

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE DE GLICANASE ISOLADO
DE UMA BIBLIOTECA DE cDNA DA INTERAÇÃO ENTRE
Theobroma cacao* E *Crinipellis perniciosa

DAHIANA SANTOS BRITTO

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Agosto de 2005

DAHIANA SANTOS BRITTO

**ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE DE GLICANASE ISOLADO DE UMA
BIBLIOTECA DE cDNA DA INTERAÇÃO ENTRE *Theobroma cacao* E
*Crinipellis pernicioso***

**Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.**

**Área de concentração:
Genômica e Expressão Gênica**

**Orientador: Prof. Dr. Abelmon da S.
Gesteira**

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Agosto de 2005

DAHIANA SANTOS BRITTO

**ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE DE GLICANASE ISOLADO DE UMA
BIBLIOTECA DE cDNA DA INTERAÇÃO ENTRE *Theobroma cacao* E
*Crinipellis pernicioso***

**Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.**

APROVADA: 19 de agosto de 2005

Prof. Dr. Paulo S. Monzani

USP

Prof. Dr. Márcio Gilberto C. Costa

UESC

Orientador: Prof. Dr. Abelmon da Silva Gesteira

(Orientador)

UESC

MENSAGEM

A PEDRA

O distraído nela tropeçou...

O bruto a usou como projétil.

O empreendedor, usando-a, construiu.

O camponês, cansado da lida, dela fez assento.

Para meninos, foi brinquedo.

Drummond a poetizou.

Já, David matou Golias, e Michelangelo extraiu-lhe a mais bela escultura...

E em todos esses casos, a diferença não esteve na pedra, mas no homem!
Não existe "pedra" no seu caminho que você não possa aproveitá-la para o seu
próprio "crescimento".
(autor desconhecido)

Aos meus pais, Carmem e Daelto, e
minha irmã, Ryane, as pessoas mais
importantes em minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva de minha existência.

A Neto, amigo e companheiro, que sempre me incentivou.

A minha grande família materna e paterna, que torceram para que eu conseguisse terminar.

As pessoas que estiveram do meu lado contribuindo com o desenvolvimento deste trabalho e aquelas que simplesmente pensaram positivamente:

Ao meu orientador e acima de tudo amigo, Abelmon da Silva Gesteira, que foi uma pessoa fundamental na execução e concretização do trabalho como todo.

Aos pesquisadores e amigos, Fátima Alvim, Andréa Mariano, Fabienne Micheli, Júlio Cascardo, Carlos Priminho e Cristina Pungartinik pela colaboração no desenvolvimento da pesquisa.

Aos especiais colegas de turma Ademilde, Alayne, André, Claudine, Dorival, Lívia, Maíza, Márcia, Rita, Stênio, Sônia, Vanderly e Valéria, pela força e solidariedade.

A Joci, Pelé, Jaci e Robson pela atenção e apoio técnico-emocional.

Ao Programa de Pós-Graduação e a Universidade Estadual de Santa Cruz pela oportunidade.

Aos docentes do curso que contribuíram pela minha formação.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

A CEPLAC na pessoa da Dr^a Karina Gramacho pelo material biológico.

ÍNDICE

EXTRATO	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1. Interação entre <i>Theobroma cacao</i> e <i>Crinipellis perniciosa</i>	03
2.2. Sistema de defesa da planta na interação com o patógeno	05
2.3. Caracterização das glicanases em plantas	09
3. METODOLOGIA.....	13
3.1. Material biológico	13
3.2.1. Obtenção de plantas de <i>T. cacao</i>	13
3.2.2. Cultura do fungo <i>C. perniciosa</i>	13
3.2.3. Obtenção de plantas de <i>N. tabacum</i>	14
3.2. Extração de DNA genômico	14
3.3. Análise genômica por transferência de <i>Southern</i>	15
3.4. Extração de RNA.....	15
3.5. Amplificação dos genes por RT-PCR semi-quantitativo.....	15
3.6. Análise do gene de glicanase da biblioteca de interação <i>T. cacao</i> e <i>C. perniciosa</i>	17

3.7. Clonagem de genes	17
3.7.1. Clonagem de gene para expressão em planta.....	18
3.7.2. Clonagem de gene para expressão em bactéria.....	20
3.8. Transformação de células de <i>E. coli</i>	20
3.9. Transformação de células de <i>A. tumefaciens</i>	22
3.10. Transformação de plantas de <i>N. tabacum</i>	22
3.11. Expressão heteróloga de glicanase	23
3.12. Purificação de proteínas heterólogas expressas em <i>E. coli</i>	24
3.13. Teste de atividade antifúngica da proteína TcGLU.....	24
3.14. Teste de germinação de esporos.....	25
4. RESULTADOS	26
4.1. Análise de seqüência do gene de β -glicanase isolado da interação entre <i>T. cacao</i> e <i>C. perniciosa</i>	26
4.2. Detecção do número de cópias gênicas do gene <i>TcGlu</i>	30
4.3. Produção da proteína TcGLU em bactéria e purificação	31
4.4. Atividade antifúngica <i>in vitro</i> da proteína TcGLU purificada	32
4.5. Análise de expressão do gene <i>TcGlu</i> por RT-PCR semi-quantitativo	34
4.6. Transformação de <i>N. tabacum</i> com o gene <i>TcGlu</i>	35
5. DISCUSSÃO	37
5.1. Gene <i>TcGlu</i> codifica uma endo- β -1,3-1,4-glicanase da família das hidrolases glicosídicas.....	37
5.2. A expressão do gene <i>TcGlu</i> não está relacionado com a interação compatível entre o <i>T. cacao</i> e <i>C. perniciosa</i>	38
5.3. A proteína TcGLU tem uma ação antifúngica sobre o <i>C. perniciosa</i>	40
6. CONCLUSÃO.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

EXTRATO

BRITTO, Dahyana Santos, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, agosto de 2005. **Análise Funcional do Gene de Glicanase Isolado de uma Biblioteca de cDNA da Interação entre *Theobroma cacao* e *Crinipellis perniciosa***. Orientador: Dr. Abelmon da Silva Gesteira. Co-orientadora: Fabienne Micheli. Colaboradora: Fátima Cerqueira Alvim.

A vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo hemibiotrófico *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, é uma das principais doenças que contribui para o declínio na economia da região cacauceira do Sul da Bahia, fazendo com que muitos agricultores abandonassem suas lavouras ou as substituíssem por outras culturas. Contudo, a manutenção da cacauicultura baiana é importante tanto pelo aspecto social quanto pelo aspecto conservacionista, visto que a mesma se desenvolve sob a cobertura de Mata Atlântica, contribuindo para a sua preservação. Devido a estes fatores, as pesquisas na área de melhoramento genético do cacauero foram incentivadas pelos governos federal e estadual visando à obtenção de variedades mais tolerantes à doença. Com este intuito, o estudo funcional de genes que codificam para proteínas PR (*Pathogenesis Related proteins*) é de suma importância, principalmente aqueles que codificam enzimas de degradação da parede celular do fungo, como as glicanases. Estas proteínas, classificadas como PR-2, estão envolvidas no mecanismo de defesa da planta contra o ataque de patógenos. Uma biblioteca de cDNA da interação entre

Theobroma cacao e *Crinipellis pernicioso* foi analisada via BLAST, e um gene de glicanase foi selecionado. Com base nos dados de multi-alinhamento e construção de árvore filogenética, o gene denominado *TcGlu* foi agrupado dentro da família das β -glicanases, uma vez que apresentou alta similaridade a β -glicanases de *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* e *Zea mays*. Análise do número de cópias do gene de glicanase (*TcGlu*) em cacau, acesso catongo, por meio transferência de *Southern* indicou a presença de 3 ou mais cópias do gene. A expressão do *TcGlu* fundido a uma cauda de histidina em *E. coli* permitiu a sua purificação sob condições nativas. A proteína TcGLU em contato com o fungo *C. pernicioso* inibiu seu crescimento hifal, e quando em contato com esporos inibiu a formação de colônias, caracterizando-a como uma típica proteína PR-2. Entretanto, as análises de expressão do gene *TcGlu* em tecidos de *T. cacao* (acesso catongo) aos 45, 60 e 90 dias após a inoculação com o fungo *C. pernicioso*, não indicou aumento nos níveis de transcrição de *TcGlu* em comparação a planta sadia de cacau (controle).

Palavras-chave: *Theobroma cacao*, *Crinipellis pernicioso*, glicanase, estudos funcionais de genes.

ABSTRACT

BRITTO, Dahyana Santos, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Augusto 2005. **Functional analysis of a glucanase gene isolated from a *Theobroma cacao*-*Crinipellis pernicios*a cDNA library**. Advisor: Dr. Abelmon da Silva Gesteira. Committee Members: Fabienne Micheli and Fátima Cerqueira Alvim.

The cocoa Witches' broom disease, caused by the hemibiotrophic fungus *Crinipellis pernicios*a, is one of the main diseases which contributed to the decline, of the economy related to the cocoa culture, in the South of Bahia. Several farmers let their plantations or substituted them by other cultures. Moreover, the cacao culture in Bahia is important for its social and ecological impact, particularly because cacao is cultivated under the Atlantic Rainforest, contributing to its preservation. For these reasons, cocoa genetic breeding researches have been developed by the government to obtain varieties more resistant to the disease. Thus, functional studies of genes encoding Pathogenesis Related proteins (PRs) have a great interest, particularly in the case of genes encoding fungus cell wall degrading enzymes, as glucanases. These proteins, classified as PR-2, are involved in plant defense mechanisms against pathogen attack. A *Theobroma cacao*-*Crinipellis pernicios*a library was screened using Blast tool, and a glucanase gene was isolated. Based on multi-alignment and phylogenetic analysis, the glucanase gene, named *TcGlu*, was related to members of the β -glucanase family,

because it showed high similarity with β -glucanases of *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* and *Zea mays*. The copy number of this gene was determined by *Southern blot* which revealed the presence of at least 3 copies in the genome of cacao (Catongo). The expression in *E. coli* of the TcGlu protein fused to an His-tail allowed its purification under native conditions. The TcGlu incubated with *C. pernicioso* inhibited mycelium growth and colony formation from spores. These results are characteristics of the action of a PR-2 protein. *TcGlu* gene expression analyses in *T. cacao* (Catongo) tissues harvested at 45, 60 and 90 days after inoculation with *C. pernicioso*, did not show any changes of the *TcGlu* transcription levels in comparison to the healthy plant.

keywords: *Theobroma cacao*, *Crinipellis pernicioso*, glucanase, gene functional studies.

LISTA DE FIGURAS DO TRABALHO

1. Esquema do sistema de defesa da planta quando infectado por um patógeno ..7	
2. Esquema da clonagem da região codificadora da glicanase de <i>T. cacao</i> (<i>TcGlu</i>) no plasmídeo pCAMBIA1304	19
3. Esquema da clonagem da região codificadora da glicanase de <i>T. cacao</i> (<i>TcGlu</i>) no plasmídeo pQE32.....	21
4. Alinhamento das seqüências de β -glicanases.....	28
5. Dendograma.....	30
6. Análise genômica do gene <i>TcGlu</i> de <i>T. cacao</i>	31
7. Expressão da β -glicanase de <i>T. cacao</i> em bactéria.....	32
8. Teste de inibição da germinação de esporos de <i>C. pernicioso</i> incubado com a proteína TcGLU.....	33
9. Teste de inibição do crescimento micelial de <i>C. pernicioso</i> incubado com a proteína TcGLU.....	34
10. Análise de RT-PCR semi-quantitativo do gene <i>TcGlu</i>	35
11. Diagnóstico por PCR da clonagem do gene <i>TcGlu</i> em pCAMBIA1304 / gus (-) e transformação via <i>A. tumefaciens</i> da planta de <i>N. tabacum</i>	36

LISTA DE TABELAS

1. Possíveis interações entre planta e patógeno.....	06
2. Tipos de proteínas relacionados à patogênese (PR)	09
3. Substratos específicos das endohidrolases β -glicanases	11
4. Percentagem de similaridade de seqüências de β -glicanases em relação a <i>TcGlu</i>	27
5. Origem e função das proteínas β -glicanases pertencentes à família das hidrolases glicosídicas usadas na análise filogenética.....	29
6. Membros da família PR-2 (β -1,3-glicanases) de tabaco e outras espécies de <i>Nicotina</i>	42

1. INTRODUÇÃO

Entre as principais regiões produtoras de cacau no mundo estão: o Brasil (Bahia), Costa do Marfim, Nigéria, Gana, Camarões, Malásia e Indonésia (SOUZA; DIAS, 2001). A produção de cacau no Brasil, principalmente no Sul da Bahia, teve um papel fundamental no desenvolvimento desta região, gerando empregos e destacando o país no cenário econômico internacional. Além disso, o cacau também auxiliou na conservação da Mata Atlântica, uma vez que necessita de sombreamento para que se desenvolva. Com a chegada do fungo *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer nas lavouras da Bahia, em 1989, houve uma grande mudança no cenário social na população local. A doença vassoura-de-bruxa, causada por este fungo, fez com que muitos agricultores abandonassem suas fazendas, provocando demissões em massa e migração de pessoas da zona rural para a zona urbana; conseqüentemente, a paisagem geográfica das cidades foi afetada, com criação de favelas em suas imediações (TREVIZAN, 1996).

O *C. perniciosa* é uma das 63 espécies conhecidas do gênero *Crinipellis*, da família Tricholomataceae, que corresponde a maior família em número de espécies da ordem Agaricales do filo Basidiomycota. A sua espécie é ainda subdividida em biótipos de acordo com o hospedeiro que ataca (PEREIRA, 2003). O biótipo-C ataca especificamente o cacau e apresenta um ciclo de vida hemibiotrófico, ou seja, se hospeda durante uma fase em tecido vivo e durante outra em tecido morto (GRIFFITH; HEDGER, 1994).

