas semanas no meio ED, vários embriões somáticos, no estágio globular de desenvolvimento (Figura 36D), foram detectados nos calos embriogênicos, sendo estes transferidos para o meio ED (Figura 36D-E). Após quatro semanas de cultura no meio ED, observou-se que a superfície superior do estaminóide estava coberta com embriões somáticos de diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 36F).

Cerca de 25% dos estaminóides cultivados e 12% da base da pétala (de todos os genótipos testados) produziram diretamente embriões somáticos primários maduros (Tabela 6), corroborando com os dados obtidos por Li et al. (1998), onde foi descrito que os procedimentos de cultura de embriões estimularam o início dos calos embriogênico a partir de estaminóides e da base da pétala, embora a obtenção de embriões a partir da base da pétala tenha sido inferior à obtida nos estaminoides (Tabela 6).

Os cotilédones dos embriões somáticos primários maduros foram cortados em pedaços de 4 mm² e incubados no meio SCG por 14 dias (MAXIMOVA et al., 2002). Durante este período, os explantes começaram a se desdiferenciar e ocorreu um intumescimento do tecido (Figura 36G). Estes foram transferidos para meio ED, onde foram subcultivados para meio ED novo a cada 14 dias, até o desenvolvimento de embriões somáticos secundários (Figura 36H). Depois de duas semanas no meio ED, cada cotilédone produziu em torno de

1 a 13 embriões somáticos secundários (Figura 36H; Tabela 7). Os embriões somáticos secundários foram transferidos para meio ED para que atingisse a maturação (Figura 36I) e subsequentemente os embriões somáticos maduros foram transferidos com êxito para o meio de regeneração.

Das 17 árvores de cacau testadas da plantação da ESALQ/USP, somente seis demonstraram um potencial embriogênico, enquanto as outras 11 árvores formaram apenas calos compactos e não originaram nenhum embrião somático. Dessas seis árvores embriogênicas, B, D, F, G, H e L, três demonstraram um alto potencial na formação de embriões somáticos primários e secundários, sendo as nomeadas de D, F e G (Tabela 7). Dessas três, somente o genótipo 'G' foi utilizado para obtenção de embriões somáticos primários e secundários de embriões em relação às outras. O genótipo 'G' foi utilizado nos experimentos de regeneração e de transformação genética de cacaueiro.

Tentativas de obtenção de embriogênese somática também foram iniciadas a partir de botões florais de dez genótipos, coletados em campo experimental em Itabuna (BA), dos acessos 'Catongo', 'TSH 565', 'Parazinho', 'NO-14', 'AMAZ-1515', 'UF667', 'MOACI-01', 'SIC 628', 'SIAL 84' e 'CA 1.4', quando estaminóides e base das pétalas foram introduzidos em meio PCG antes de serem transportados para o CENA/USP, Piracicaba. Foram introduzidas mais de 100 flores de cada genótipo, porém, apesar do cuidado, houve sérios problemas de contaminação das culturas, possivelmente devido ao transporte aéreo para Piracicaba, não sendo possível a obtenção de embriões somáticos desses genótipos. As condições climáticas de São Paulo limitam o estabelecimento de culturas a partir de peças florais na época mais fria do ano, e as contaminações restringem a coleta de flores de outras origens (Bahia e Pará).



Figura 36 - Diferentes fases do processo morfológico *in vitro* de *Theobroma cacao* do genótipo 'G' da plantação da ESALQ/USP. A. Flor de cacau aberta e fechada mostrando os estaminóides e as pétalas;
B. Disposição dos estaminóides e das bases das pétalas na placa de Petri contendo meio PCG;
C. Explantes de base da pétala e estaminóide em evidência; D. Embrião na forma de coração no meio ED (seta branca); E. Calo no meio ED produzindo embriões somáticos primários, 56 dias após a introdução; F. Embriões somáticos de diferentes estágios de maturação derivados de calos bem desenvolvidos (embriogênese somática indireta); G. Pedaço do cotilédone do embriões primário no meio SCG; H. Embriogênese somática secundária; I. Maturação dos embriões somáticos secundários no meio ED

Tabela 6 – Resposta do tipo de explante de cacau durante a embriogênese primária

	Embriogênese Primária			
	Explantes produzindo	Média de embriões		
Tipo de explante	embriões ± EP (%)	por explante		
Estaminóide	25,9 ± 3,7 a	11,2 ± 1,9 a		
Base da Pétala	$12,6 \pm 2,4$ b	$2,7 \pm 0,7$ b		

Os dados apresentados como percentagem de explantes produzindo embriões \pm erro padrão (EP) e como média de embriões por explante \pm EP. Valores que são significativamente diferentes dentro da coluna em nível de significância de 5% são indicados com letras diferentes.

	Embriogênese Primária			Embriogênese Secundária		
	Explantes	Média	de	Explantes	Média de	
Genótipos	embriões \pm EP (%)	explante	por	embriões \pm SE (%)	embrides por explante	
А						
В	$10,9 \pm 4,8 \text{ c}$	$2,0 \pm 1,1$ c		$2,6 \pm 4,9$ b	$1,1 \pm 0,7$ c	
С						
D	$28,5 \pm 3,2$ b	$7,1 \pm 2,7$ b		5,5 ± 1,9 b	$1,9 \pm 0,6$ c	
E						
F	$31,3 \pm 4,1$ b	$6,7 \pm 2,2$ b		$9,9 \pm 2,2$ b	$5,0 \pm 1,1$ b	
G	$52,6 \pm 4,9$ a	$9,7 \pm 2,2$ a		$67,8 \pm 4,7$ a	$13,3 \pm 3,2$ a	
Н	$9,2 \pm 5,3$ c	$2,0 \pm 1,5$ c				
Ι						
J						
Κ						
L	$12,1 \pm 6,6$ c	$1,6 \pm 0,7$ c				
М						
Ν						
0						
Р						
Q						

Tabela 7 – Resposta do genótipo e do explante cotiledonar do embrião somático de cacau durante a embriogênese primária e secundária

Os dados apresentados como percentagem de explantes produzindo embriões \pm erro padrão (EP) e como média de embriões por explante \pm EP. Valores que são significativamente diferentes dentro da coluna em nível de significância de 5% são indicados com letras diferentes.

Um pré-requisito para a propagação clonal bem sucedida de plantas através de embiogênese somática é a disponibilidade de um protocolo de cultura de embriões que resulte na produção de embriões somáticos e regeneração de plantas. Um estudo recente indicou que quando um procedimento modificado foi usado, apenas 5 entre os 25 genótipos de cacau testados foram capazes de produzir embriões somáticos, enquanto que o resto permaneceu sem produzir nenhum embrião (ALEMANNO et al., 1996).

Em estudos prévios de embriogênese somática de cacau, o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) foi rotineiramente usado como principal fonte de nutrientes inorgânicos (PENCE, 1989; FIGUEIRA; JANICK, 1993; LOPEZ-BAEZ et al., 1993). Entretanto, os resultados indicaram que a cultura de vários explantes de cacau, incluindo folhas imaturas, ápices meristemáticos, cotilédones derivados de embriões zigóticos e somáticos, no meio MS, sempre resultou na redução do crescimento, rápida senescência e eventual necrose nos tecidos. O meio DKW, o qual foi desenvolvido para a propagação *in vitro* de espécies lenhosas perenes, providenciou uma concentração mais elevada de cálcio, enxofre e magnésio do que o meio MS. Estes elementos são essenciais para a diferenciação

celular e embriogênese somática (PEDROSO et al., 1996). O uso do meio DKW estimulou o rápido crescimento de calos embriogênicos, a eficiência da indução e desenvolvimento de embriões somáticos, além de um bom crescimento de plântulas de cacau derivadas de embriões.

A resposta de indução de embriogênese somática é muito genótipo-dependente, tanto para explantes de partes florais quanto para tecido nucelar (LI et al., 1998; FIGUEIRA; ALLEMANO, 2005). Maximova et al. (2002) desenvolveram um protocolo de embriogênese somática secundária para aumentar a eficiência do método relatado por Li et al. (1998), utilizando explantes cotiledonares originários de embriões somáticos primários, obtendo um aumento na produção de embriões de até 30 vezes mais que a embriogênese primária. No presente trabalho foram utilizados estes dois últimos protocolos de embriõgênese somática de cacau, obtendo resultados similares. Porém, a eficiência na obtenção de embriões somáticos secundários não foi superior ao relatado nos trabalhos supracitados, mas foi suficiente para obtenção de plântulas de cacaueiro do genótipo 'G'.