No intuito de combater essa doença, estratégias vêm sendo desenvolvidas e selecionadas por agricultores e instituições competentes. A CEPLAC (Centro de Pesquisas da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – Ilhéus Bahia), por exemplo, vem se esforçando no sentido de substituir grande parte das plantações de cacau suscetíveis ao *C. pernicioso* do sul da Bahia por genótipos tolerantes, pois até o momento, não existe uma medida de controle eficiente (SOUZA; DIAS, 2001).

Estudos com genes que codificam para enzimas de degradação da parede celular do fungo trazem resultados animadores no combate as doenças fúngicas. Estes genes são ativados durante mecanismos de defesa da planta, e os compostos derivados da planta, como oligômeros de quitina e β -1,3-glicano, atuam como moléculas sinalizadoras (elicitores exógenos), os quais se ligam a receptores da membrana e reforçam a indução do sistema de defesa (SLATER et al., 2003).

Diante dos problemas que abrangem a interação entre *T. cacao* e *C. pernicioso*, o presente estudo teve como objetivo principal estudar funcionalmente genes que codificam proteínas PRs (proteínas de resposta à patogênese) envolvidas no mecanismo de defesa do hospedeiro contra o patógeno. O estudo funcional de genes PRs, como o de glicanase, pode contribuir para a elucidação os mecanismos de tolerância na interação *Theobroma cacao:Crinipellis pernicioso*. Este gene foi isolado a partir da biblioteca de cDNA da interação *Theobroma cacao:Crinipellis pernicioso*, sendo posteriormente introduzido em vetor de expressão em bactéria para produção e purificação da proteína heteróloga visando realizar o teste de atividade fúngica contra o *C. pernicioso*. Para testar a atividade antimicrobiana em plantas transgênicas, o gene foi introduzido sob controle do promotor constitutivo CaMV 35S em plantas de tabaco (*N. tabacum*).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Interação entre *Theobroma cacao* e *Crinipellis pernicioso*

O cacau, *Theobroma cacao* L., é uma árvore amplamente cultivada nos trópicos úmidos e é uma cultura economicamente importante para muitos países do Pacífico, Sul da Ásia Oriental, Oeste e Central da África, Central e Sul da América e Caribe (WOOD; LASS, 1985). Nas Américas e no Caribe a vassoura-de-bruxa (VB) pode ser considerada uma das doenças mais arrasadoras do cacau devido a sua ampla destruição, a falta de um controle químico adequado (MOTILAL et al., 2003) e de cultivares resistentes. A introdução do cacau no Brasil deu-se na região Amazônica em 1746, mas foi na Bahia que ocorreu a expansão da produção de cacau no Brasil, a qual ficou livre da VB até 1989 (PURDY; SCHMIDT, 1996).

O fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel), agente causal da vassoura-de-bruxa do cacau, pertencente a ordem Agaricales e a família Tricholomataceae, é endêmico da região da Bacia Amazônica na América do Sul, assim como seu hospedeiro *T. cacao* (PURDY; SCHMIDT, 1996). Este fungo causa uma perda estimada de 250.000 toneladas na produção anual do cacau na América Latina, representando um prejuízo de 235 milhões de dólares. A produção de grãos de cacau no Brasil, devido à doença VB, caiu de 400.000 para 100.000 toneladas

como consequência de 10 anos de infecção pelo *C. pernicioso* (Cp) (BOWERS et al., 2001).

O Cp é um fungo hemibiotrófico com quatro biótipos conhecidos, dos quais o biótipo-C é específico para o cacau. Dois patótipos do biótipo-C existem: A, o qual é mais virulento e está presente na Bolívia, Equador e Colômbia; e o menos virulento B, o qual está presente no Brasil, Trindade-Tobago e Venezuela (MOTILAL et. al., 2003). Este fungo possui dois estágios distintos de infecção: uma fase biotrófica e uma outra necrotrófica ou saprofítica. Na fase biotrófica, o fungo existe como um micélio monocariótico intercelular que causa hipertrofia e hiperplasia do tecido, perda de dominância apical, e proliferação de brotos e raízes axilares, a qual resulta na formação de uma haste anormal denominada vassoura-verde. No segundo estágio, o fungo muda para fase saprofítica, com a difusão intracelular do micélio dicariótico, o qual causa necrose e morte do tecido distal até o ponto original de infecção, formando então a vassoura-seca (EVANS, 1980). A produção de basidiocarpos e formação de esporos pode ocorrer em qualquer tecido necrótico infectado, após alternância de períodos secos e úmidos completando o ciclo da doença (ALMEIDA et al., 1997; SCARPARI et al., 2005).

Atualmente, vários esforços têm sido deflagrados pelos governos federal e estadual, no sentido de conter a doença VB e tentar recuperar a cacauicultura, com a fitossanitação, o controle químico, o lançamento de novas variedades (CEPLAC), clonagem de materiais tolerantes (BIOFÁBRICA) e controle biológico (CEPLAC), dentre outros. A fitossanitação é feita removendo-se e destruindo-se partes doentes da planta com potencial para a produção de basidiocarpos. Esse método, apesar de muito utilizado, não é 100 % seguro, uma vez que muitas partes da planta, ainda em estágio inicial de infecção, passam despercebidas visualmente. Já o controle químico utiliza fungicidas que previne ou reduz a formação de basidiocarpos, mas tem o risco de afetar os grãos do cacau de grande valor comercial (PURDY; SCHMIDT, 1996). Atualmente, um biofungicida denominado Tricovab foi desenvolvido pela CEPLAC/CEPEC a partir do fungo saprofítico antagonista ao Cp *Trichoderma stromaticum*. Ele atua eliminando o fungo por inanição, visto que *T. stromaticum* compete com *C. pernicioso* por

nutrientes e espaço (BASTOS, 2000). Entre os problemas encontrados na utilização deste método se destaca a dificuldade de aplicação deste material nas plantações.

Todas essas abordagens são eficazes, mas não representam uma medida definitiva. A alta variabilidade do fungo, associada a uma razoável taxa de recombinação gênica do mesmo em um curto período de tempo, poderá levar a uma quebra de resistência, como tem sido observado para alguns híbridos de cacau contendo SCA-6 como parental resistente. Visando o controle mais efetivo desta doença, a utilização de proteínas relacionadas à patogênese (PR), como as quitinases e glicanases, poderá ativar o sistema de defesa da planta antes que ocorra a interação patógeno-hospedeiro, ou seja, poderá induzir na planta hospedeira a resistência sistêmica adquirida (SAR) (HAMMERSCHMIDT; SMITH-BECKER, 1999). A SAR se desenvolve sistematicamente ou de forma localizada, e neste caso, a resistência geralmente é efetiva contra um amplo espectro de patógenos e está associada à produção de proteínas relacionadas à patogenicidade (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000).

2.2. Sistema de defesa da planta na interação com o patógeno

A interação entre a planta e o patógeno pode ser dividida em dois tipos básicos: a interação compatível e a interação incompatível (BOS; PARLEVLIET, 1995) (**Tabela 1**). Na interação compatível, o patógeno invade o tecido vegetal, se multiplica e provoca a doença na planta. Na interação incompatível, o patógeno ao penetrar no tecido vegetal, encontra as defesas da planta, que irão impedir sua multiplicação culminando na resistência (CORDEIRO; SÁ, 1999). Hughes (1996) cita como exemplo a interação incompatível entre o tomate e o fungo *Cladosporium fulvum*, onde o gene de avirulência funcional (Avr9) do fungo codifica um peptídeo que atua como molécula sinal (elicitor) induzindo a resposta hipersensibilidade (HR) no tomate carregando o gene de resistência dominante Cf9.

Tabela 1. Possíveis interações entre planta e patógeno.

Tipo de Plantas	Patógenos Virulentos (ausência do gene avr)	Patógenos Avirulentos (presença do gene avr)
Plantas COM gene de RESISTÊNCIA	DOENÇA (Interação Compatível)	SOBRIVÊNCIA DA PLANTA (Interação Incompatível)
Plantas SEM gene de RESISTÊNCIA	DOENÇA (Interação Compatível)	DOENÇA (Interação Compatível)

Fonte: Cordeiro e Sá (1999).

As plantas reagem ao ataque de patógenos pela ativação de um elaborado mecanismo de defesa que atua tanto local quanto sistematicamente. Em muitos casos, a resistência local é manifestada como uma resposta hipersensível (HR), a qual é caracterizada como uma resposta rápida, induzida no vegetal pelo desenvolvimento de lesões que restringem o crescimento e/ou disseminação do fungo avirulento (CORDEIRO; SÁ, 1999; FREITAS, et al., 2003). Mas também, as plantas podem ser sistemicamente protegidas contra doenças causadas pela infecção local de algum patógeno ou por estresse fisiológico ou bioquímico. Este fenômeno tem sido denominado de resistência induzida ou resistência sistêmica adquirida (SAR). Vários mecanismos estão associados à resistência induzida na planta, estes incluem a reação hipersensível (HR), a produção de fitoalexinas (metabólito secundário com atividade antimicrobiana) e de proteínas relacionadas à patogênese (PR), além de deposição de lignina e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (JR; KUÉ, 1996; STICHER, 1997). Sendo assim, a resistência de plantas está correlacionada com a ativação de um conjunto diverso de mecanismos de defesa (**Figura 1**). A resposta envolve a transdução de sinais, como abertura de canais de íons, modificações do status de fosforilação de proteínas e ativação transcricional de numerosos genes relacionados à defesa e de enzimas pré-formadas para promover modificações específicas no

metabolismo primário e secundário (CORDEIRO; SÁ, 1999; HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000).

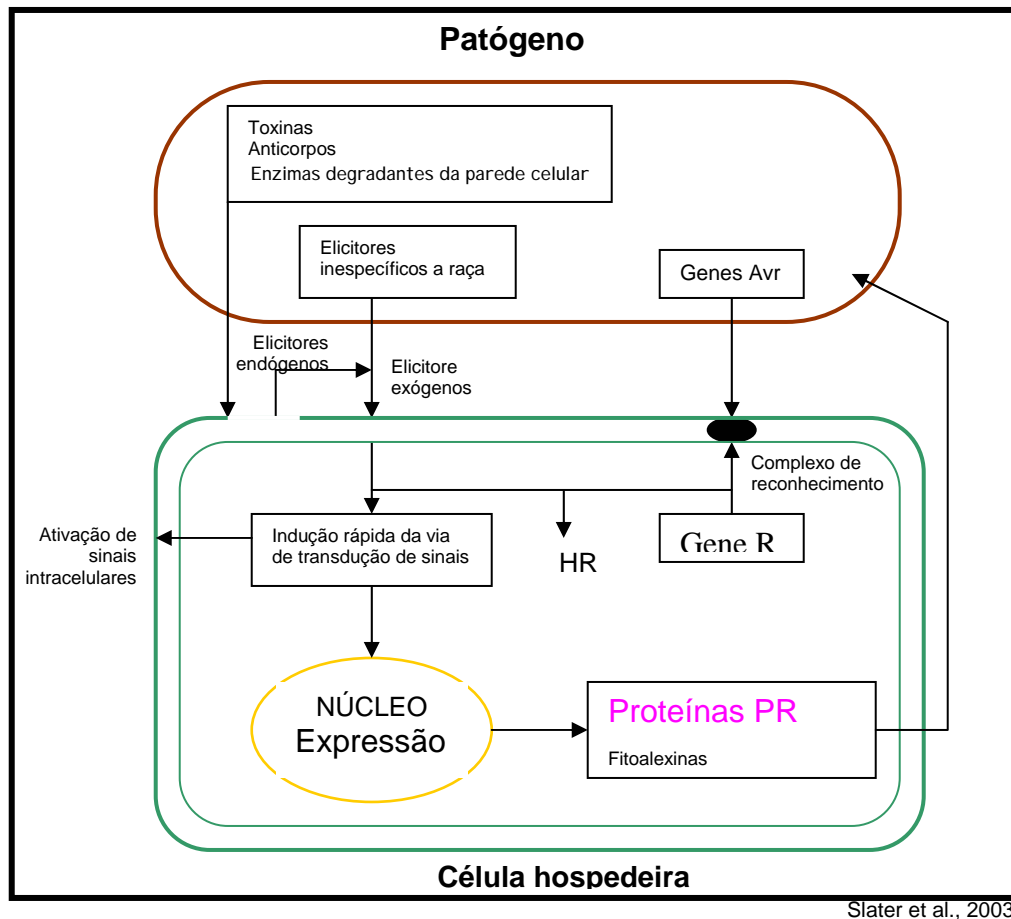


Figura 1. Esquema do sistema de defesa da planta quando infectado por um patógeno.

A transdução de sinal ocorre nos momentos iniciais da interação do patógeno com a planta. É caracterizada, inicialmente, por influxo de íons, além de um processo oxidativo. Este envolve o acúmulo citoplasmático de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), além de aumentar a permeabilidade a íons tais como H^+ e cálcio, a concentração de radicais livres e intermediários reativos do oxigênio (superóxido, um dos primeiros compostos que se formam) e óxido nítrico

(CORDEIRO, SÁ, 1999; DELLEDONNE, et al. 2001). A reação oxidativa gerada na primeira fase da resposta de defesa da planta, por meio da NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) oxidase, permite uma reação cruzada na parede celular, antes de ativar as defesas dependentes de transcrição (CORDEIRO; SÁ, 1999).