5.12. Conversão de embriões e estabelecimento das plântulas de cacaueiro

Embriões somáticos maduros com cotilédones distintos do genótipo 'G' foram selecionados para conversão, conforme descrito por Maximova et al. (2002). Foram transferidos até 5 embriões por placa de Petri, colocados horizontalmente sobre meio PEC, onde foram mantidos em sala de luz sob fotoperíodo controlado (16 h luz). Os embriões que estavam produzindo brotos com folhas verdes foram transferidos para frascos contendo 30 mL de meio SEC e foram mantidos em sala de crescimento (Figura 37A). Paralelamente, foi testado outro protocolo de regeneração de embriões somáticos de cacau, proposto por Li et al. (1998). Esse protocolo emprega apenas 1/5 da quantidade de sais e vitamina DKW em relação ao relatado por Maximova et al. (2002). Foram transferidos até 3 embriões somáticos maduros por frasco, colocados horizontalmente no meio de regeneração PR. Os embriões foram mantidos em sala de luz com fotoperíodo controlado. Em ambos os meios de cultura SEC e PR, os cotilédones dos embriões adquiriram a cor verde e aumentaram de tamanho (Figura 37B), e quando transferidos para frascos contendo meio PR, desenvolveram parte aérea, mas não formaram raízes (Figura 37C).

Posteriormente, foi adaptado um protocolo baseado em Li et al. (1998) com modificações, que emprega meio ED, seguido por cultivo em meio REG composto por 1/4 da quantidade de sais e vitamina DKW. Este protocolo modificado favoreceu a conversão dos embriões somáticos em plântulas em comparação aos outros dois testados (LI et al., 1998; MAXIMOVA et al., 2002). Nesses ensaios, foram transferidos até 6 embriões horizontalmente por placa de Petri contendo o meio ED, sendo mantidos em sala de luz com fotoperíodo controlado por 14 dias. Quando foi observado que os cotilédones dos embriões adquiriram a cor verde e aumentaram de tamanho (Figura 37D), estes foram transferidos para meio REG em placas de Petri. No decorrer dos 14 dias, foi possível observar o surgimento das folhas nos embriões (Figura 37E), e estes foram então individualizados para frascos que utilizavam tampa do tipo "B-cap" contendo meio REG (Figura 37F). Estes frascos foram mantidos nas mesmas condições em sala de luz e foram subcultivados para meio REG novo a cada 20 dias até a formação da parte aérea e de raízes (Figura 37G). As plântulas com folhas verdes em desenvolvimento com mais de 4 cm de comprimento e raízes com mais de 3 cm de comprimento foram aclimatadas, primeiramente in vitro (Figura 37H), em frascos contendo vermiculita esterilizada em autoclave, e posteriormente, ex vitro (Figura 37I-J). Plantas derivadas de embriões somáticos secundários foram obtidas e cultivadas em casa-de-vegetação (Figura 37I-J).

Comparando os três protocolos testados para a regeneração de embriões somáticos de cacaueiro, o último protocolo baseado em Li et al. (1998) empregando o meio REG resultou em um maior desenvolvimento em plântulas com raiz para o genótipo 'G' testado, em um menor tempo, cerca de 48 dias. Para os outros dois protocolos testados, o desenvolvimento da parte aérea demorou mais de 50 dias, sem a presença de raiz. Concluindo assim a superioridade desse protocolo para o genótipo testado, o qual foi utilizado para regenerar embriões somáticos secundários transgênicos.



Figura 37 - Regeneração dos embriões somáticos secundários do genótipo 'G'. A. Plântula *in vitro* obtida a partir de embrião somáticos secundários no meio de SEC; B. Embriões no meio PR; C. Plântula *in vitro* obtida a partir de embrião somático secundário no meio PR.; D. Embriões secundários horizontalmente na placa de Petri no meio ED; E. Embriões transferidos

para meio REG; F. Embriões individualizados para frascos do tipo "B-cap" contendo meio REG; G. Plântulas com folhas verdes e raízes em desenvolvimento no meio REG; H. Planta em aclimatação; I. Planta com 2 meses; J. Planta com 1 ano após aclimatação, estabelecida na casa-de-vegetação

5.13. Transformação genética de cacaueiro via Agrobacterium tumefaciens

O protocolo seguido foi o de Maximova et al. (2003). Para cada ensaio de transformação de cacaueiro, 120 explantes cotiledonares do genótipo 'G' foram utilizados quatros construções avaliadas: LBA4404 (pMDC32::Bax-inhibitor-1); com as EHA105 (pMDC32::Bax-inhibitor-1); LBA4404 (pK7WG2D::*Bax-inhibitor-1*); ou EHA105 (pK7WG2D::Bax-inhibitor-1) em 12 eventos independentes. Esses ensaios visavam testar a cepa de Agrobacterium (LAB4404 ou EHA105) e o sistema de seleção por higromicina (pMDC32) ou kanamicina (pK7WG2D) mais eficiente para a transformação.

Após a inoculação, os explantes cotiledonares foram transferidos para o meio semisólido SCG, incubados no escuro a 25°C por 48 h de co-cultivo. Após esse período, os explantes foram transferidos para meio SCG contendo meropenem para o controle da *Agrobacterium*, e higromicina ou kanamicina segundo a construção para a seleção dos explantes, com subcultivo a cada 14 dias. Foram usados como controles nos experimentos, a cepa de *A. tumefaciens* EHA105 contendo o plasmídeo binário pCAMBIA 1301 ou 2301, e os vetores fechados pMDC32 ou pK7WG2D, enquanto que o controle negativo não foi inoculado com *Agrobacterium*.

A formação de embriões somáticos secundários transgênicos foi observada entre 64 e 72 dias após a infecção para os eventos que empregaram as construções LBA4404 (pMDC32::Bax-inhibitor-1) e EHA105 (pMDC32::Bax-inhibitor-1). Já para os eventos transformados com as construções LBA4404 (pK7WG2D::Bax-inhibitor-1) e EHA105 (pK7WG2D:: Bax-inhibitor-1), sob agente de seleção kanamicina, não foi observado nenhuma formação de embriões somáticos secundário transgênicos. De cinco experimentos conclusivos de transformação com as construções pMDC32::Bax-inhibitor-1, foram obtidos 483 embriões secundários presumivelmente transgênicos (Tabela 8). Destes embriões, 249 usando LBA4404 (pMDC32::Bax-inhibitor-1) e 154 com foram obtidos EHA105 (pMDC32::Bax-inhibitor-1). Dos controles, 48 embriões somáticos derivaram de EHA105 (pCAMBIA1301) e 32 de EHA105 (pMDC32). Os explantes cotiledonares controles não transgênicos sem seleção por antibiótico originaram 548 embriões, enquanto que na presença de seleção não houve produção de embriões e os explantes degeneraram (Figura 38A-B). A média de números de embriões somáticos secundários supostamente transgênicos por explante inoculado produzido dos experimentos de transformações individuais variou de 0,12 a 0,71 (Tabela 8), enquanto que a média dos controles positivos foram de 0,12-0,14 para (pCAMBIA1301) e 0,10-0,16 para o vetor fechado (pMDC32). A produção relativamente baixa de embriões transgênicos foi consistente entre todos os vetores. Apesar da baixa eficiência, foi possível gerar embriões para obtenção futura de plantas transgênicas de cacaueiro (Figura 38B).

Comparando as duas cepas de *Agrobacterium* utilizadas com a construção pMDC32::*Bax-inhibitor-1*, foi possível observar que a cepa LBA4404 gerou mais embriões somáticos secundários possivelmente transgênicos em relação a EHA105. Contudo, a cepa LBA4404 contendo a construção de interesse apresentou problemas de crescimento no decorrer de alguns ensaios, e não permitindo a comparação das cepas. Nos experimentos #8, #10 e #12 (Tabela 8), portanto não sendo possível obter embriões de todas as construções devido ao supercrescimento da *Agrobacterium* nos explantes após os dois dias de co-cultivo.

O trabalho publicado por Silva et al. (2009) teve como objetivo melhorar o método de transformação genética, avaliando os diferentes fatores que afetam a eficiência da embriogênese somática e da transformação em cacaueiro. Embora nenhuma planta transgênica tenha sido produzida como resultado deste estudo, os resultados indicaram que os antibióticos timentin e meropenem, usados como agentes de seleção para *A. tumefaciens*, tiveram um efeito não prejudicial na embriogênese secundária (SILVA et al., 2009). Higromicina mostrou um forte efeito inibitório sobre a embriogênese somática secundária de cacaueiro, segundo relatado por Silva et al. (2009). Porém, os resultados obtidos neste present trabalho foi com a higromicina, concluindo que é o melhor agente de seleção para a transformação genética dos explantes cotiledonares do genótipo 'G'. Em resumo, esforços têm sido feitos para melhorar o protocolo de transformação de cacaueiro.

Para analisar a expressão transiente do controle, alguns explantes cotiledonares transformados com a construção EHA105 (pCAMBIA1301) foram analisados histoquimicamente para expressão do gene *uidA* (GUS). Foi possível visualizar alguns pontos azuis nos explantes (Figura 38C), comprovando a expressçao transiente. Os cotilédones de alguns dos embriões somáticos obtidos foram repicados e transferidos para meio de cultura SCG contendo higromicina, para a formação de mais embriões somáticos contendo o gene de interesse.

O protocolo descrito por Maximova et al. (2003) foi um protocolo de transformação genética mediada por Agrobacterium para Theobroma cacao L., usando explantes cotiledonares a partir de embriões somáticos primários (SEs) e usando a cepa de A. tumefaciens AGL1. Plantas transgênicas contendo o gene repórter EGFP, gene de seleção em plantas NPTII, gene chitinase (Chi) classe I de cacaueiro, e nuclear matrix attachment regions (MARs) de tabaco em diferentes combinações foram produzidas com sucesso através da regeneração de embriões somáticos secundários (MAXIMOVA et al., 2003). Noventa e quarto plantas transgênicas foram aclimatadas em casa-de-vegetação e cresceram até a maturidade, não sendo observada diferenças nos parâmetros de crescimento das plantas transgênicas e não transgênicas, ambas obtidas de embriões somáticos (MAXIMOVA et al., 2003).

Dos embriões somáticos secundários presumivelmente transgênicos que passaram pela seleção, metade foi utilizada para análise de expressão para confirmar a transgenia e a outra metade foi transferida para frascos contendo o meio REG com a presença da higromicina, para serem aclimatados (Figura 38D-E). As melhorias identificadas no protocolo de transformação e regeneração sugerem que é possível obter plântulas transgências de cacaueiro. Embriões somáticos presumivelmente transgênicos contendo o gene *Bax-inhibitor-1* formaram raízes utilizando o protocolo contendo o meio REG e se encontram na fase de aclimatação (Figura 38E).

Experimento	Cepa de <i>Agrobacterium</i> (construção)	Total de explantes inoculados	No. de embriões somáticos	Média de embriões/ explante
#4 Controle		120	200	1,66
4.1	LBA4404 (pMDC32::Bax-	120	84	0,70
	inhibitor-1)			,
4.2	EHA105 (pMDC32::Bax-	120	43	0,36
	inhibitor-1)			,
4.3	EHA105(pCAMBIA 1301)	120	16	0,13
#6 Controle		120	90	0,75
6.1	LBA4404 (pMDC32::Bax-	120	85	0,71
	inhibitor-1)			
6.2	EHA105 (pMDC32::Bax-	120	15	0,12
	inhibitor-1)			
6.3	EHA105 (pCAMBIA 1301)	120	15	0,12
#8 Controle		120	105	0,75
8.2	EHA105 (pMDC32::Bax-	120	30	0,25
	inhibitor-1)			
8.4	EHA105 (pMDC32)	120	12	0,10
#10 Controle		100	70	0,70
10.2	10.2 EHA105 (pMDC32:: <i>Bax</i> -		25	0,21
	inhibitor-1)			
10.3	EHA105 (pCAMBIA1301)	120	17	0,14
#12 Controle		100	83	0,83
12.1	LBA4404 (pMDC32::Bax-	120	80	0,67
	inhibitor-1)			
12.2	EHA105 (pMDC32::Bax-	120	41	0,34
	inhibitor-1)			
12.4	EHA105 (pMDC32)	120	20	0,16

Tabela 8 - Embriões somáticos secundários presumivelmente transgênicos produzidos a partir de
cinco experimentos (#4; #6; #8; #10 e #12) de transformação com Agrobacterium,
empregando uma construção contendo vetor binário



Figura 38 - Transformação genética de embriões somáticos secundários de cacau do genótipo 'G' contendo o gene *Bax-inhibitor-1*. A. Controle negativo da transformação, explante cotiledonar não inoculado com *Agrobacterium* no meio de cultura contendo antibiótico; B. Embrião somático presumívelmente transgênico. C. Expressão de GUS em explantes inoculados com EHA105 (pCAMBIA1301) dois dias após co-cultivo. D. Regeneração de embriões somáticos secundários de cacau do genótipo 'G' presumivelmente transgênicos da amostra 9 do experimento #4.1 (Tabela 8) em meio REG. E. Regeneração de embriões somáticos secundários de cacau do genótipo 'G' presumivelmente transgênicos da amostra 9 do experimento #4.1 (Tabela 8) sendo aclimatados em vermiculita

5.14. Análise da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) dos embriões somáticos transgênicos de cacaueiro contendo o gene *Bax-inhibitor-1*

Embriões somáticos de cacaueiro não transgênicos e presumivelmente transgênicos, contendo a construção pMDC32::*Bax-inhibitor-1* com seleção em plantas a higromicina, foram utilizados para extração de RNA total com o intuito de confirmar a presença e quantificar mRNAs derivados do transgene *Bax-inhibitor-1*. Foram analisados embriões somáticos dos experimentos #4, #6, #8, #10 e #12 (Tabela 8). Embriões somáticos não transformados do genótipo "G" foram utilizados como controle negativo. A qualidade do RNA foi verificada em gel de agarose e leitura da razão A_{260}/A_{280} . A qualidade do cDNA foi também confirmada por RT-PCR para o gene de *Actina*, que mostrou amplificação específica do fragmento de ~200 pb do gene em todas as amostras de cDNA. Para quantificar os transcritos derivados dos transgenes '*Bax-inhibitor-1*' e '*hptII*' e do gene normalizador endógeno *Actina*, foram conduzidos ensaios de RT-qPCR. A quantificação dos transcritos foi baseada na expressão relativa do gene alvo em relação ao gene de referência (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLE, 2002).

Nos ensaios de RT-qPCR para quantificar *Bax-inhibitor-1*, embriões somáticos não transformados apresentaram expressão do gene, embora baixa, pois trata-se de um gene presente no genoma do cacaueiro. Dentro de cada ensaio, o nível de expressão dos transgenes foi comparado entre os embriões transgênicos. Houve variação na abundância relativa de transcritos *Bax-inhibitor-1* entre embriões somáticos, sendo mais expressos na amostra 9 do experimento #4.1 (Figura 39A; Tabela 8) com expressão relativa de 958.500 vezes do transgene *Bax-inhibitor-1*, enquanto que a amostra 16, representando embriões somáticos transgênicos do experimento #12.1 (Tabela 8), a expressão relativa do transgene *Bax-inhibitor-1* foi de 848.730 vezes (Figura 39A). As menores expressões foram observadas para as amostras 11 e 12 dos experimentos #6.1 e #6.2, respectivamente (Figura 39A). Houve maior nível de abundância do transcrito do gene *Bax-inhibitor-1* nos transgênicos, mas diferenças entre os eventos/experimentos puderam ser observadas.

Da mesma forma, foi analisado o acúmulo de transcritos do gene codificador de resistência a higromicina *hptII*, usado na seleção de transgênicos. O controle negativo não transformado foi empregado como referência. Dentro de cada experimento, os embriões transgênicos foram comparados entre si quanto à abundância de transcritos. Foram detectadas

diferenças entre os níveis de acúmulo dos transcritos de *hptII* entre os eventos/experimentos (Figura 39B). Da mesma forma, os eventos/embriões somáticos transgênicos analisados apresentaram a mesma tendência de acúmulo de transcritos ao ensaio de expressão de *Bax-inhibitor-1*. A amostra 9 apresentou maiores níveis de acúmulo (488.690 vezes) seguido das amostras 16 e 14 (408.730 e 324.100 vezes, respectivamente), de forma similar ao observado para *Bax-inhibitor-1* (Figura 39A-B). Esses resultados indicam que a abordagem de transformação de cacaueiro está implementada no laboratório, porém a baixa eficiência do processo e o tempo necessário ainda impedem seu uso em larga escala para análise funcional.