A transdução de sinal progride até a ativação de genes, síntese de novas proteínas e, também, envolve o processo de fosforilação e defosforilação de proteínas. Proteínas, tais como fosfolipases, são induzidas permitindo a formação de ácido linolênico a partir da quebra de ácidos graxos não saturados da membrana. E o ácido linolênico, por sua vez, é precursor do ácido jasmônico e metil jasmonato. O ácido jasmônico é um regulador de crescimento vegetal, relacionado com a indução de resposta sistêmica. Além do ácido jasmônico, dois outros reguladores de crescimento vegetal estão envolvidos na resposta de defesa: o ácido salicílico e o etileno. Estes reguladores de crescimento funcionam como elicitores na ativação de genes relacionados à patogênese (**Tabela 2**) (CORDEIRO; SÁ, 1999; HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000; DING et al., 2002). Ding e colaboradores (2002) ao tratar frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Beefstake) com metil jasmonato observaram um aumento substancial na acumulação de transcritos de PR-2b que codifica para beta-1,3-glicanase e um aumento nos níveis de mRNA de PR-2a e PR-3b codificando beta-1,3-glicanase extracelular e quitinase intercelular, respectivamente. Ao tratar com metil salicilato, observaram um aumento substancial na acumulação de mRNAs de PR-2b e PR-3a e um baixo aumento na acumulação de mRNA PR-3b. As proteínas PRs, como as quitinases e glicanases, são enzimas hidrolíticas que degradam polissacarídeos estruturais da parede celular do fungo, levando a produção de oligômeros de quitina e beta-1,3-glicanos, respectivamente (SLATER et al., 2003). Glicanases, como a beta-1,3-glicanase da classe II de cevada, por exemplo, têm sido usadas como ferramenta para aumentar resistência à infecção por fungo. Esta proteína quando expressa em plantas transgênicas de tabaco sobre o controle do promotor CaMV 35S, promoveu uma maior proteção contra o fungo patogênico *Rhizoctonia solani* (SLATER et al., 2003).

Tabela 2. Tipos de proteínas relacionados à patogênese (PR).

Família	Representante	Propriedade
PR-1	PR-1a de tabaco	Antifúngica, 14-17 kDa
PR-2	PR-2 de tabaco	Endo-beta-1,3-glicanases da classe I, II, III, 25-35 kDa
PR-3	P, Q de tabaco	Endoquitinases da classe I, II, IV, 30 kDa
PR-4	R de tabaco	Antifúngica, proteína tipo <i>win</i> , atividade de endoquitinases, similar ao domínio C-terminal de proheveína, 13-19 kDa
PR-5	S de tabaco	Antifúngica, proteína tipo taumatina, osmotina, zeamatina, permeartinas, similar a inibidores de α -amilase/tripsina
PR-6	Inibidor I de tomate	Inibidores de protease, 6-13 kDa
PR-7	P de tomate	Endoprotease
PR-8	Quitinase de pepino	Quitinases de classe III, quitinases/lisozima
PR-9	Peroxidase formando lignina	Peroxidases, proteínas tipo peroxidase
PR-10	PR-1 de salsa	Ribonucleases, proteínas relacionadas a Bet v 1
PR-11	Quitinase da classe IV de tabaco	Atividade de endoquitinases
PR-12	Ps-AFP3 de rabanete	Defensinas de planta
PR-13	THI2.1 de Arabidopsis	Tioninas
PR-14	LTP4 de cevada	Proteínas de transferência lipídicas inespecíficas

Fonte: Hammond-Kosack e Jones (2000) e Slater et al. (2003).

2.3. Caracterização das glicanases em plantas

A indução de proteínas PRs está geralmente acompanhada pelo desenvolvimento de uma resistência local ou sistêmica para infecções ocorridas na hora ou subseqüentes por um abrangente número de patógenos. As características comuns entre as proteínas PRs são a extratabilidade seletiva em baixo pH, baixo peso molecular, localização no espaço intercelular, alta resistência a proteases e indução por ácido salicílico. As proteínas PRs ocorrem em uma ampla variedade de espécies de plantas (cerca de 79 espécies pertencem a 16 famílias taxonômicas, incluindo mono e dicotiledôneas), sugerindo que elas desempenham uma importante função na reação de resistência das plantas (FREITAS et al., 2003).

As hidrolases glicosídil são responsáveis pela clivagem das ligações glicosídicas entre duas ou mais unidades de carboidrato (COOMBS; BRENCHLEY, 2001). Esta família da qual fazem parte as proteínas PR-2, são

constituídas pelas β -1,3-glicanases capazes de catalizar a clivagem tipo endo-hidrolítica de ligações β -1,3-D-glicosídicas em β -1,3-glicanos levando a liberação de glicose (HRMOVA; FINCHER, 2001). As β -1,3-glicanases são abundantes, altamente reguladas e amplamente distribuídas em sementes de várias espécies de plantas. Embora o maior interesse em β -1,3-glicanases se detem na possível função na resposta das plantas a patógenos microbianos, existem evidências que estas enzimas também estão envolvidas num processo fisiológico diverso, incluindo divisão celular, microsporogênese, germinação do pólen e crescimento do tubo, fertilização, embriogênese, amadurecimento do fruto, germinação de semente, mobilização de reservas armazenadas no endosperma de grãos de cereais, quebra de dormência e resposta a ferimentos, frio, ozônio e UVB (LEUBNER-METZGER; JR., 1999).

As glicanohidrolases atuam em pelo menos duas diferentes vias: diretamente, pela degradação da parede celular do patógeno; e, indiretamente por promover a liberação de materiais derivadas da parede celular que podem atuar como elicitores da reação de defesa (LEUBNER-METZGER; JR., 1999). Em geral, glicanases e quitinases são induzidas em plantas infectadas por vírus, bactérias e fungos patogênicos. Similarmente, elicitores incluindo glicanos de fungos, quitosanos, N-acetilquitooligosacarídeos e glicoproteínas podem induzir a acumulação das duas enzimas (LEUBNER-METZGER; JR., 1999).

As glicanohidrolases de plantas podem ser divididas em três grandes grupos: as β -1,3-glicanases (EC 3.2.1.39), as β -1,3-1,4-glicanases (EC 3.2.1.73) e as β -1,4-glicanases ou endo-celulases (EC 3.2.1.4). A especificidade destas enzimas é mostrada na **tabela 3**. As endo-hidrolases β -1,3-glicano catalisam a hidrólise de ligações β -1,3-glicosil somente onde estiverem presentes vários resíduos glicosil de ligação β -1,3 contínuos. As β -1,3-glicanases não hidrolisam ligações β -1,3-glicosil individuais que estão intercaladas com resíduos β -1,4-glicosil em β -1,3-1,4-glicanos de plantas. Em contraste, β -1,3-1,4-glicanases requerem resíduos β -1,3-glicosil de ligações (1,3) e (1,4). As β -1,3-1,4-glicanases hidrolisam ligações β -1,4-glicosil adjacentes a um resíduo β -1,3-glicosil junto ao

final não reduzido do substrato. Como esperado, as β -1,3-1,4-glicanases não têm atividade em β -1,3-glicanos ou β -1,4-glicanos. Desta forma, β -1,3 e β -1,3-1,4-glicanases são altamente específicas para seus substratos e não ocorre reação cruzada. É notável que as β -1,4-glicanases, ou celulases, hidrolisam resíduos β -1,4-glicosil, não somente em substratos celulósicos, mas também em β -1,3-1,4-glicano de plantas. Neste substrato entretanto, a hidrólise da ligação 1,4 difere da hidrólise pela β -1,3-1,4-glicanase e o produto da hidrólise é por isso diferente (HOJ; FINCHER, 1995).

Tabela 3. Substratos específicos das endo-hidrolases β -glicanases.

Enzima	Substrato e padrão de ação	Produtos
β -1,3-glicanase (EC 3.3.1.39)	-G3G ³ G3G3G3G ³ G3G3G3G3G3G3G3G ³ G3G ⁻ ; β -1,3-glicano -G4G3G4G4G3G4G4G4G3G4G4G3G4G ⁻ ; β -1,3-1,4-glicano -G4G4G4G4G4G4G4G4G4G4G4G4G4G ⁻ ; β -1,4-glicano	G3G3G3G; G3G3G Não hidrolasa Não hidrolasa
β -1,3-1,4-glicanase (EC 3.2.1.73)	-G3G3G3G3G3G3G3G3G3G3G3G3G3G ⁻ ; β -1,3-glicano -G4G3G ⁴ G4G3G ⁴ G4G4G3G ⁴ G4G3G ⁴ G ⁻ ; β -1,3-1,4-glicano -G4G4G4G4G4G4G4G4G4G4G4G4G4G ⁻ ; β -1,4-glicano	Não hidrolisa G4G3G; G4G4G3G Não hidrolisa
β -1,4-glicanase (celulase) (EC 3.2.1.4)	-G3G3G3G3G3G3G3G3G3G3G3G3G3G ⁻ ; β -1,3-glicano -G ⁴ G3G4G ⁴ G3G4G ⁴ G4G3G4G ⁴ G3G4G ⁻ ; β -1,3-1,4-glicano -G4G ⁴ G4G4G ⁴ G4G4G ⁴ G4G4G4G ⁴ G ⁴ G ⁻ ; β -1,4-glicano	Não hidrolisa G3G4G; G4G3G4G; G3G4G4G G4G; G4G4G

Resíduos glicosil no substrato é denominado G, e os números 3 e 4 indicam ligações β -1,3 e β -1,4-glicosil, respectivamente. Por convenção, o terminal não-reduzido do polissacarídeo é orientado para a esquerda e o terminal reduzido para direita. Os números destacados em vermelho indicam as ligações glicosídicas hidrolisadas. Fonte: Hoj e Fincher (1995).

As β -1,3-glicanases são amplamente distribuídas em plantas, em que são classificadas entre as proteínas relacionadas à patogênese que são expressas em resposta ao ataque microbiano (BOLLER, 1987). Em contraste às β -1,3-glicanases, a distribuição de β -1,3-1,4-glicanases em plantas está restrita a cereais e algumas gramíneas, onde funcionam no metabolismo de β -1,3-glicanos encontrados na parede celular destas espécies (BACIC et al., 1988). Por exemplo, as β -1,3-1,4-glicanases desempenham uma função central na degradação da parede do endosperma dos grãos de cereais durante a germinação (FINCHER, 1989).

As β -1,4-glicanos sem cadeias secundárias são unidades poliméricas de celulose, que estão completamente associados a extensivas ligações de hidrogênios para formar longas microfibrilas contendo 36 ou mais glicanos em seção cruzada. Microfibrilas de celulose são elementos estruturais centrais da parede celular de planta, promovendo a força e flexibilidade ao tecido de plantas. As β -1,4-glicanases despolimerizam polissacarídeos contendo ligações β -1,4-D-glicanos e são algumas vezes chamadas de celulases, embora a maioria destas terem baixa atividade em celulose cristalina (LIBERTINI et al., 2004). β -1,4-glicanases de plantas tem sido ligadas a vários processos fisiológicos, incluindo biossíntese e modificação, alongação e diferenciação, citocinese, abscisão de órgãos e amadurecimento de frutos (ROSE; BENNETT, 1999).

Estudos comparativos de endo-hidrolases β -1,3 e β -1,3-1,4-glicanos de cevada (*Hordeum vulgare*) têm revelado um alto grau de similaridade estrutural, tanto em nível de proteína quanto de DNA (HOJ et al., 1988; FINCHER et al., 1989). A identidade posicional das seqüências de aminoácidos entre os dois grupos de enzimas é de 50 %, e muitos domínios altamente conservados têm sido identificados, particularmente perto do terminal COOH. Características estruturais comuns entre os genes correspondentes, incluindo padrões característicos de códons e sítios de inserção de íntrons altamente conservados, promovem evidências de que os genes codificando β -1,3 e β -1,3-1,4-glicanases de cevada compartilham uma história evolucionária comum (CHEN et al., 1993, HOJ; FINCHER, 1995). Outra evidência que fortalece a idéia de um ancestral em comum entre as β -1,3 e β -1,3-1,4-glicanases é a alta similaridade da estrutura tridimensional destas enzimas. Varghese e colaboradores (1994) ao sobrepor a β -1,3-glicanases isoenzima GII e a β -1,3-1,4-glicanases isoenzima EII de cevada, visualizou 50 % de similaridade entre as seqüências de aminoácidos destas proteínas.

3. METODOLOGIA

3.1. Material biológico

3.1.1. Obtenção de plantas de *T. cacao*

As folhas não infectadas do cultivar susceptível catongo de *Theobroma cacao* L. foram coletadas na fazenda experimental da CEPLAC/CEPEC (Ilhéus-BA), mantidas em sacos plásticos até serem congeladas em N₂ líquido e armazenadas em freezer – 80°C. A porção meristemática foi inoculada com suspensão de 1×10^6 basidiósporos.mL⁻¹ de Cp (isolado 1441 CEPEC/CEPLAC) de forma artificial e automatizada. O material vegetal foi coletado e, em seguida, congelado em N₂ líquido após 45, 60 e 90 dias de inoculação, visando estudar diferentes estágios do desenvolvimento da doença.

3.1.2. Cultura do fungo *C. perniciosa*

O fungo *Crinipellis perniciosa* foi cedido pela Dr^a. Karina Gramacho da CEPLAC / CEPEC (Ilhéus – BA). O fungo foi cultivado em meio de crescimento líquido composto de glicose 0,05 %, NH₄H₂PO₄ 0,1 %, KCL 0,02 %, MgSO₄.7H₂O 0,02 %, extrato de levedura 0,2 % (m/v) e CuSO₄.5H₂O 0,1 %, ZnSO₄.7H₂O 0,1 % (p/v). Para confecção do meio sólido foi adicionado ágar 1,6 % (m/v), antes da

autoclavagem. O meio de cultura, tanto líquido quanto sólido, foi esterilizado através de autoclavagem a 121°C (1 atm) durante 20 minutos. Após o inóculo do fungo no meio, este foi incubado a 25°C na incubadora ou no agitador orbital a 200 rpm, dependendo da condição do meio, se sólido ou líquido, respectivamente.