Figura 39 - Análise de expressão relativa do gene Bax-inhibitor-1 (A) e do gene hptII (B) em embriões somáticos "G" transgênicos e não transgênicos. O eixo y representa a taxa de expressão relativa em relação ao gene referência Actina. Os valores foram calculados a partir de C_q médio dos embriões em cada experimento de transformação. CTR = controle não transgênico

6. CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas transgênicas de tomateiro contendo o gene *Bax-inhibitor-1*, as quais foram inoculadas com *M. perniciosa*, demonstraram redução no número de plantas sintomáticas (40%), quando comparadas as plantas de MT inoculadas com o mesmo patógeno (83%). Esses dados corroboram com resultados das inoculações com os fungos necrotróficos *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotorium* e *Sclerotium rolfsii*, sendo que as plantas transgênicas inoculadas também apresentaram contenção dos sintomas dessas doenças, uma redução de 40% da área de infecção em comparação as plantas de Micro-Tom infectadas. Desse modo, pode-se concluir que o gene *Bax-inhibitor-1* em MT agiu de forma basal na atenuação da progressão da morte celular, reduzindo os sintomas da vassoura-de-bruxa, da mesma forma que esse transgene contribuiu na redução dos sintomas do mofo cinza, mofo branco e murcha-de-esclerócio, por conter o crescimento e desenvolvimento dos fungos inoculados em tomateiro.

A resposta de indução de embriogênese somática é muito genótipo-dependente, dessa forma foi estabelecido um protocolo de embriogênese somática secundária para aumentar a eficiência, utilizando explantes cotiledonares originários de embriões somáticos primários, para o genótipo 'G' no presente trabalho. Porém, a eficiência na obtenção de embriões somáticos secundários não foi superior ao relatado nos trabalhos supracitados, mas foi suficiente para obtenção de plântulas de cacaueiro do genótipo 'G'.

Dos embriões somáticos secundários transgênicos que passaram pela seleção a higromicina, foram aclimatados e houve a confirmação da transgenia. As melhorias identificadas no protocolo de transformação e regeneração sugerem que é possível obter plântulas transgências de cacaueiro Esses resultados indicam que a abordagem de transformação de cacaueiro está implementada no laboratório, porém a baixa eficiência do processo e o tempo necessário ainda impedem seu uso em larga escala para análise funcional.

REFERÊNCIAS

ABUQAMAR, S.; CHAI, M.F.; LUO, H.; SONG, F.; MENGISTE, T. Tomato Protein Kinase 1b mediates signaling of plant responses to necrotrophic fungi and insect herbivory. **The Plant Cell**, Rockville, v. 20, p. 1964-1983, 2008.

AGRIOS, G.N. Plant pathology. 5. ed. San Diego: Elsevier, 2005. 922 p.

AIME, M.C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, New York, v. 97, p. 1012-1022, 2005.

ALBA, R.; PAYTON, P.; FEI, Z.; MCQUINN, R.; DEBBIE, P.; MARTIN, G.B.; TANKSLEY, S.D.; GIOVANNONI, J.J. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 17, p. 2954-2965, 2005.

ALBUQUERQUE, P.S.B.; BASTOS, C.N.; LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M. Doenças do cacaueiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN, A.F.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**: doenças de plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap. 18, p. 151-163.

ALBUQUERQUE, P.S.B.; SILVA, S.D.V.M.; LUZ, E.D.M.N.; PIRES, J.L.; VIEIRA, A.M.C.; DEMÉTRIO, C.G.B.; PASCHOLATTI, S.F.; FIGUEIRA, A. Novel sources of witches' broom resistance (causal agent *Moniliophthora perniciosa*) from natural populations of *Theobroma cacao* from the Brazilian Amazon. **Euphytica**, Wageningen, v. 172, p. 125-138, 2010.

ALEMANNO, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 46, n. 3, p. 187-194, 1996.

ALMEIDA, O.C.; CHIACCHIO, F.P.B.; ROCHA, H.M. Sobrevivência de *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer em vassouras secas de cacaueiros (*Theobroma cacao* L.) do estado da Bahia. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 9, p. 23-28, 1997.

ALVERSON, W.S.; WHITLOCK, B.A.; NYFFELER, R.; BAYER, C.; BAUM, D.A. Phylogeny of the core Malvales: evidence from *ndhF* sequence data. American Journal of Botany, Lancaster, v. 86, n. 10, p. 1474-1486, 1999.

ANDEBRHAN, T. Studies on the epidemiology and control of witches' broom disease of cocoa in the Brazilian Amazon. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 1984, Lome, Togo. **Proceedings...** Lagos, Nigeria: Cocoa Producers' Alliance, 1984. p. 395-402.

ANDEBRHAN, T.; HAMMERSTONE, J.F.; ROMANCZYK, L.J., FURTEK, D.B. Sensitivity of *Crinipellis perniciosa* to procyanidins from *Theobroma cacao* L. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, p. 339-348, 1995.

ANDEBRHAN, T.; FIGUEIRA, A.; YAMADA, M.M.; CASCARDO, J.; FURTEK, D.B. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis perniciosa*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. European Journal of Plant Pathology, Dordrecht, v. 105, p. 167-175, 1999.

ANTÚNEZ DE MAYOLO, G.; MAXIMOVA, S.N.; PISHAK, S.; GUILTINAN, M.J. Moxalactam as a counter-selection antibiotic for *Agrobacterium*-mediated transformation and its positive effects on *Theobroma cacao* somatic embryogenesis. **Plant Science**, Amsterdam, v. 164, p. 607-615, 2003.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 55; p. 373-399, 2004.

ARGOUT, X.; FOUET, O.; WINCKER, P. et al. Towards the understanding of the cocoa transcriptome: production and analysis of an exhaustive dataset of ESTs of *Theobroma cacao* generated from various tissues and under various conditions. **BMC Genomics**, v. 9, p. 512, 2008.

ARGOUT, X.; SALSE, J.; AURY, J.M. et al. The genome of *Theobroma cacao*. Nature Genetics, New York, v. 43, p. 101-109, 2011.

ARIE, T.; TAKAHASHI, H.; KODAMA, M.; TERAOKA, T. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. **Plant Biotechnology**, Tokyo, v. 24, p. 135-147, 2007.

ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**, Oxford, v. 69, n. 4, p. 841-856, 2008.

BASTOS, C.N.; ANDEBRHAN, T. Urucum *Bixa orellana* a new host of witches' broom disease *Crinipellis perniciosa* of cocoa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 11, p. 963–965, 1986.

BASTOS, C.N.; EVANS, H.C. A new pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology,** Oxford, v. 34, p. 306–312, 1985.

BOLDUC, N.; BRISSON, L.F. Antisence down regulation of NtBI-1 in tobacco BY-2 cells induces accelerated cell death upon carbon starvation. **FEBS Letter**, Amsterdam, v. 532, p. 111–114, 2002.

BOLDUC, N.; OUELLET, M.; PITRE, F.; BRISSON, L.F. Molecular characterization of two plant BI-1 homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 203 cells. **Planta**, Berlin, v. 216, p. 377–386, 2003.

BRAMLEY, P.M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. Journal of Experimental Botany, Oxford, v. 53, p. 2107-2113, 2002.

BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: A Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, Natick, v. 36, n. 2, p. 214-216, 2004.

CAMPOS, M.L.; CARVALHO, R.F.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Small and remarkable the Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 5, p. 267-270, 2010.

CANTU, D.; VICENTE, A.R.; GREVE, L.C.; DEWEY, F.M.; BENNETT, A.B.; LABAVITCH, J.M.; POWELL, A.L.T. The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 105, n. 3, p. 859-864, 2008a.

CANTU, D.; BLANCO-ULATE, B.; YANG, L.; LABAVITCH, J.M.; BENNETT, A.B.; POWELL, A.L.T. Ripening-regulated susceptibility of tomato fruit to *Botrytis cinerea* requires *NOR* but not *RIN* or ethylene. **Plant Physiology**, Rockville, v. 150, p. 1434-1449, 2009.

CARRARI, F.; BAXTER, C.; USADEL, B.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; ZANOR, M.I.; NUNES-NESI, A.;NIKIFOROVA, V.; CENTERO, D.; RATZKA, A.; PAULY, M.; SWEETLOVE, L.J.; FERNIE, A.R. Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit developmental and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior. **Plant Physiology**, Rockville, v. 142, p. 1380-1396, 2006.

CARVALHO, R.F.; CAMPOS, M.L.; PINO, L.E.; CRESTANA, S.L.; ZSOGON, A.; LIMA, J.E.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: Micro-Tom as an effective toolkit for plant development research. **Plant Methods**, London, v. 7, p. 18, 2011.

CEITA, G.O.; MACÊDO, J.N.A.; SANTOS, T.B.; ALEMANNO, L.; GESTEIRA, A.S.; MICHELI, F.; MARIANO, A.C.; GRAMACHO, K.P.; SILVA, D.C.; MEINHARDT, L.; MAZZAFERA, P.; PEREIRA, G.A.G.; CASCARDO, J.C.M. Involvement of calcium oxalate degradation programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 173, n. 2, p. 106-117, 2007.

CHAE, H.J.; KIM, H.R.; XU, C.; BAILLY-MAITRE, B.; KRAJEWSKA, M.; KRAJEWSKI, S.; BANARES, S.; CUI, J.; DIGICAYLIOGLU, M.; KE, N.; KITADA, D.; MONOSOV, E.; THOMAS, M.; KRESS, C.K.; BABENDURE, J.R.; TSIEN, R.Y.; LIPTON, S.A.; REED, J.C. BI-1 regulates and apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 15, p. 355–366, 2004.

CHAIDAMSARI, T. **Biotechnology for cocoa pod borer resistance in cocoa**. 2005. PhD (Thesis) - Wageningen University, Wageningen, 2005.

CHARTERS, M.Y.M.; WILKINSON, M.J. The use of self-pollinated progenies as "in groups" for the genetic characterization of cocoa germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 100, p. 160-166. 2000.

CHICHKOVA, N.V.; KIM, S.H.; TITOVA, E.S.; KALKUM, M.; MOROSOV, V.S.; RUPTSOV, Y.P.; KALININA, N.O.; TALIANSKY, M.E.; VARTAPETIAN, A.B. A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. **The Plant Cell,** Rockville, v. 16, p. 157–171, 2004.

COSTA, M.D.L.; REIS, P.A.B.; VALENTE, M.A.S.; IRSIGLER, A.S.T.; CARVALHO, C.M.; LOUREIRO, M.E.; ARAGÃO, F.J.L.; BOSTON, R.S.; FIETTO, L.G.; FONTES, E.P.B. A new branch of endoplasmic reticulum stress signalling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death. Journal of Biological Chemistry, Bethesda, v. 283, p. 20209-20219, 2008.

COUPE, S.A.; WATSON, L.M.; RYAN, D.J.; TATYANA, T.P.; EASON, J.R. Molecular analysis of programmed cell death during senescence in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*: cloning broccoli LSD1, Bax inhibitor and serine palmitoyltransferase homologues. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 394, p. 59–68, 2004.

CURTIS, M.D.; GROSSNIKLAUS, U. A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in plant. **Plant Physiology**, Rockville, v. 133, p. 462-469, 2003.

DAN, Y.; YAN, H.; MUNYIKWA, T.; DONG, J.; ZHANG, Y.; ARMSTRONG, C.L. MicroTom – a high-throughput model transformation system for functional genomics. **Plant Cell Reports**, New York, v. 25, p. 432-441, 2006.

DANDEKAR, A.M.; McGRANAHAN, G.H.; LESLIE, C.A.; URATSU, S.L. *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos as a method for the production of transgenic plants. Journal of Tissue Culture Methods, Gaithersburg, v. 12, n. 4, p. 145-149, 1989.

DANGL, J.L.; DIETRICH, R.A.; THOMAS, H. Senescence and Programmed Cell Death. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEN, W.; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants.** Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1044-1100.

DANON, A.; DELORME, V.; MAILHAC, N.; GALLOIS, P. Plant programmed cell death: A common way to die. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, p. 647-655. 2000.

DE ARRUDA, M.C.C.; SEPULVEDA, G.F.; MILLER, R.N.G.; FERREIRA, M.A.S.V.; SANTIAGO, D.V.R.; RESENDE, M.L.V.; DIANESE, J.C.; FELIPE, M.S.S. *Crinipellis brasiliensis*, a new species based on morphological and molecular data. **Mycologia**, New York, v. 97, p. 1348–1361, 2005.

DE VICENTE, M.C.; TANKSLEY, S.D. QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. **Genetics**, Bethesda, v. 134, p. 585-596, 1993.

DEGANELLO, J. **Avaliação da contribuição dos hormônios vegetais na interação** *Moniliophthora perniciosa x Solanum lycopersicum*. 2012. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

DIAS, L. A. S. Melhoramento genético do cacaueiro. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2001. 578 p.

DICKMAN, M.B.; PARK, Y.K.; OLTERSDORF, T.; LI, W.; CLEMENTE, T.; FRENCH, R. Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 98, p. 6957–6962, 2001.

DRIVER, J.A.; KUNIYUKI, A.H. In vitro propagation of paradox walnut rootstock. **HortScience**, St. Joseph, v. 19, n. 4, p. 507-509, 1984.

DUAN, Y.; ZHANG, W.; LI, B.; WANG, Y.; LI, K.; SODMERGEN; HAN, C.; ZHANG, Y.; LI, X. An endoplasmic reticulum response pathway mediates programmed cell death of root tip induced by water stress in *Arabidopsis*. **The New Phytologist**, London, v. 186, p. 681–695, 2010.

ESKES, A.; LANAUD, C. Cocoa. In: CHARRIER, A.; JACQUOT, M.; HAMON, S.; NICOLAS, D. (Ed.). L'Amelioration des plantes tropicales. Paris: CIRAD/ORSTROM, 1997.

EVANS, H.C. Uma reavaliação do ciclo de vida da vassoura de bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacau. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 4, p. 104-109, 1979.

EVANS, H.C. Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. Transactions of the British Mycological Society, Cambridge, v. 74, n. 3, p. 515-523, 1980.

FAO. **Statistical databases**. Rome, 2012. Disponível em: <<u>https://www.fao.org.br/</u>>. Acesso em: 12 jun. 2012.

FELLBRICH, G.; ROMANSKI, A.; VARET, A.; BLUME, B.; BRUNNER, F.; ENGELHARDT, S.; FELIX, G.; KEMMERLING, B.; KRZYMOWSKA, M.; NÜRNBERGER, T. NPP1, a *Phythophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 375-390, 2002.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J. Development of nucellar somatic embryos of *Theobroma cacao*. Acta Horticulturae, The Hague, v. 336, p. 231-236, 1993.

FIGUEIRA, A.; ALEMANNO, L. Cacao (*Theobroma cacao*)- Sterculiaceae. In: LITZ, R.E. (Ed.). **Biotechnology of fruit and nut crops**. Wallingford: CABI, 2005. p. 639-669. (Biotechnology in Agricultural Series, 29).

FRARY, A.; NESBITT, T.C.; FRARY, A.; GRANDILLO, S.; VAN DER KNAAP, E.; CONG, B.; LIU, J.; MELLER, J.; ELBER, R.; ALPERT, K.B.; TANKSLEY, S.D. *fw2.2*: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. **Science**, Washington, DC, v. 289, p. 85-88, 2000.

FRAY, R.; GRIERSON, D. Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and cosuppression. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 22, p. 589-602, 1993.

GAMBORG, O.L. Aromatic metabolism in plants. Enzymes of shikimate pathway in suspension cultures of plant cells. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, v. 44, n.6, p. 791-799, 1966.

GARCÊS, H.; DURZAN, D.; PEDROSO, M.C. Mechanical stress elicits Nitric Oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. **Annals of Botany**, London, v. 87, p. 567-574, 2001.

GARCIA, O.; MACEDO, J. A.; TIBURCIO, R.; ZAPAROLE, G.; RINCONES, J.; BITTENCOURT, L. M.; CEITA, G. O.; MICHELI, F.; GESTEIRA, A.;MARIANO, A. C.; SCHIAVINATO, M. A.; MEDRANO, F. J.; MEINHARDT, L. W.; PEREIRA, G. A.; CASCARDO, J. C. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches'broom in *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, p. 443-455, 2007.

GESTEIRA, A.S.; MICHELI, F.; CARELS, N.; SILVA, A.; GRAMACHO, K.P.; SCHUSTER, I.; MACÊDO, J.N.; PEREIRA, G.A.G.; CASCARDO, J.C.M. Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora perniciosa*. Annals of Botany, London, v. 100, p. 129–140, 2007.

GILLASPY, G.; BEN-DAVID, H.; GRUISSEM, W. Fruits: a developmental perspective. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 1439-1451, 1993.

GIOVANNONI, J.J. Genetic regulation of fruit development and ripening. The Plant Cell, Rockville, v. 16, p. S170-S180, 2004.

GIOVANNONI, J. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. Current Opinion in Plant Biology, London, v. 10, p. 283-289, 2007.

GOVRIN, E.M.; LEVINE, A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. Current Biology, London, v. 10, p. 751–757, 2000.

GREENBERG, J.T. Programmed cell death: A way of live for plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 93, p. 12094-12097, 1996.

GREENBERG, J.T.; YAO, N. The role and regulation of programmed cell death in plantpathogen interactions. **Cell Microbiology**, New York, v. 3, n. 6, p. 201-211, 2004.