3.1.3. Obtenção de plantas de *N. tabacum*

As plantas de tabaco (*Nicotina tabacum*) foram introduzidas no Laboratório de Cultura de Tecidos através de sementes. Sob condições assépticas, as sementes foram desinfestadas com uma solução de álcool 70 %, por 1 minuto, e hipoclorito de sódio 2 %, por 15 minutos, seguido de três lavagens com água Milli-Q autoclavada. Após a desinfestação, as sementes foram cultivadas em meio de cultura MS-0 (MURASHIGUE SKOOG, 1962), acrescido de vitaminas de Gamborg 1 %, inositol 0,01 %, e ágar 8 g.L⁻¹, e dispostas na sala de crescimento sob as seguintes condições: 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro, 35 μmolesfótons.m².s⁻¹. No período de 15 dias, as plântulas obtidas foram subcultivadas para meio MS-1 (meio MS-0 adicionando-se sacarose 3 %).

3.2. Extração de DNA genômico

Para extração do DNA genômico das plantas de tabaco (*N. tabacum*) selvagem foi utilizado o método CTAB citado por Brasileiro e Carneiro (1998), enquanto que para extração de DNA genômico de cacau (*T. cacao*) foi utilizado um protocolo adaptado por Doyle e Doyle (1990). Aproximadamente 300 mg de material vegetal foram congelados e macerados em nitrogênio líquido. Após adição de 800 μl de tampão de extração (CTAB 2 %, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris - HCl 100 mM pH 8, PVP 2 %, β-mercaptoetanol 0,2 % e proteinase k 20 μg.mL⁻¹), as amostras foram mantidas por 40 minutos a 65°C e então centrifugados (microcentrífuga Eppendorf 5417R) a 14.000 rpm por 5 minutos, para então recuperar o sobrenadante. Foram adicionados 800 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1; v/v), agitados durante 5 minutos, e centrifugado

a 14.000 rpm por 5 minutos. Recuperou-se a fase superior e repetiu este passo mais uma vez antes da precipitação do DNA. A precipitação do DNA foi realizada com isopropanol gelado 1:1 (isopropanol:sobrenadante; v/v) por 18 horas a 4°C e a lavagem do *pellet* com 300 µL de etanol 70 % e depois com etanol 96 %. O precipitado foi ressuspensionado em 50 µL de TE (Tris - HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8) contendo RNase, livre de DNase (80 µg.mL⁻¹) e incubado a 37°C por 30 min. O DNA foi quantificado por espectrofotometria com ABS (_{260/280}).

3.3. Análise genômica por transferência de *Southern*

Para diagnosticar o número de cópias do gene de *TcGlu* nas plantas selvagens de *N. tabacum* e *T. cacao*, foram feitas análises por transferência de *Southern* de acordo com Sambrook et al. (1989). O kit utilizado para marcação de sondas e detecção por quimioluminescência foi o Gene Images Alkphos Direct Labelling and Detection System (Amersham Biotechnology, E.U.A.), seguindo instruções do fabricante.

3.4. Extração de RNA

O RNA total de meristemas das plantas inoculadas e controles de *T. cacao*, utilizado para análises via RT-PCR semi-quantitativo, foi extraído de acordo com o protocolo estabelecido por Gesteira et al. (2003). Para obter RNA de folhas de tabaco, foi utilizado o protocolo desenvolvido por Jones et al. (1985).

3.5. Amplificação dos genes por RT-PCR semi-quantitativo

As análises de RT-PCR semi-quantitativo foram feitas utilizando-se o cDNA das amostras de meristemas de cacau em diferentes estágios de infecção pela vassoura-de-bruxa. Para controle positivo da reação foram utilizados o cDNA e gDNA de plantas sadias de cacau (Catongo).

A síntese da primeira fita de cDNA a partir do RNA total de *T. cacao* controle e em diferentes tempos (45, 60 e 90 dias de infecção pelo fungo *C. pernicioso*), foi feita utilizando-se o kit “SUPERSCRIPT™ Preamplification system for first strand cDNA synthesis” (Gibco - BRL), conforme instruções do fabricante. Utilizou-se 1 µg de RNA total de cada amostra, 0,5 µg.µl⁻¹ dos hexaoligonucleotídeos iniciadores aleatórios, 10 mM dNTPs mix para um volume final de 12 µl. A reação foi incubada por 5 minutos a 65°C, e imediatamente resfriada em gelo. Adicionou-se então First Strand Buffer 1X, 0,1 M DTT e 40 U de inibidor de RNase. As amostras foram incubadas por 2 minutos a 42°C e 200 U da transcriptase reversa Super Script (SSII) foi adicionada. Incubou-se por 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 42°C e 15 minutos a 70°C para inativar as enzimas. Após adição de 5 U de RNase H, a reação foi incubada por 20 minutos a 37°C, para a degradação das fitas de mRNA híbridos, mRNA:cDNA ainda existentes. O cDNA confeccionado foi armazenado a – 20°C.

Os iniciadores de glicanase *TcGlu1* *BglII* F (5'-AGTT**AGATCT**GAAAGAGGATGTCAGGTC-3') e *TcGlu1* *BstEII* R (5'-GGC**GGTGACC**ATCTTCTGATAAGTTGCTC-3') foram utilizados para diagnóstico dos níveis de expressão do gene *TcGlu*.

Cada reação de amplificação de 25 µl conteve 30 ng de cDNA, 0,1 mM de cada um dos deoxinucleotídios (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), MgCl₂ 1,5 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, 0,5 µM de iniciador e uma unidade de Taq DNA polimerase. As reações de amplificação foram efetuadas em termociclador Eppendorf, (Modelo PTC – 200 Peltier Thermal Cycler; MJ – Research). Os ciclos de amplificação foram constituídos de uma etapa de desnaturação a 94 °C, por 45 segundos; uma etapa de ligação do primer ao cDNA molde a 55 °C, por 140 segundos; e uma etapa de extensão a 72 °C, por 120 segundos. Depois de 32 ciclos, efetuou-se uma última etapa de extensão a 72 °C, por sete minutos. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,2 % contendo 0,2 µg.mL⁻¹ de brometo de etídio, imerso em tampão TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta, fotografadas com o sistema Kodak EDAS 190 e analisados por densitometria

utilizando o software Kodak Digital Science™ ID Image Analysis. Para padronização da quantidade de RNA total, utilizou-se o iniciador da proteína ribossomal S18 F 5'-CAAGCGATCTTTTCGTAGG-3' e R 5'-CGAAGATAAAATCCGAGCTTGT-3' nas mesmas condições citadas acima, modificando-se apenas a temperatura de anelamento para 45°C e o número total de ciclos para 28.

3.6. Análise do gene de glicanase da biblioteca de interação *T. cacao* e *C. pernicioso*

O programa “BLAST” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), um algoritmo de alinhamento de seqüências (ALTSCHUL et al., 1990) confrontado ao GenBank, foi utilizado para comparar a seqüência obtida da biblioteca de interação com as proteínas que fazem parte da família das hidrolases glicosídicas, que tem entre seus membros proteínas envolvidas no processo de defesa da planta ao ataque de patógenos (PR), como as β -glicanases.

Para o alinhamento das seqüências e construção de árvore filogenética utilizou-se os programas ClustalX1.81 e ClustalW1.82 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>); para visualização da árvore filogenética foi utilizado o programa TreeView; para tradução das seqüências de nucleotídeos foi utilizado o Six Frame Translation of Sequence (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/Options/sixframe.html>); para predição da massa molecular a partir da estrutura primária da proteína nativa, o Compute pI/Mw tool (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html) foi usado; e, para predição de seqüências conservadas utilizou-se o InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>).

3.7. Clonagem de genes

O gene de glicanase foi clonado em diferentes plasmídios de acordo com o objetivo de cada ensaio. Para os ensaios em plantas, o plasmídio utilizado foi o

vetor binário de expressão pCAMBIA1304 (Cambia - Austrália), substituindo-se o gene *gus* pelo gene da glicanase. Para os ensaios em bactérias, o fragmento de PCR do gene de glicanase foi clonado inicialmente no plasmídeo pTZ57R/T do “InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kit” (Fermentas). A ligação vetor:inserto, neste caso, é facilitada por ocorrer a presença de adeninas extras no produto de PCR e de timinas do plasmídeo pTZ57R/T, sem precisar criar sítios de restrição.

3.7.1. Clonagem de gene para expressão em planta

O plasmídeo pCAMBIA1304, utilizado na clonagem do gene *TcGlu*, possui o gene de resistência a canamicina para seleção em bactéria e o gene *hptII* (higromicina) para seleção em planta. É um típico plasmídeo para estudo de promotores, uma vez que não existe promotor dirigindo seu múltiplo sítio de clonagem. Devido a essa sua limitante característica, o plasmídeo foi modificado para poder aproveitar o promotor constitutivo CaMV35S que dirige o gene repórter *gfp:gusA* (**Figura 2**). Diante disso, foram utilizadas as enzimas *BglII* e *BstEII* para liberar o gene repórter e no mesmo sítio introduzir o fragmento de glicanase após ser amplificado por PCR utilizando os iniciadores específicos *TcGlu1 BglII* F (5'-AGTT**AGATCT**GAAAGAGGATGTCAGGTC-3') e *TcGlu1 BstEII* R (5'-GGCG**GGTGACC**ATCTTCTGATAAGTTGCTC-3').

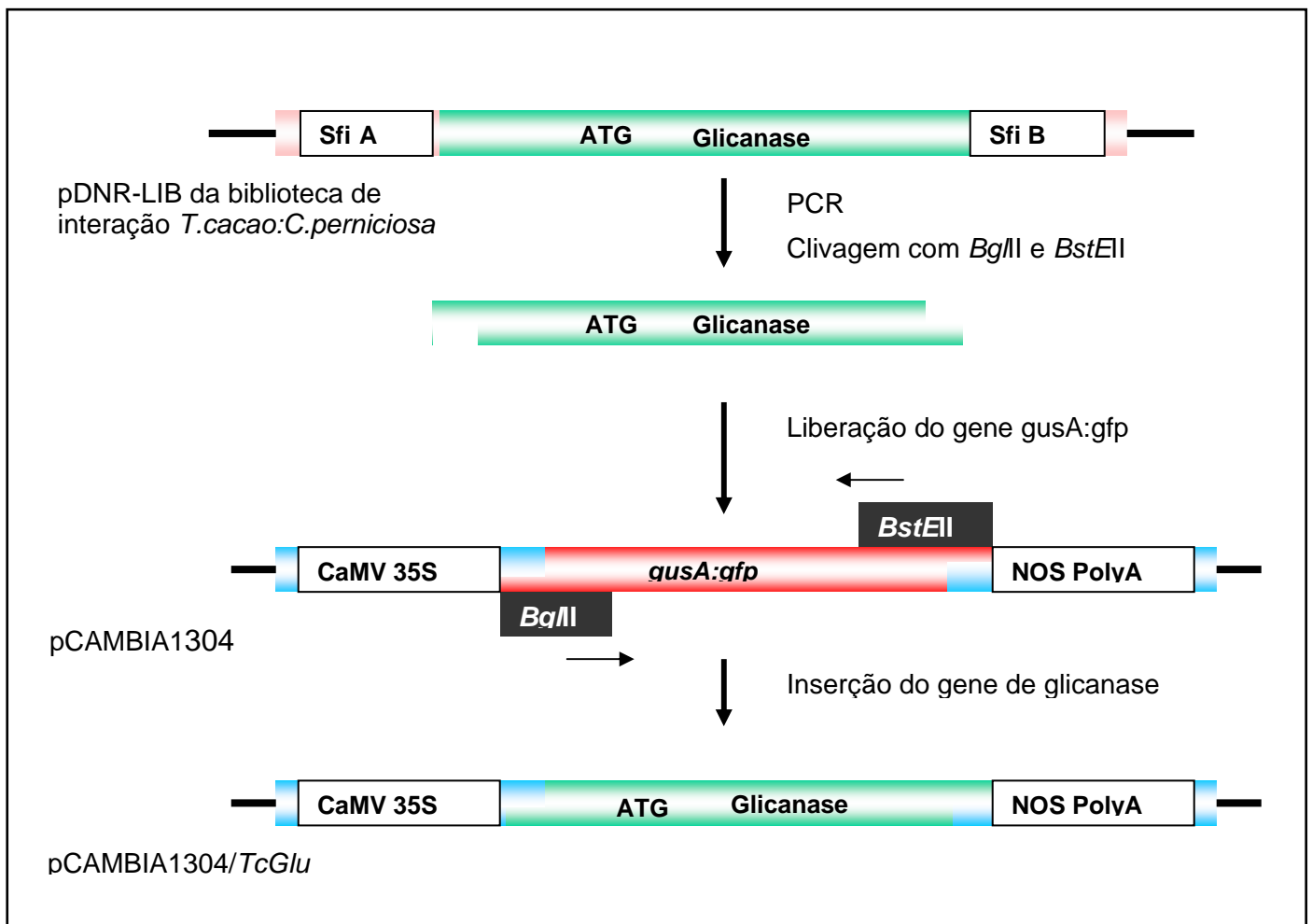


Figura 2. Esquema da clonagem da região codificadora da glicanase de *T. cacao* (*TcGlu*) no plasmídeo pCAMBIA1304.