GRIFFITH, G.W.; HEDGER, J.N. The breeding biology of biotypes of the witches'broom pathogen of cocoa, *Crinipellis perniciosa*. **Heredity**, London, v. 72, p. 278-289, 1994.

GRIFFITH, G.W.; BRAVO-VELASQUEZ, E.; WILSON, F.J.; LEWIS, D.M.; HEDGER, J.N. Autecology and evolution of the Witches' Broom pathogen (*Crinipellis perniciosa*) of cocoa. In: BLAKEMAN, J.P.; WILLIAMSON, B. (Ed.). Ecology of plant pathogens. Oxford: British Society for Plant Pathology, 1994. chap. 15, p. 245-267.

GUILTINAN, M. Cacao. In: PUA, V.E.; DAVEY, M. (Ed.). Biotechnology in agriculture and forestry - Transgenic Crops VI. Heidelberg: Springer-Verlag, 2007.

HAMMOND-KOSAK, K.; JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology, Palo Alto, v. 48, p. 575-607, 1997.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: ASPP, 2000. p. 1102-1156.

HARA-NISHIMURA, I.; HATSUGAI, N.; NAKAUNE, S.; KUROYANAGI, M.; NISHIMURA, M. Vaculolar processing enzyme: an executor of plant cell death. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 404-408, 2005.

HATSUGAI, N.; KUROYANAGI, M.; YAMADA, K.; MESHI, T.; TSUDA, S.; KONDO, M.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. A plant vacuolar protease, VPE mediates vírus-induced hypersensitive cell death. **Science**, Washington, DC, v. 305, p. 855-858, 2004.

HILLE, J.; KOORNNEEF, M.; RAMANNA, M.S.; ZABEL, P. Tomato: a crop species amenable to improvement by cellular and molecular methods. **Euphytica**, Wageningen, v. 42, p. 1-23, 1989.

HOEBERICHTS, F.A.; HAVE, A.T.; WOLTERING, E.J. A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. **Planta**, Berlin, v. 217, p. 517-522, 2003.

HONG, S.J.; LEE, S.K. Changes in endogenous plant hormones during ripening of tomato fruits. Acta Horticulturae, The Hague, n. 343, p. 220-224, 1993.

HONG, Y.; WANG, T.W.; HUDAK, K.A.; SCHADE, F.; FROESE, C.D.; THOMPSON, J.E. An ethylene-induced cDNA encoding a lipase expressed at the onset of senescence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 97, n. 15, p. 8717-8722, 2000.

HÜCKELHOVEN, R.; DECHERT, C.; KOGEL, K.H. Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of Mlo-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 100, p. 5555–5560, 2003.

HÜCKELHOVEN, R. BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. **Apoptosis**, Heidelberg, v. 9, p. 299–307, 2004.

HÜCKELHOVEN, R. Cell Wall – associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 101-127, 2007.

IHARA-OHORI, Y.; NAGANO, M.; MUTO, S.; UCHIMIYA, H.; KAWAI-YAMADA, M. Cell death suppressor *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 is associated with calmodul in binding and ion homeostasis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, p. 650–660, 2007.

ISAACSON, T.; RONEN, G.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for production of β -carotene and xanthophylls in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 333-342, 2002.

ISHIKAWA, T.; WATANABE, N.; NAGANO, M.; KAWAI-YAMADA, M.; LAM, E. Baxinhibitor-1: a highly conserved endoplasmic reticulum-resident cell death suppressor. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 18, p. 1271–1278, 2011.

IWATA, Y.; KOIZUMI, N. Unfolded protein response followed by induction of cell death in cultured tobacco cells treated with tunicamycin. **Planta**, Berlin, v. 220, p. 804–807, 2005.

JARVIS, W.R Taxonomy. In: COLEY-SMITH, J.R.; VERHOEF, K.; JARVIS, W.R. (Ed.). **The biology of** *Botrytis*. London: Academic Press, 1980. p. 1–18.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. Gus fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 6, n. 13, p. 3901-3907, 1987.

JENNINGS, J.C.; APEL-BIRKHOLD, P.C.; MOCK, N.M.; BAKER, C.J.; ANDERSON, J.D; BAILEY, B.A. Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep 1 from *Fusarion oxysporum*. **Plant Science**, Kidlington, v. 161, p. 891-899, 2001.

JONES, A. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, n. 5, p. 225-230, 2000.

JONG, A.J.D.; HOEBERICHTS, F.A.; YAKIMOVA, E.T.; MAXIMOVA, E.; WOLTERING, E.J. Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells: involvement of caspase-like proteases. **Planta**, Berlin, v. 211, p. 656-662, 2000.

KATSUHARA, M. Apoptosis-like cell death in barley roots under salt stress. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 38, p. 1091-1093, 1997.

KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. GATEWAYTM vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, n. 5, p. 193-195, 2002.

KAWAI, M.; PAN, L.; REED, J.C.; UCHIMIYA, H. Evolutionally conserved plant homologue of the Bax-induced cell death in yeast. **FEBS Letter**, Amsterdam, v. 464, p. 143–147, 1999.

KAWAI-YAMADA, M.; JIN, L.; YOSHINAGA, K.; HIRATA, A.; UCHIMIYA, H. Mammalian Bax-induced plant cell death can be down regulated by over-expression of Arabidopsis Bax Inhibitor–1 (*AtBI-1*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 98, p. 12295–12300, 2001.

KAWAI-YAMADA, M.; OHORI, Y.; UCHIMIYA, H. Dissection of Arabidopsis Bax inhibitor-1 suppressing Bax, hydrogen peroxide and salicylic acid-induced cell death. **Plant** Cell, Rockville, v. 16, p. 21–32, 2004.

KHANNA, H.K.; PAUL, J.Y.; HARDING, R.M.; DICKMAN, M.B.; DALE, J.L. Inhibition of *Agrobacterium*-induced cell death by antiapoptotic gene expression leads to very high transformation efficiency of banana. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 20, n. 9, p. 1048-1054, 2007.

KILARU, A.; HASENSTEIN, K.H. Development and pathogenicity of the fungus *Crinipellis perniciosa* on interaction with cacao leaves. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, p. 101-107, 2005.

KOO, A.J.; CHUNG, H.S.; KOBAYASHI, Y.; HOWE, G.A. Identification of a peroxisomal acyl-activating enzyme involved in the biosynthesis of jasmonic acid in Arabidopsis. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 281, n. 44, p. 33511-33520, 2006.

KOORNNEEF, M.; BADE, J.; HANHART, C.; HORSMAN, K.; SCHEL, J.; SOPPE, W.; VERKERK, R.; ZABEL, P. Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, p. 131-141, 1993.

LACOMME, C.; SANTA CRUZ, S. Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 96, n. 14, p. 7956-7961, 1999.

LAM, E.; KATO, N.; LAWTON, M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. **Nature**, London, v. 411, p. 848–853, 2001.

LAM, E. Controlled cell death, plant survival and development. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 5, p. 305–315, 2004.

LANA, T.G. **Caracterização genética e fisiológica de** *Crinipellis perniciosa.* 2004. 106 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

LEAL JR, G.A.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; FIGUEIRA, A. Genes diferentially expressed in *Theobroma cacao* associated with resistance to witches' broom disease caused by *Crinipellis perniciosa*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 8, n. 3, 279-292, 2007.

LI, W.; CHETELAT, R.T. A pollen factor linking inter- and intraspecific pollen rejection in tomato. **Science**, Washington, Dc, v. 330, p. 1827-1830, 2010.

LI, Z.; TRAORE, A.; MAXIMOVA, S.; GUILTINAN, M.J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, New York, v. 34, n. 4, p. 293-299, 1998.

LIMA, J.E.; CARVALHO, R.F.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A.; PERES, L.E.P. Micro-MsK: a tomato genotype with miniature size, short life cycle and improved *in vitro* shoot regeneration. **Plant Science**, Amsterdam, v. 167, n. 4, p. 753-757, 2004.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of Annual Meeting of International Plant Propagators Society**, Seattle, WA, v. 30, p. 421-427, 1980.

LOPES, J.R.M.; LUZ, E.D.M.N.; BEZERRA, J.L. Suscetibilidade do cupuaçuzeiro e outras espécies vegetais a isolados de *Crinipellis perniciosa* obtidos de quatro hospedeiros diferentes no sul da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 21, p. 601-605, 2001.

LOPEZ-BAEZ, O.; BOLLON, H., ESKES, A.; PETIARD, V. Embryogenèse somatique de cacaoyer Theobroma cacao L. à partir de pièces florales. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 316, p. 579-584, 1993.

LUTRELL, E.S. Parasitism of fungi on vascular plants. Mycologia, New York, v. 66, n. 1, p. 1-15, 1974.

MARELLI, J. P; MAXIMOVA, S. N.; GRAMACHO, K. P.; KANG, S.; GUILTINAN, M. J. Infection Biology of *Moniliophthora perniciosa* on *Theobroma cacao* and Alternate Solanaceous Hosts. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 2, p. 149-160, 2009.

MATSUMURA, H.; NIRASAWA, S.; KIBA, A.; URASAKI, N.; SAITOH, H.; ITO, M.; KAWAI-YAMADA, M.; UCHIMIYA, H.; TERAUCHI, R. Overexpression of Bax-inhibitor suppresses the fungal elicitor induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells. **Plant Journal**, Oxford, v. 33, p. 425–434, 2003.

MAXIMOVA, S.N.; ALEMANNO, L.; YOUNG, A.; FERRIERE, N.; TRAORE, A.; GUILTINAN, M. Efficiency, genotypic variability and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, New York, v. 38, n. 3, p. 252-259, 2002.

MAXIMOVA, S.; MILLER, C.; ANTÚNEZ De MAYOLO, G.; PISHAK, S.; YOUNG, A.; GUILTINAN, M.J. Stable transformation of *Theobroma cacao* L. and influence of matrix attachment regions on GFP expression. **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, n. 9, p. 872-883, 2003.

MAXIMOVA, S.N.; YOUNG, A.; PISHAK, S.; MILLER, C.; TRAORE, A.; GUILTINAN, M.J. Integrated system for propagation of *Theobroma cacao* L. In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K. (Ed.). **Protocol for somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 209–229.

MAXIMOVA, S.N.; MARELLI, J.P.; YOUNG, A.; PISHAK, S.; VERICA, J.A.; GUILTINAN, M.J. Over-expression of cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. **Planta**, Berlin, v. 224, p. 740-749, 2006.

MAXIMOVA, S.N.; YOUNG, A.; PISHAK, S.; GUILTINAN, M.J. Field performance of *Theobroma cacao* L. plants propagated via somatic embryogenesis. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, New York, v. 44, p. 487-493, 2008.

MEINHARDT, L.W.; BELLATO, C.M.; RINCONES, J.; AZEVEDO, R.A; CASCARDO, .J.C.M.; PEREIRA, G.A.G. *In vitro* production of Biotrophic-like cultures of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma* cacao. Current Microbiology, New York, v. 52, p. 191–196, 2006.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYYATUY, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y. A new model system for tomato genetics. **Plant Journal**, Oxford, v. 12, p. 1465-1472, 1997.

MITTLER, R. Cell death in plants. In: LOCKSHIN, R.A., ZAKERI, Z.; TILLY, J.L. (Ed.). When cells die. New York: Wiley-Lis, 1998. p. 147-174.

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

NING, S.B.; WANG, L.; LI, Z.Y.; JIN, W.W.; SONG, Y.C. Apoptotic cell death and cellular surface negative charge increase in maize roots exposed to cytotoxic stresses. **Annals of Botany**, London, v. 87, p. 575-583, 2001.

OHYAMA, A.; ITO, H.; SATO, T.; NISHIMURA, S.; IMAI, T.; HIRAI, M. Suppression of acid invertase activity by antisense RNA modifies the sugar composition of tomato fruit. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 36, p. 369-376, 1995.

OLIVEIRA, M.L. Seleção de fungicidas *in vitro* e *in vivo* para o controle da vassoura-debruxa do cacaueiro na região sul da Bahia. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 12, n. 2, p. 111-118, 2000.

PALLAVAN-UNSAL, N.; BUYUKTUNCER, E.; TUFEKCI, M.A. Programmed cell death in plants. Journal of Cell and Molecular Biology, Istanbul, v. 4, p. 9-23, 2003.

PARK, S.H.; MORRIS, J.L.; PARK, J.E.; HIRSCHI, K.D.; SMITH, R.H. Efficient and genotype-independent Agrobacterium-mediated tomato transformation. Journal of Plant **Physiology**, Stuttgart, v. 160, p. 1253-1257, 2003.

PATIL, R.S. Genetic manipulation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) for crop improvement. 1994. 253 p. Thesis (Ph.D. in Botany) – University of Nottingham, Nottingham, 1994.

PEDLEY, K.F.; MARTIN, G.B. Molecular basis of Pro-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 215-243, 2003.

PEDROSO, M.C.; TAVRES, R.; LINO-NETO, T.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.; PAIS, M.S. Early events in somatic embryogenesis induction. In: AHUJA, M.R. et al. (Ed.). Somatic cell genetics and molecular genetics of trees. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. p. 17-22.

PEDROSO, M.C.; DURZAN, D.J. Effect of different gravity environments on DNA fragmentation and cell death in *Kalanchoe* leaves. **Annals of Botany**, London, v. 86, p. 983-994, 2000.

PENCE, V.C. Cacao (*Theobroma cacao* L.). In: BAJAJ, YPS. (Ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. Trees II. Berlin: Springer-Verlag, 1989. v. 5, p. 203-221.

PENNELL, R.I.; LAMB, C. Programmed cell death in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1157-1168, 1997.

PERES, L.E.P.; MORGANTE, P.G.; VECHI, C.; KRAUS, J.E.; VAN SLUYS, M.A. Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of different tomato cultivars and wild related species. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 65, p. 37–44, 2001.

PFAFFL, M.; HORGAN, G.W.; DEMPFLE, L. Relative Expression Software Tool (REST) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 30, n. 9, p. E36, 2002.

PINHEIRO, T.T.; LITHOLDO JUNIOR, C.G.; LEAL JUNIOR, G.A.; SERENO, M.L.; FIGUEIRA, A. Establishing gene references for expression analysis by quantitative amplification of reversed transcripts (RT-qPCR) in *Theobroma cacao* tissues. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 4, p. 3291 – 3305, 2011.

PINO-NUNES, L.E. Controle do desenvolvimento vegetal pela interação auxinacitocinina. Uma nova abordagem baseada no estudo de mutantes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom). 2009. 141 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PINO, L.E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M.S.; SCOTTON, D.C.; BORGO, L.; QUECINI, V.; FIGUEIRA, A.; PERES, L.E.P. The *Rg1* allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato 'Micro-Tom' model system. **Plant Methods**, London, v. 6, p. 23, 2010.

PUNJA, Z.K. The biology, ecology, and control of *Sclerotium rolfsii*. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v.23, p.97-127, 1985.

PURDY, L.H.; DICKSTEIN, E.R. *Theobroma cacao*, a host for *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 73, n. 8, p. 638-639, 1989.

PURDY, L.H.; SCHMIDT, R.A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 573-594, 1996.

QIU, D.; DIRETTO, G.; TAVARZA, R.; GIULIANO, G. Improved protocol for Agrobacterium mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 112, p. 172-175, 2007.

QUEIROZ, V.T; GUIMARÃES, C.T.; ANHERT, D.; SCHUSTER, I.; DAHER, R.T.; PEREIRA, M.G.; MIRANDA, V.R.M.; LOGUERCIO, L.L.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. **Plant Breeding**, Berlin, v. 122, p. 268-272, 2003.

QUTOB, D.; HRABER, P.T.; SOBRAL, B.W.S.; GIJZEN, M. Comparative analysis of expressed sequences in *Phytophthora sojae*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, p. 243-254, 2000.

RICK, C.M.; YODER, J.I. Classical and molecular genetics of tomato: highlights and perspectives. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 22, p. 281-300, 1988.

ROJO, E.; MARTIN, R.; CARTER, C.; ZOUBAR, J.; PAN, S.; PLOTNIKOVA, J.; JIN, H.; PANEQUE, M.; SANCHEZ-SERRANO, J.; BAKER, B. VPEgamma exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 14, p. 1897-1906, 2004.

RYERSON, D.; HEATH, M.C. Cleavage of nuclear DNA into oligonucleossomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 393-402, 1996.

SAIN, S.L.; ODURO, K.K.; FURTEK, D.B. Genetic transformation of cocoa leaf cells using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 37, n. 3, p. 243-251, 1994.
SALMERON, J.M.; OLDROYD, G.; ROMMENS, C.; SCOFIELD, S.R.; KIM, H.S.; LAVELLE, D.T.; DAHLBECK, D.; STASKAWICZ, B.J. Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. **Cell**, New York, v. 86, p. 123-133, 1996.