3.7.2. Clonagem de gene para expressão em bactéria

Para a produção da proteína heteróloga, o gene da glicanase foi obtido por PCR utilizando os iniciadores específicos TcGlu2 F com sitio de restrição para as enzimas *Bam*HI / e *Nde*I (5'-GGC**GGGATCCATATG**TCAGGTCCGCAGTGC-3'), e TcGlu2 R, com sitio de restrição para enzima *Sa*II (5'-GGC**GGTCTGACTCAGGGTTTAGCTTTTAAG**-3'). Este produto foi clonado no vetor pTZ57R/T da "InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kit" (Fermentas). Após a clonagem, o fragmento foi liberado utilizando as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sa*II e, em seguida, clonadas no plasmídio pQE32 (Qiagen) que possui a cauda de seis histidinas (Hist₆ tag ou Hist tag) na porção N-terminal. Nesse sistema, o gene foi clonado sob o controle do promotor T5 (**Figura 3**).

3.8. Transformação de células de *E. coli*

Para a transformação de *E. coli*, 5 µL da reação de ligação foram incubados com as células competentes, preparadas por CaCl₂, por 30 minutos no gelo. Em seguida, esta amostra foi mantida a 42°C por 1 minuto e incubada no gelo por 2 minutos. Após este tempo, adicionou-se 1 mL de LB (acrescido de MgSO₄ 4 mM e KCl 10 mM) e as células foram crescidas a 37°C por 1 hora em banho-maria.

Após a incubação, as células foram centrifugadas por 30 segundos a 12.000 rpm a temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante, e ressuspendeu-se o *pellet* em 200µL de meio LB. Em seguida, as células foram plaquedas em meio seletivo e incubadas a 37°C de 12 a 16 horas.

As células TOP10 transformadas com o plasmídio pQE32 foram distribuídas em LB acrescido de ampicilina 100 µg.mL⁻¹. As células de BL21(λDE3)pLysS com a mesma construção foram cultivadas em ampicilina a 100 µg.mL⁻¹ e cloranfenicol a 34 µg.mL⁻¹. O diagnóstico da transformação foi feito após extração de DNA plasmidial utilizando enzimas de restrição, *Bam*HI e *Sa*II, que flanqueiam o gene.

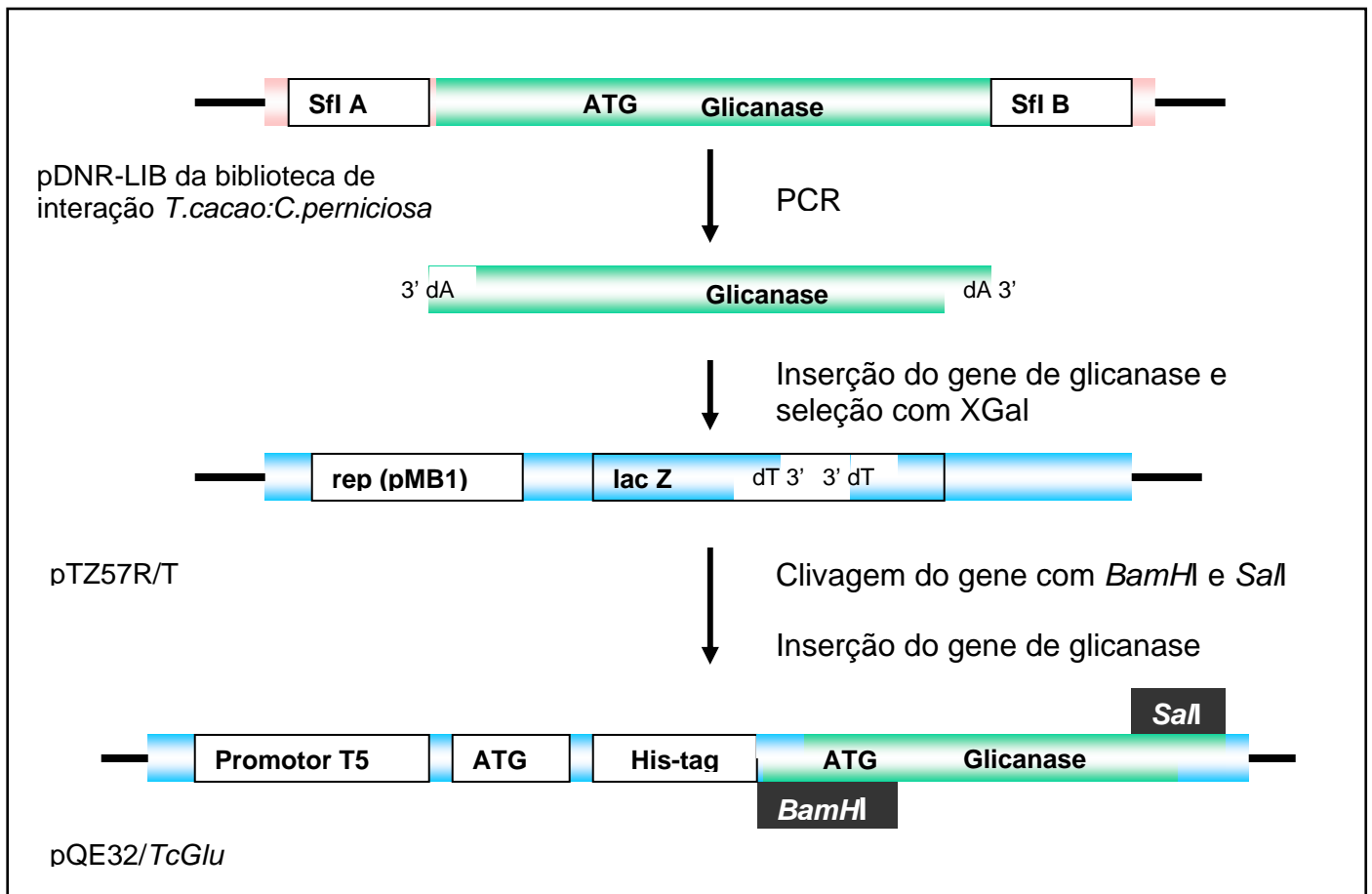


Figura 3. Esquema da clonagem da região codificadora da glicanase de *T. cacao* (*TcGlu-2*) no plasmídio pQE32.

3.9. Transformação de células de *A. tumefaciens*

A transformação de células de *Agrobacterium tumefaciens* (GV3850) foi feita por eletroporação. Adicionou-se a estas células aproximadamente 50 ng do plasmídeo e eletroporou-se usando 2.500 volts (4 a 5 msec). Adicionou-se em seguida 1 mL de meio Rhizo (extrato de levedura 5 %, caseína 0,5 %, manitol 8 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 % e NaCl 5% (m/v), pH ajustado 6,6 com KOH tempo de incubação, o meio contendo bactéria foi centrifugado por 1 minuto a 10.000 rpm, decartou-se o sobrenadante deixando apenas 100 μL , no qual o *pellet* foi ressuspensionado. Em seguida, colocou-se 10 μl em placas de petri contendo meio Rhizo com 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ampicilina e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ canamicina.

O diagnóstico e confirmação dos transformantes de agrobactéria com a construção contendo o gene *TcGlu-2* foi feito utilizando-se PCR diretamente das colônias. Comprovado os clones verdadeiros, estes foram estocados em freezer – 80 °C em estoque de glicerol 16 %.

3.10. Transformação de plantas de *N. tabacum*

Células de agrobactérias (*Agrobacterium tumefaciens* - GV3850) contendo a construção com o DNA de interesse foram crescidas em 50 mL meio Rhizo com 50 mg.L^{-1} de canamicina e 100 mg.L^{-1} de streptomomicina e incubadas a 28 °C a 220 rpm por 18 horas, até atingir $\text{OD}_{600} = 0,5$.

A cultura foi centrifugada a 5.000 rpm por 5 minutos a 14 °C e o *pellet* ressuspensionado em 4 mL de meio MS líquido sem antibiótico. Estas células foram crescidas em 50 mL de meio MS líquido sem antibiótico até obter uma $\text{OD}_{600} = 0,5$, para só então incubar por 15 minutos sob agitação à temperatura ambiente, os explantes de *Nicotiana tabacum* que foram cortados e mantidos em meio MS sólido sem antibiótico na sala de crescimento, com 24 horas de antecedência. Os explantes foram lavados em água estéril e enxugados em papel de filtro estéril. Os explantes foram co-cultivados 48 horas em meio MS sólido sem adição de antibióticos e reguladores de crescimento e, após este período, transferidos para

meio MS sólido com 10 mg.L^{-1} de higromicina, 500 mg.L^{-1} de cefatoxina e 5 mg.L^{-1} de BAP. As placas foram colocadas na sala de crescimento de plantas. Os explantes foram transferidos para meio MS sólido de regeneração (meio MS acrescido de $0,5 \text{ mL.L}^{-1}$ de BAP) após 4 semanas.

3.11. Expressão heteróloga de glicanase

As bactéria BL21(λ DE3)pLysS portando o clone pUESC22, fusão do pQE32 com o gene *TcGlu-2*, foram inoculadas em dois mL de meio LB com ampicilina $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e cloranfenicol $34 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e incubadas a 37°C a 200 rpm por 18 horas. Após este período, $500 \text{ }\mu\text{L}$ deste meio foram utilizados para inocular 5 mL de meio LB com ampicilina $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e cloranfenicol $34 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. Incubou-se por 1 hora a 37°C a 200 rpm e, em seguida, procedeu-se indução com a adição de 1 e 2 mM de IPTG. A partir deste momento, as culturas foram cultivadas a 28°C e 37°C e alíquotas de $200 \text{ }\mu\text{L}$ foram coletadas com 1, 5 e 29 horas e, em seguida, centrifugadas por 2 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em $50 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão de corrida 1X.

Para a eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), as amostras foram preparadas com tampão de amostra 1X e fervidas por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 14.000 rpm e aplicadas em gel SDS-PAGE 10 %. A voltagem aplicada para corrida foi de 100 V por 1,5 horas e, ao final, o gel foi corado com comassie Blue R-250 e descorado com ácido acético 7 %.

Com o objetivo de obter a proteína heteróloga purificada, foi realizada a indução da mesma em condições ótimas previamente testadas como descrito acima e seguindo as recomendações do “pET System Manual” (NOVAGEN). Desta forma, células de BL21(λ DE3)pLysS contendo o gene *TcGlu-2* foram crescidas por 24 horas em 5 mL de meio LB com antibióticos de seleção, transferidas para 200 mL de LB com ampicilina $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e cloranfenicol $34 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, e incubadas por 2 horas a 28°C a 200 rpm antes da adição de IPTG 1mM. Após as 30 horas de indução, as células foram coletadas por centrifugação

a 5.000 g por 10 minutos e, em seguida, ressuspenas em ¼ do volume inicial, em tampão Tris - HCl 50 mM, pH 8.0 e EDTA 2 mM gelado, e novamente centrifugada. O precipitado congelado a – 80°C.

3.12. Purificação de proteínas heterólogas expressas em *E. coli*

Para purificação da proteína em condições nativas, as células congeladas foram descongeladas e ressuspenas em 30 mL de tampão Tris - HCl 20 mM, pH 8.0 e em detergente NONIDET P40 2 %, incubadas por 1 hora a 37°C em banho-maria e centrifugadas a 20.000 g por 40 minutos a 4°C. O volume da amostra foi então completado para 40 mL com tampão Tris - HCl 20 mM, pH 8.0, imidazol 10 mM e NaCl 1 M, e em seguida, filtrada em membrana de 0,45 µm e aplicada em coluna de cromatografia por afinidade contendo a resina “Chelating Sepharose” (Pharmacia) ativada com Ni⁺².

A coluna cromatográfica foi preparada utilizando-se 2 mL da resina “Chelating Sepharose” (Pharmacia) homogeneizada e, em seguida, empacotada por gravidade em seringa de 2,5 mL até completa drenagem do etanol 20 %. A resina foi lavada com 3 volumes de água deionizada, ativada com 6 volumes de tampão de troca 1X (NiSO₄ 50 mM) e equilibrada com 3 volumes de tampão de ligação 1X. O extrato de proteína total foi aplicado à coluna; em seguida, a coluna foi lavada com 10 volumes de tampão de ligação 1X e 20 volumes com tampão de lavagem 1X (Tris - HCl 20 mM, pH 8.0, imidazol 60 mM e NaCl 0,5 M). A proteína heteróloga foi eluída em 6 volumes de tampão de eluição (Tris - HCl 20 mM, pH 8.0, Imidazol 1 M e NaCl 0,5 M). Frações da eluição foram coletadas (600 µL) e analisadas por SDS-PAGE, usando gel de acrilamida 12,5 % (p/v) corado com Nitrato de Prata 0,45 %. As frações da proteína foram armazenadas a 4°C.

3.13. Teste de atividade antifúngica da proteína TcGLU-2

Para investigar a propriedade biológica da TcGLU-2, a proteína TcGLU-2 recombinante purificada e dialisada em tampão fosfato 10 mM, pH 6.0 com duas

trocas após 24 horas, foi utilizada em teste de atividade antifúngica contra o fungo *Crinipellis pernicioso*. A massa molecular aparente da TcGLU-2 recombinante foi visualizada por SDS-PAGE, com aproximadamente 33 kDa. Este valor foi diferente do peso molecular predito de 26 kDa calculado pela seqüência de aminoácidos. Para estudar o efeito desta proteína no fungo, semicírculos de papel filtro (5 cm de diâmetro) foram embebidos com concentrações diferentes (2, 4 e 6 µg) da proteína recombinante TcGLU-2, quantificada por Bradford. Semicírculos embebidos com proteínas totais purificadas e dialisadas da bactéria BL21(λDE3)pLysS contendo o plasmídeo pQE32 sem inserto (controle negativo), foram colocados próximo ao halo de crescimento das hifas do *C. pernicioso* crescido por 10 dias a 25°C. Para cada ensaio foi feito duas repetições. Após 5 dias de incubação nas condições apropriadas para o crescimento do fungo, fez-se a leitura das placas, medindo em cm o halo de crescimento do fungo, para avaliar o efeito da proteína TcGLU-2.

3.14. Teste de germinação de esporos

Diferentes concentrações (2, 4 e 6 µg) para Bradford da proteína TcGLU-2 purificada e dialisada em tampão fosfato 10 mM pH 5,0 foram utilizadas para testar o efeito da proteína sobre a eficiência de germinação dos esporos de *C. pernicioso* e originar colônias. Foram utilizados 3 µL de esporos ($2,1 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹) para uma solução teste igual a 150 µL e incubados por 4 horas a 25°C, no escuro. Após este período, as soluções de proteína-esporos foram colocadas em placas de petri contendo meio mineral para Cp e incubadas a 25°C por 15 dias, no escuro. Para controle negativo, proteínas totais do clone BL21(λDE3)pLysS contendo o plasmídeo pQE32 sem inserto foram utilizadas após purificação e diálise.

4. RESULTADOS

4.1. Análise de seqüência do gene de β -glicanase isolado da interação entre *T. cacao* e *C. pernicioso*

Durante o sequenciamento e processo de pré-anotação automática da biblioteca de cDNA da interação compatível entre *T. cacao* e *C. pernicioso*, surgiram seqüências que correspondiam a possíveis genes que apresentavam homologia com proteínas de β -glicanases quando comparadas com seqüências do *GenBank*. As seqüências de nucleotídeos foram traduzidas e apenas uma entre outras apresentou uma ORF (*open read frame*) completa de aproximadamente 582 nucleotídeos, que codifica uma proteína de 193 aminoácidos, sendo denominada de TcGLU-2.

A seqüência de *TcGlu-2* ao ser comparada com seqüências do *GenBank* (**Tabela 4**) apresentou similaridade a β -glicanase de outros organismos. A maior similaridade apresentada foi de 83 %, com uma proteína endo-beta-1,3-1,4-D-glicanase de *Arabidopsis thaliana* (HAAS et al., 2002).

Tabela 4: Percentagem de similaridade de seqüências de aminoácidos de β -glicanases em relação a *TcGlu-2*.

Organismo	Número de acesso	%	Função da proteína
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAM61180	83	endo-beta-1,3-1,4-D-glicanase
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_566731	79	hidrolase dienolactona
<i>Oryza sativa</i>	AAU10802	77	endo-beta-1,3-1,4-D-glicanase
<i>Zea mays</i>	AAC69757	60	endo-beta-1,3-1,4-D-glucanase

O alinhamento da seqüência de *TcGlu-2* com as β -glicanases de *A. thaliana*, *O. sativa* e *Z. mays* permitiu a identificação de algumas regiões conservadas com 2, 3 e 4 aminoácidos presentes em todas as seqüências. Além de alguns aminoácidos isolados que são comuns a todas as seqüências, destacando-se resíduos de ácido glutâmico 129 e triptofano 119 e 153, os quais são altamente conservados entre β -1,3 e β -1,3-1,4-glicanases de plantas (VARGHESE et al., 1994) (**Figura 5**).

```

AAM61180A. -----MSGPQCCENPPTLNPV----SGSG-HVEKL-GGLDAY
NP_566731A. -----MSGHQCTENPPDLDPDPT----SGSG-HVEKL-GNLDTY
TcGlu-2 -----MSGPQCCSNPPTLNPR----SGVG-HVEEL-AGLKTY
AAU108020. -----MASPQCCANPPTLNPA----GGEQKVVESF-GGIKAY
AAC69757Z. MPSSAQVLLCLAAVLA AAAAATTAEEAHSQCCLDNPPDRSIHGRQLAEAGEVVDLPGGLRAY 60

AAM61180A. VSGSAESKLCVLLISDIFGFEEAPNLRALADKVAASGFYVVVPDYFGGDPYNPNSQDRPIP
NP_566731A. VCGSTH SKLAVLLVPHVFGYETPNLRKLADKVAEAGFYAVVPDFFHGDYPYNPENQDRPFP
TcGlu-2 VTGSLD SKLAVLLVSDVFGYDAPNLRKLADKVAAGFYVVVPDFFYGDPFVAERSDRPLA
AAU108020. VAGAAESKAAVVLISDVFGFEAPNLRKIADKVASSGYFVVVPDFLHGDPLVPESTEKPFQ
AAC69757Z. VSGAASSRAVVLASDVFGYEAPLLRQIVDKVAKAGYFVVVPDFLKG DYLD---DKKNFT 117

AAM61180A. VWIKDHGCDK-GFENTKPVLETIKKNKGITAI GAAGMCWGAKVVVELSKEELIQAAVLLHP
NP_566731A. IWMKDHELEK-GFESKPIVEALKNKGITSIGAA GFCWGAKVAVELAKEKLVDA TVLLHP
TcGlu-2 VWLKNHWTRITGFEDARLVLDAL KSKGVSAIGAAGICWGAKVVVGLAKEALIPAAVLLHP
AAU108020. MWIKEHGPDK-AFEEAKPIIAALKEKGVSSIGAVGYCWGAKVVVELVKAHEIQAAVMCHP
AAC69757Z. EWLEAHSPVK-AAEDAKPLFAALKKEGK-SVAVGGYCWGGKLSVEVGKTSVDKAVCLSHP 175

AAM61180A. SFVNVDDIKGGKAPIAILGAEIDQMSPPALLKQFEEILSSKPEV-----NS
NP_566731A. ARVTVDDIKEVNLPIAVLGAEIDQVSPPELVQRQFEDILASKPQV-----KS
TcGlu-2 SFVTVDDIKSVKVP IAILGAEIDQLSPPALVKQFDDILKAKP-----
AAU108020. SFVTVDDMKEVKCP IAILGAEIDRMSPEEVVKQFEQVLSKSGI-----GH
AAC69757Z. YSVTADDMKEVKWPIEILGAQN DTTTTPPEVYRFVHV RERHEVPFRRQDRRDGPRLHGQ 235

AAM61180A. YVKIHPKVSHGWTVRYNIDEPEAVKAAEEAHKEMLDWVFVYIK-----
NP_566731A. FVKIFPRCKHGWTVRYNENDPSEVEAAMEAHKMLAWLIDYIK-----
TcGlu-2 -----
AAU108020. FVKIFPGVEHGWTVRYNDDAAAVKSAEEALADMIDWFNKNLK-----
AAC69757Z. LVQQAPQLNEACTAPTRLNSINHSSAVIFCFDSWLPRLIFMATTSSSTTVISLIFFVSMYF 295

AAM61180A. -----
NP_566731A. -----
TcGlu-2 -----
AAU108020. -----
AAC69757Z. FSFLFAFL 303

```

Figura 4. Alinhamento das seqüências de β -glicanases. Seqüência deduzida de aminoácidos de TcGLU-2 foram alinhadas com proteínas relacionadas a β -glicanases da **tabela 4**. O alinhamento foi realizado utilizando o programa ClustalW1.82. Os aminoácidos em vermelho estão presentes em todas as seqüências. Os resíduos de ácido glutâmico e triptofano entre as seqüências estão de azul e rosa, respectivamente.

Seqüências de aminoácidos de β -glicanases pertencente as hidrolases glicosídicas características de organismos eucariotos (**tabela 5**) foram utilizadas para análise filogenética do gene de glicanase de cacau, *TcGlu-2*. O dendograma apresentado na **figura 5**, dividiu as proteínas em 4 grupos principais. O primeiro agrupamento representado por A, envolve todas proteínas de fungos com função endo- β -1,3-glicanase e glicosiltransferase, já o segundo agrupamento, B, inclui todas as β -1,3-1,4-glicanases e endo-1,3-glicanases de plantas. O terceiro

agrupamento representado em C, da qual faz parte uma outra proteína de *T. cacao*, é caracterizado pelas β -1,4-glicanases. E separado das demais proteínas, em D, a proteína TcGLU-2 em estudo constitui um grupo com proteínas pertencente a família das hidrolases dienolactonas e endo- β -1,3-1,4-D-glicanases.

Tabela 5. Origem e função das proteínas β -glicanases pertencentes à família das hidrolases glicosídicas usadas na análise filogenética.

Organismo	Número de acesso	Função/ função provável
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	M31072	endo- β -1,3-glicanase/ glicosiltransferase
<i>Candida albicans</i>	U12975	endo- β -1,3-glicanase/ glicosiltransferase
<i>Aspergillus fumigatus</i>	AF038596	endo- β -1,3-glicanase/ glicosiltransferase
<i>Pichia jadinii</i>	AF091241	glicosiltransferase
<i>Triticum aestivum</i>	Z22873	β -1,3-1,4-glicanase
<i>Oriza sativa</i>	AF323610	β -1,3-1,4-glicanase
<i>Hordeum vulgare</i>	M13237	β -1,3-1,4-glicanase
<i>Solanum tuberosum</i>	U01901	endo-1,3-glicanase
<i>Glycine max</i>	U41323	endo-1,3-glicanase
<i>Nicotiana tabacum</i>	X54431	endo-1,3-glicanase
<i>Hordeum vulgare</i>	M96938	endo-1,3-glicanase
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAM61180	endo- β -1,3-1,4-D-glicanase
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_566731	hidrolase dienolactona
<i>Oryza sativa</i>	AAU10802	endo- β -1,3-1,4-D-glicanase
<i>Zea mays</i>	AAC69757	endo- β -1,3-1,4-D-glicanase
<i>Theobroma cacao</i>	AY487173	endo- β -1,4-glicanase
<i>Gossypium hirsutum</i>	AAS49036	endo- β -1,4-glicanase
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAG51703	endo- β -1,4-glicanase

Fonte McLoad et al. (2003).

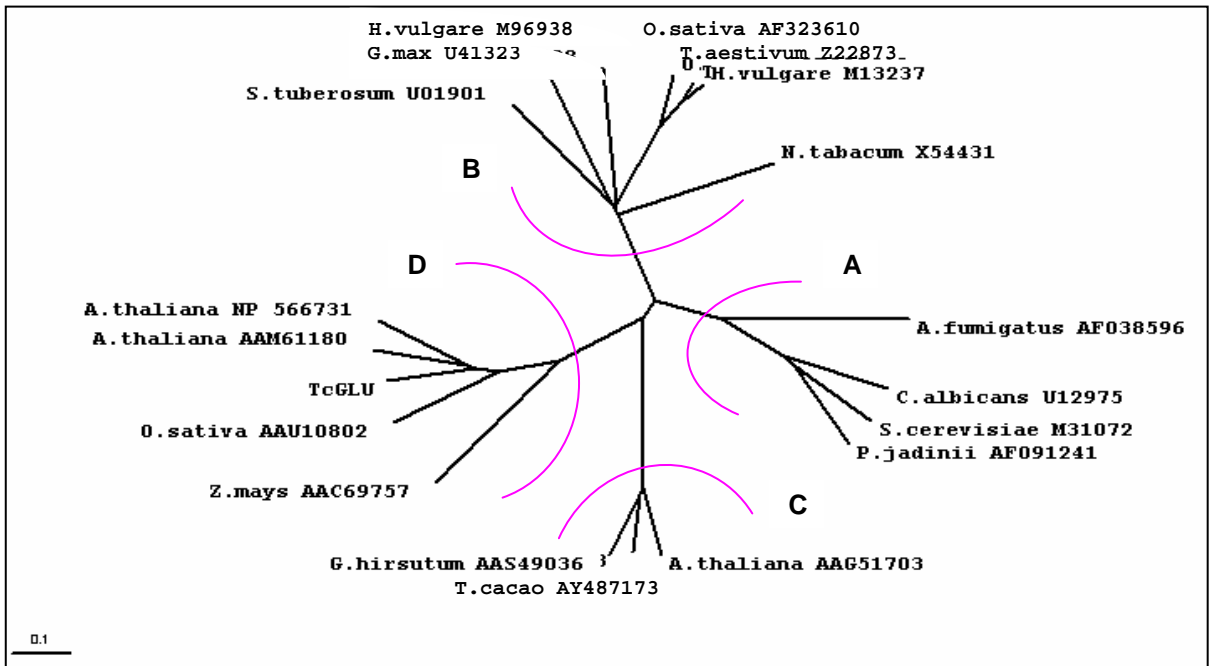


Figura 5. Dendrograma. A análise de comparação de seqüência de glicanases de cacau com seqüências de proteínas das hidrolases glicosídicas. A linha rosa separa os quatro grupos principais. A função das proteínas está listada na **tabela 5**.

4.2. Detecção do número de cópias gênicas do gene *TcGlu-2*

O DNA genômico de *Nicotiana tabacum* e *Theobroma cacao* (Catongo) foi digerido com enzimas de restrição que não clivam as seqüências internas das possíveis β -glicanases de cacau. Após fracionamento em gel de agarose 0,8 % e transferência para membrana de náilon o DNA foi sondado com o próprio gene *TcGlu-2* de 580 pares de bases. A hibridização apesar de realizada em condições recomendadas pelos fabricantes, conduziu a identificação prováveis de 3 bandas de diferentes tamanhos em cada digestão do DNA e *background* muito forte levando a um diagnóstico dúbio do número de cópias do respectivo gene (**Figura 6**).

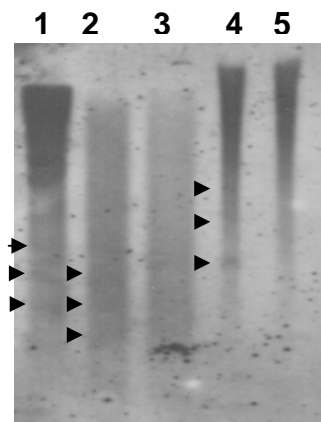


Figura 6. Análise genômica do gene β -glicanases de cacau. Transferência para membrana de náilon de 10 μ g de DNA genômico de *N. tabacum* digerido com *Bam*HI (1), *Xho* I (2) e *Sal* I (3) e *T. cacao* digerido com *Bam*HI (4) e *Sal* (5) fracionado em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo 0,01 %, para transferência de *Southern* não radioativo.