SANCHEZ, P.; de TORRES-ZABALA, M.; GRANT, M. AtBI-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly up regulated during wounding and pathogen challenge. **Plant Journal**, Oxford, v. 21, p. 393–399, 2000.

SANMARTÍN, M.; JAROSZEWSKII, L.; RAIKHEL, N.; ROJO, E. Caspases. Regulation death since the origin of life. **Plant Physiology**, Rockville, v. 137, p. 841-847, 2005.

SCARPARI, L.M.; MEINHARDT, L.W.; MAZZAFERA, P.; POMELLA, A.W.V.; SCHIAVINATO, M.A.; CASCARDO, J.C.M.; PEREIRA, G.A.G. Biochemical changes during the development of witsches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. Journal of Experimental Botany, Oxford, v. 56, n. 413, p. 865-877, 2005.

SCOTT, J.; HARBAUGH, B. Micro-Tom: a miniature dwarf tomato. Florida Agricultural Experiment Stations, Gainesville, n. 370, p. 1-6, 1989.

SILVA, S.D.V.M.; LUZ, E.D.M.N.; ALMEIDA, L.C.; GRAMACHO, K.P.; BEZERRA, J.L. Redescrição da sintomatologia causada por *Crinipellis perniciosa* em cacaueiro. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 14, n. 1, p. 1-23, 2002. Edição especial.

SILVA, T.E.R.; CIDADE, L.C.; ALVIM, F.C.; CASCARDO, J.C.M.; COSTA, M.G.C. Somatic embryogenesis and plant regeneration in elite clones of *Theobroma cacao*. **Pesquisa** Agropecuária Brasileira, Brasília, DF, v. 43, n. 10, p. 1433-1436, 2008.

SILVA, T.E.R.; CIDADE, L.C.; ALVIM, F.C.; CASCARDO, J.C.M.; COSTA, M.G.C. Studies on genetic transformation of *Theobroma cacao* L.: evaluation of different polyamines and antibiotics on somatic embryogenesis and the efficiency of *uid*A gene transfer by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, p. 287-298, 2009.

SOLOMON, M.; BELENGUI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEM, E.; LEVINE, A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 3, p. 431-443, 1999.

STELLER, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. Science, Washington, DC, v. 267, p. 1445-449, 1995.

STEVENS, M.A.; RICK, C.M. Genetic and breeding. In: ATHERTON, J.G.; RUDICH, J. (Ed.). **The tomato crop**: a scientific basis for improvement. London: Chapman and Hall, 1986. p. 109.

STONE, J.M.; HEARD, J.E.; ASAI, T.; AUSUBEL, F.M. Simulation of fungal mediated cell death by Fumonisin B1 and selection of Fumonisin B1 resistant (fbr) *Arabidopsis* mutants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 1811-1822, 2000.

SUN, H.J.; UCHII, S.; WATANABE, S.; EZURA, H. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 47, p. 426–431, 2006.

SWIDZINSKY, J.A.; SWEETLOVE, L.J.; LEAVER, C.J. A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 4, n. 30, p. 431-446, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAKAHASHI, H.; SHIMIZU, A.; ROSMALAWATI, T.A.S.; FUKUSHIMA, S.; KIKUCHI, M.; HIKICHI, Y.; KANDA, A.; TAKAHASHI, A.; KIBA, A.; OHNISHI, K.; ICHINOSE, Y.; TAGUCHI, F.; YASUDA, C.; KODAMA, M.; EGUSA, M.; MASUTA, C.; SAWADA, H.; SHIBATA, D.; HORI, K.; WATANABE, Y. Catalog of Micro-Tom tomato responses to common fungal, bacterial, and viral pathogens. Journal of General Plant Pathology, Heidelberg, v. 71, p. 8–22, 2005.

TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.W.; PRINCE, J.P.; DE VINCENTE, M.C.; BONIERBALE, M.W.; BROUN, P.; FULTON, F.M.; GIOVANNONI, J.J.; GRANDILLO, S.; MARTIN, G.B.; MESSEGUER, R.; MILLER, J.C.; PATERSON, A.H.; PINEDA, O.; RODER, M.S.; WING, R.A.; WU, W.; YOUNG, N.D. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, Bethesda, v. 132, p. 1141-1160, 1992.

THE TOMATO GENOME CONSORTIUM. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature**, London, v. 485, p. 635-641, 2012.

TORRES, L.E.S; VARGAS, F.D. Apoptosis: the phenomenon and its determination. **Técnica Pecuaria en México**, México, DF, n. 1, v. 41, p. 49-62, 2003.

TÖFOLI, J.G.; FERRARI, J.T.; DOMINGUES, R.J.; NOGUEIRA, E.M.C. Divulgação técnica. *BOTRYTIS* SP. em espécies hortícolas: hospedeiros, sintomas e manejo. **Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 11-20, 2011.

TRAORE, A.; GUILTINAN, M.J. Effects of carbon source and explant type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes. **HortScience**, Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 753-758, 2006.

TRAORE, A.; MAXIMOVA, S.N.; GUILTINAN, M.J. Micropropagation of *Theobroma cacao* L. using somatic embryo-derived plants. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, New York, v. 39, p. 332-337, 2003.

TREVIZAN, S.D.P. Mudanças no sul da Bahia associada à vassoura-de-bruxa do cacao. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12., 1996, Salvador. **Proceedings...** Lagos: Cocoa Producers Aliance, 1996. p. 1109-1116.

VALE, F.X.R.; ZAMBOLIN, L.; ZAMBOLIM, E.M.; ALVARENGA, M.A.R. Manejo integrado das doenças do tomateiro: epidemiologia e controle. In: ALVARENGA, M.A.R. **Tomate**: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia. Lavras: UFLA, 2004. cap. 9, p. 213-308.

VEIT, S.; WORLE, J.M.; NURNBERGER, T.; KOCH, W.; SEITZ, H.U. A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in Carrot, *Arabidopsis* and Tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 832-841, 2001.

VERICA, J.A.; MAXIMOVA, S.N.; STREM, M.D.; CARLSON, J.E.; BAILEY, B.A.; GUILTINAN, M.J. Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. **Plant Cell Reports**, New York, v. 23, p. 404–413, 2004.

WANG, H.; LI, J.; BOSTOCK, R.M.; GILCHRIST, D.G. Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by a Host selective phytotoxin and invoked during development. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 375-391, 1996.

WATANABE, N.; LAM, E. Recent advance in the study of caspase-like proteases and Bax inhibitor-1 in plants: their possible roles as regulator of programmed cell death. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 65–70, 2004.

WATANABE, N.; LAM, E. BAX inhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum-mediated programmed cell death in *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 283, p. 3200–3210, 2008.

WATANABE, N.; LAM, E. Bax-inhibitor-1, a conserved cell death suppressor, is a key molecular switch downstream from a variety of biotic and abiotic stress signals in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 10, p. 3149–3167, 2009.

WHITE, P.R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. **Plant Physiology**, Rockville, v. 9, p. 585–600, 1934.

WILLIAMS, B.; KABBAGE, M.; BRITT, R.; DICKMAN, M.B. AtBAG7, an Arabidopsis Bcl-2-associated athanogene, resides in the endoplasmic reticulum and is involved in the unfolded protein response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 107, p. 6088–6093, 2010.

WILKINSON, J.Q.; LANAHAN, M.B.; YEN, H.C.; GIOVANNONI, J.J.; KLEE, H.J. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by never-ripe. **Science**, Washington, DC, v. 270, p. 1807–1809, 1995.

WILKINSON, M.J. The application and constrains of new technologies in plant breeding. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON NEW TECHNOLOGY IN COCOA BREEDING, 2000, Sabah, Malaysia. Kota Kinabalu: INGENIC, 2000. p. 12–24.

WOLTERING, E.J.; VAN DER BENT, A.; HOEBERICHTS, F.A. Do plant caspases exist? **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 1764–1769, 2002.

XU, Q.; REED, J.C. *Bax-inhibior-1*, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 1, p. 337-346, 1998.

ZHANG, Z.; GURR, S.J. Walking into the unknown: a 'step down' PCR-based technique leading to the direct sequence analysis of flanking genomic DNA. **Gene**, Amsterdam, v. 253, p. 145–150, 2000.

ZSÖGÖN, A.; LAMBAIS, M.R.; BENEDITO, V.A.; FIGUEIRA, A.V.O; PERES, L.E.P. Reduced arbuscular mycorrhizal colonization in tomato ethylene mutants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, p. 259-267, 2008.

ZUPPINI, A.; NAVAZIO, L.; MARIANI, P. Endoplasmatic Reticulum stress-induced programmed cell death in soybean cells. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 117, p. 2591-2598, 2004.