4.3. Expressão da proteína TcGLU-2 em bactéria e purificação

Oligopeptídeos específicos gerando sítios para as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sal* I foram sintetizados para o gene *TcGlu-2*. A amplificação e posterior inserção do fragmento de 581 pares de bases no vetor de expressão em bactéria pQE32, sob o controle do promotor da T5 RNA Polimerase e fundido a uma cauda de histidina (**Figura 7A**), permitiu a expressão de *TcGlu-2* e posterior purificação via cromatografia de afinidade. A expressão heteróloga da proteína foi conduzida em *E. coli* estirpe BL21(DE3)pLysS na presença do agente indutor IPTG. Inicialmente, foi realizado um experimento para determinar a melhor concentração de IPTG e o melhor tempo de indução. Observamos que não houve diferenças significativas em função da concentração de IPTG (dados não mostrados), mas o acúmulo da proteína aumentou com o tempo (**Figura 7B**). A proteína purificada

(Figura 7C) possui uma massa molecular de aproximadamente 33 kDa, superior a massa calculada a partir da seqüência de aminoácidos deduzida.

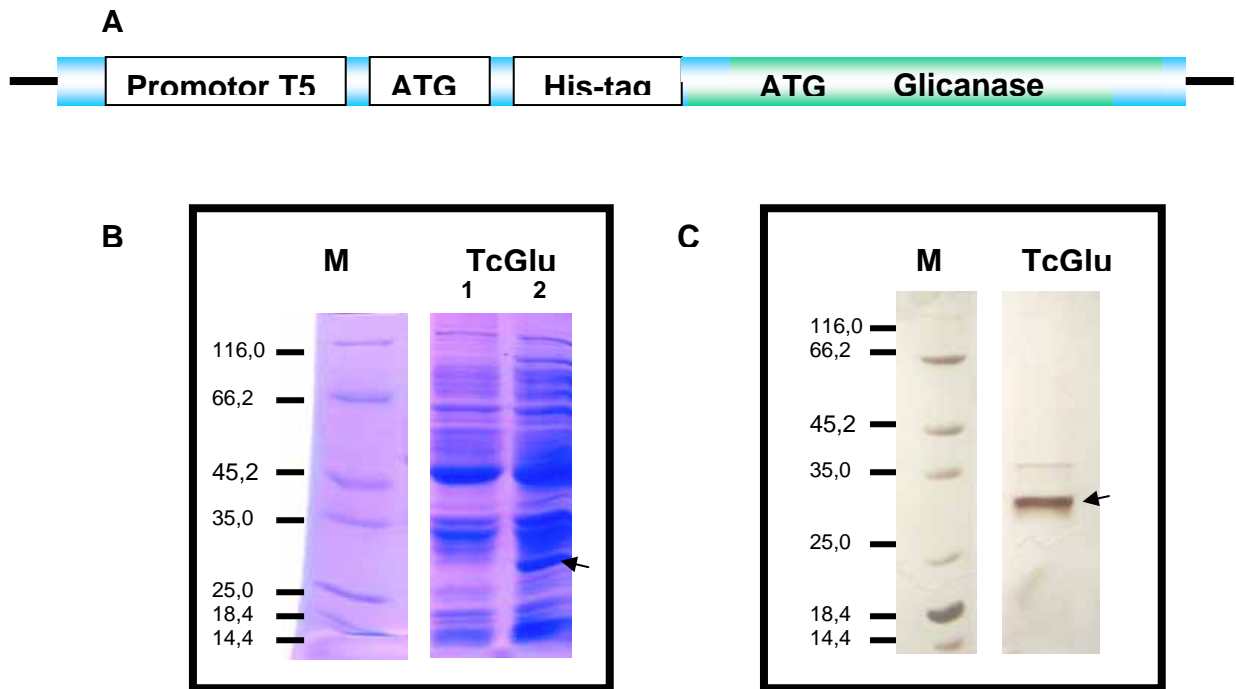


Figura 7. Expressão da β -glicanase de *T. cacao* em bactéria. A, construção de DNA utilizada para expressar a proteína em *E. coli*. B, as linhas 1 e 2 correspondem ao extrato protéico de *E. coli* transformada com a construção de DNA representada em A, com 1 mM de IPTG no período de 5 e 29 horas, respectivamente. C, fração da proteína TcGLU-2 purificada sob condição nativa. As proteínas foram fracionadas em SDS-PAGE 12,5 % e coradas com comassie blue R-250 e prata, em B e C, respectivamente. M, corresponde ao marcador de peso em kDa.

4.4. Atividade antifúngica *in vitro* da proteína TcGLU-2 purificada

A proteína purificada designada TcGLU-2 (Figura 7C) não inibiu a germinação dos esporos do fungo *C. pernicioso* a 2 μ g do volume final de 150 μ L, uma vez que possibilitou originar várias colônias por placa (Figuras 8A e B).

Entretanto, com concentrações de 4 e 6 μg de proteína por 150 μL da solução teste não foi visualizado a formação de colônias (crescimento micelial) do fungo com 15 dias de incubação, sugerindo uma inibição aparente na germinação dos esporos (**Figuras 8B e C**).

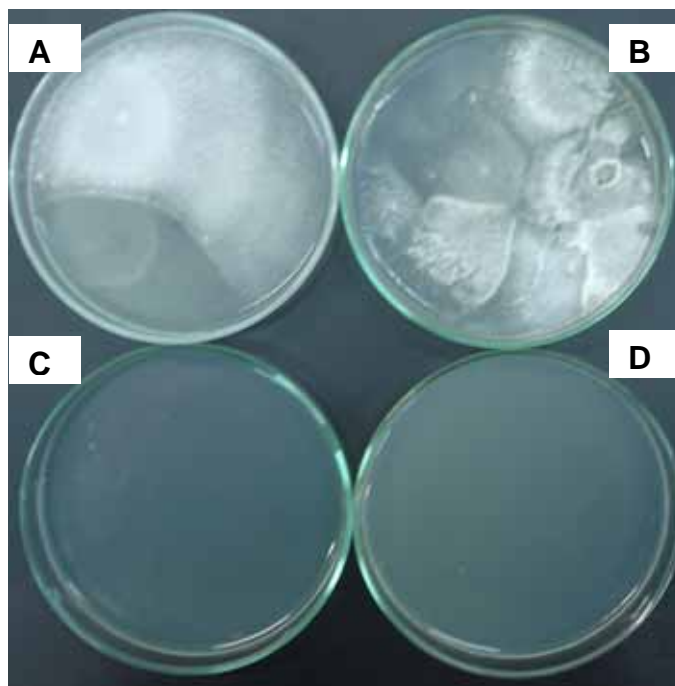


Figura 8. Teste de inibição da germinação de esporos de *C. perniciosus* incubado com a proteína TcGLU-2. As concentrações de proteína TcGLU-2 utilizadas foram 2, 4 e 6 μg em B, C e D, respectivamente. A, controle negativo.

A TcGLU-2 não teve atividade antifúngica a 2 μg quando em contato com o micélio do fungo (**Figura 9A**), mas a 6 μg , houve uma redução significativa do crescimento micelial do *C. perniciosus*, observada após 5 dias de incubação com a proteína TcGLU-2 (**Figuras 9B e C**).

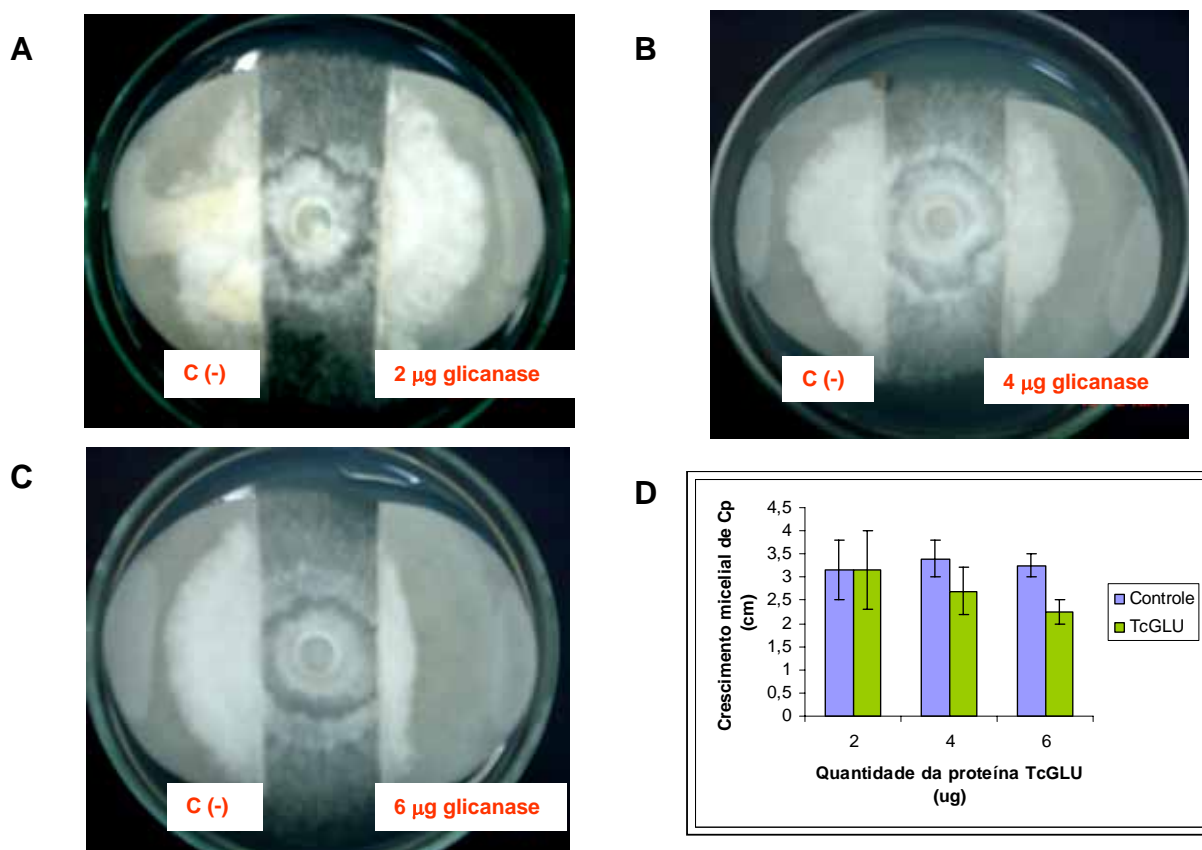


Figura 9. Teste de inibição do crescimento micelial de *C. perniciosus* incubado com a proteína TcGLU-2. As concentrações de proteína TcGLU-2 utilizadas foram 2, 4 e 6 µg em A, B e C, respectivamente. C (-), controle negativo. D, representação estatística da influência da proteína no crescimento do fungo.

4.5. Análise de expressão do gene *TcGlu-2* por RT-PCR semi-quantitativo

Para análise de expressão do *TcGlu-2*, o RT-PCR semi-quantitativo foi realizado usando cDNA preparado do RNA de *Theobroma cacao* em diferentes estágios de infecção pelo fungo *Crinipellis perniciosus* e de plantas saudas, e os pares de iniciadores TcGlu2.

Os pontos utilizados como referências foram 45, 60 e 90 dias após a inoculação da planta com o fungo *C. perniciosus*. Aos 45 dias, a planta está no

estágio inicial de infecção caracterizada como vassoura verde, enquanto que aos 60 dias o tecido vegetal já apresenta cor amarronzada progressiva devido a necrose local, caracterizando a vassoura seca. Com 90 dias de infecção o tecido está completamente necrosado. Os níveis de expressão do gene *TcGlu-2* não variaram significativamente nos diferentes estágios de infecção do tecido de *T. cacao* pelo fungo *C. pernicioso* (**Figura 10**).

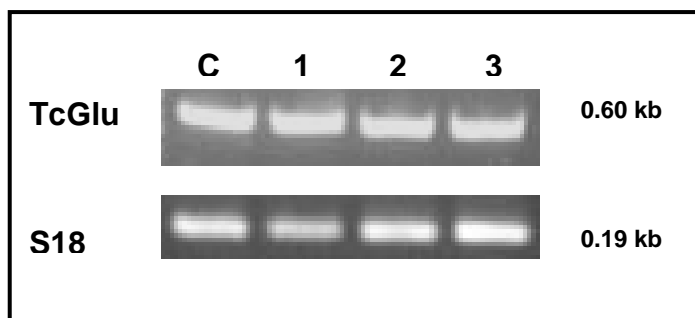


Figura 10. Análise de RT-PCR semi-quantitativo do gene *TcGlu-2*. C, representa amostras de *T. cacao* (Catongo) sadio, controle negativo. Os números 1, 2 e 3, correspondem a amostras de cacau (Catongo) com 45, 60 e 90 dias de infecção pelo fungo *Crinipellis pernicioso*, respectivamente. S18, RNA ribossomal S18.

4.6. Transformação de *N. tabacum* com o gene *TcGlu-2*

O gene de *TcGlu-2* foi clonado no plasmídeo pCAMBIA1304 / *gus* (-) e o diagnóstico por PCR das colônias de agrobactéria transformadas foi realizado (**Figura 11A**). As bactérias seletivamente transformadas com o gene *TcGlu-2* foram utilizadas para transformação de explantes de *N. tabacum*. Após 4 meses de cultivos, plantas em estágio inicial de regeneração foram obtidas e estão em desenvolvimento sob condições apropriadas (**Figura 11B**).

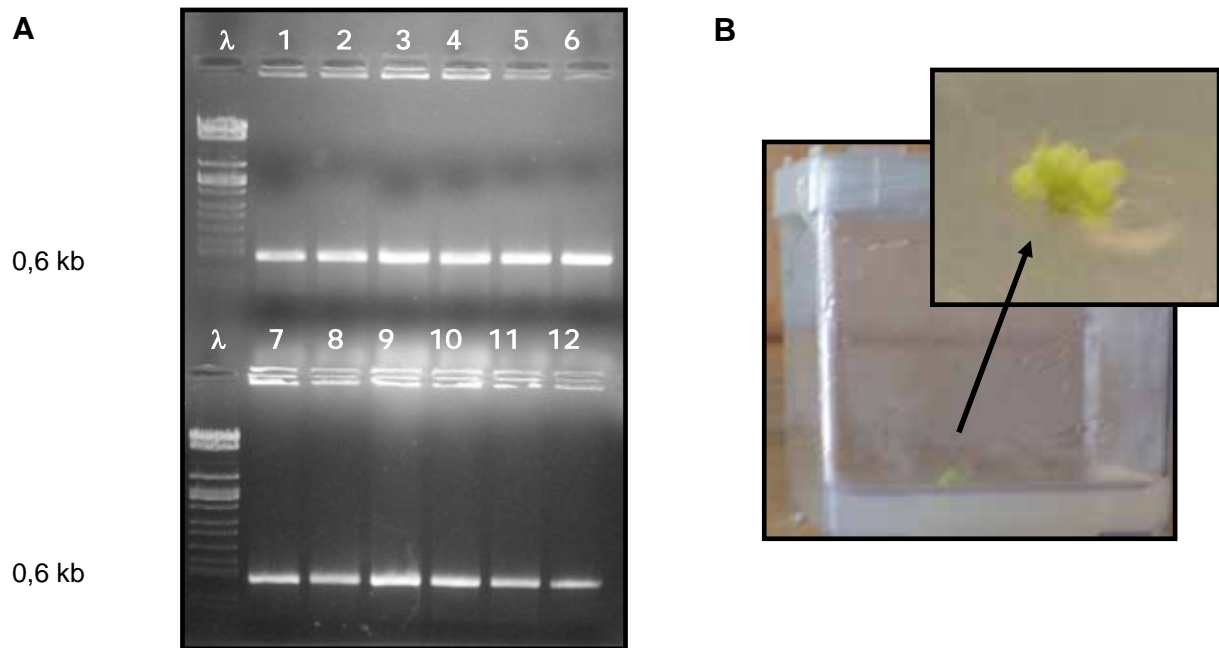


Figura 11. Diagnóstico por PCR da clonagem do gene *TcGlu-2* em pCAMBIA1304 / gus (-) e transformação via *A. tumefaciens* da planta de *N. tabacum*, representado por A e B, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

5.1. O gene *TcGlu-2* codifica uma glicanase da família das hidrolases glicosídicas

Neste trabalho foi caracterizado um gene de glicanase isolado da biblioteca de cDNA da interação entre *T. cacao* e *C. pernicioso*. A glicanase codificada pelo gene *TcGlu-2* apresentou um alto grau de homologia a outras β -glicanases de plantas, principalmente a endo- β -1,3-1,4-glicanases de *A. thaliana* (HAAS et al., 2002), a qual compartilhou 83 % de similaridade a nível de aminoácidos (**Tabela 4**). Estas proteínas amplamente distribuídas entre espécies de cereais são particularmente importantes na completa degradação da parede celular de grãos (HRMOVA; FINCHER, 2001). A TcGLU-2 também apresentou uma região com alta homologia ao domínio hidrolase dienolactona de *A. thaliana*, 79 %. A função deste domínio em organismos superiores ainda não está definida, mas uma proteína denominada ATHCOR1 de *A. thaliana*, onde foi detectado o mesmo domínio, acredita-se estar envolvida na biossíntese/hidrólise dos componentes da parede celular de plantas (BENEDETTI et al., 1998). O resultado similar foi obtido para a proteína PiENDO2, uma putativa β -1,3-1,4-glicanase de *P. infestans* participante no metabolismo da parede celular deste fungo (McLEOD et al., 2003).

De acordo com o alinhamento das seqüências de aminoácidos de TcGLU-2 com as β -glicanases da **tabela 4**, esta proteína de cacau apresentou resíduos

conservados de ácido glutâmico e triptofano, os quais são comuns entre as β -1,3- e β -1,3-1,4-glicanases de plantas já que supõem terem ancestral em comum (VARGHESE et al., 1994). No entanto, análises da árvore filogenética (**Figura 5**) mostram que a proteína TcGLU-2 de cacau analisada não se agrupou com nenhuma das seqüências das classes das β -1,3-glicanases e β -1,3-1,4-glicanases de planta, agrupando uma outra família de hidrolases glicosídicas, como as hidrolases dienolactona. Também foi possível visualizar que a seqüência *TcGlu-2* deste trabalho codifica para uma proteína diferente da seqüência de *TcGlu-1* estudada por Bailey e colaboradores (2005), já que deu similaridade a endo- β -1,4-glicanases *Arabidopsis* e que parece estar envolvida no processo de reorganização e degradação da parede celular.

A classificação da TcGLU-2 ao grupo das β -1,3-glicanases ou das β -1,3-1,4-glicanases das hidrolases glicosídicas será realizada com base em testes de atividade da especificidade do substrato (AKIYAMA et al., 1997). Para examinar a especificidade do substrato da endo-1,3- β -glucanase de *Streptomyces sioyaensis* Hong e colaboradores (2002) testaram diferentes polissacarídeos entre eles β -1,3-glicanos (laminarin, curdlan e pachyman) e β -1,3-1,4-glicanos (lichenan) que têm como produto final monômeros de glicose.

5.2. A expressão do gene TcGLU-2 está relacionado com a interação compatível entre o *T. cacao* e *C. pernicioso*

Baseado no padrão de expressão dos transcritos do gene *TcGlu-2* na planta de *T. cacao* (var. Catongo), não houve alteração significativa nos diferentes estágios de infecção do fungo em comparação aos níveis basais do mesmo apresentado na amostra de planta sadia. Este perfil de expressão pode estar sendo condizente a interação compatível que se dá entre a planta susceptível de *T. cacao*, acesso Catongo, e o fungo *C. pernicioso*. Quanto mais rápida for a ativação do mecanismo da resposta sistêmica, como as β -1,3-glicanases, maior será o efeito de proteção da planta frente à patógenos. Na interação incompatível,

a velocidade de ativação da resposta local e sistêmica, é maior do que na interação compatível. Dessa maneira, a eficiência na produção da resposta de resistência no primeiro caso é superior ao segundo caso (CORDEIRO; SÁ, 1999), sendo necessária para impedir em tempo hábil a colonização do fungo e conseqüentemente a progressão da doença. Além do reconhecimento tardio da invasão mantendo-se os níveis iniciais das proteínas de defesa na planta, um outro fator que pode estar contribuindo para insignificante variação na quantidade de transcritos do gene *TcGlu-2* em plantas infectadas pode ser o mal funcionamento dos mecanismo de transdução de sinais que estão envolvidos na ativação desses genes de defesa. Ou ainda, os níveis de transcritos podem ser alto antes dos 45 dias da doença ser caracterizada como vassoura-verde quando se iniciou a avaliação, e haver uma queda subsequente no tecido onde a doença já está instalada devido a danificação das células locais impedindo-as da manutenção do seu mecanismo de defesa.

Uma característica relevante para explicar o padrão de expressão dos genes relacionados à patogênese está na diferença da arquitetura dos seus promotores. Os genes envolvidos na resposta ao ataque de patógeno são diferentes no número, na ordem e no tipo dos elementos regulatórios presentes (RUSHTON; SOMSSICH, 1998). Então, se houver uma modificação, provocada por mutação ou deleção, que culminará na ineficiência destes elementos, a expressão destes genes de defesa será afetada. Por exemplo, o ácido salicílico (AS) é um importante sinalizador para a planta ao ataque de patógeno e um elemento de resposta ao AS (SA-response element - SARE) presente em PR2-d de tabaco aumentou em 20 vezes em plantas transgênicas na presença de AS (RUSHTON; SOMSSICH, 1998).

Como não foi observado alteração no perfil de expressão do gene *TcGlu-2* na interação compatível entre o acesso Catongo de *T. cacao* e o fungo *C. pernicioso*, para caracterizar o padrão de expressão seria necessário verificar em plantas resistentes a doença (interação compatível), se esse perfil se mantém.

5.3. A proteína TcGLU-2 tem uma ação antifúngica sobre o *C. pernicioso*

Os ensaios *in vitro* de atividade antifúngica evidenciaram que a proteína TcGLU-2 de cacau limita o desenvolvimento do fungo *C. pernicioso* (**Figura 9**), sugerindo uma possível função na defesa da planta contra patógeno. A concentração ótima para ação fungistática nos esporos do fungo foi igual a 4 µg em 150 µL de solução, uma dosagem menor da utilizada por Jr e Kué (1996), 10 µg em 20 µL de solução, quando trabalhando com uma glicanase de pepino e o fungo *C. lagenarium*. Para a inibição micelial, 6 µg de TcGLU-2 impediu significativamente o desenvolvimento do fungo *in vitro* a menos da metade quando comparado ao controle com 2 µg que não provocou nenhum efeito aparente na progressão micelial (**Figura 10**).

Essa ação antifúngica da proteína TcGLU-2 de *T. cacao* observado nos ensaios *in vitro* com o *C. pernicioso* é similar aos resultados encontrados por Sela-Buurlage et al. (1993) ao estudar β-1,3-glicanases da classe I de tabaco, onde verificaram lise na extremidade hifal e inibição do crescimento do fungo *Fusarium solani*. A ação destas proteínas inibindo o crescimento do fungo ocorre pela clivagem das ligações β-1,3 e β-1,6 dos homopolímeros de glicose que compõem a parede celular do fungo (ADAMS, 2004). Visando o estudo do gene de glicanase de *T. cacao* em plantas, tabaco transgênico expressando *TcGlu-2* está em regeneração para posterior testes de resistência com o fungo *C. pernicioso*. Segundo Jach e colaboradores (1995) a co-expressão de genes que codificam para β-1,3-glicanase e quitinase de *H. vulgare* em plantas transgênicas de tabaco leva a um aumento significativo da defesa da planta quando atacada pelo fungo *Rhizoctonia solani* em comparação ao controle (planta não transformada). Ao transformar tomate (*Lycopersicon esculentum*) com um gene de glicanase milho, Schaefer et al., 2005 também observaram um aumento de resistência na planta contra o fungo *Alternaria solani*. Essas plantas transgênicas com o gene de glicanase, após 21 dias inoculadas com esporos do fungo, apresentaram um intermediário a moderado nível de susceptibilidade, enquanto que plantas controle mostraram modera a alta susceptibilidade. Por outro lado, Lusso e Kué (1996)

observaram que a expressão constitutiva de proteínas com atividade β -1,3-glicanase em plantas transgênicas de tabaco pode reduzir a susceptibilidade destas plantas ao fungo fitopatogênico. Em seus experimentos, eles observaram uma alta correlação entre atividade β -1,3-glicanase e a resistência na planta contra o fungo *P. tabacina* e *P. parasitica* var. *nicotianae*, supondo uma função biológica para β -1,3-glicanase na resistência a doença provocada por estes fungos. De acordo com Castro e Bach (2004), a mais importante macromolécula no mecanismo de defesa da planta são as proteínas PRs, devido a sua acumulação e concentração.

Outros indícios que levariam a caracterização da proteína TcGLU-2 como uma β -1,3-glicanases da classe I e não uma β -1,3-1,4-glicanase, além da identificação do tamanho da proteína que foi de aproximadamente 33 kDa, seria o pI básico e sua localização vacuolar na célula (**Tabela 6**). A localização celular não pôde ser predeterminada, pois de acordo com as análises *in silico* a TcGLU-2 não apresenta peptídeo sinal, mas sabe-se que todas as proteínas α - e β -glicanases o possuem, já que são proteínas secretadas (LIBERTINI et al., 2004). As proteínas da classe I estão localizadas em vacúolos, as quais passam primeiramente pelo retículo endoplasmático rugoso e depois pelo complexo de Golgi (STICHER et al., 1997; LEUBNER-METZGER; JR., 1999), são consideradas as relacionadas à patogênese. Enquanto que as de classe II e III, são maiores variando tamanho entre 34 e 41 kDa, o pI é necessariamente ácido e com localização extracelular (LEUBNER-METZGER e JR, 1999). Uma β -1,3-glicanase com massa molecular calculada de 32 kDa extraída do fluido intercelular de cevada mostrou efeito deletério contra parede celular de conídios do fungo *Rhynchosporium secalis* (ZAREIE et al., 2002).

Tabela 6. Membros da família PR-2 (β -1,3-glicanases) de tabaco e outras

Classe	Nome do membro	Nome trivial	MW (kDa)	pl	Localização
I	PR-2e	Glb	33	básico	vacúolo
I	PR-2e	Gla	33	básico	vacúolo
I	PR-2e	Gglb50		básico	vacúolo
I	PR-2e	Gln2		básico	vacúolo
I	-	Gn2		básico	vacúolo
I	-	Gn1	34	básico	vacúolo
II	PR-2a	PR-2	35	ácido	secretada
II	PR-2b	PR-N	35	ácido	secretada
II	PR-2c	PR-O	35	ácido	secretada
II	-	PR-2d		ácido	secretada
II	β GLU estilete	Sp41a	41	ácido	secretada
II	β GLU estilete	Sp41b	41	ácido	secretada
III	PR-2d	PR-Q	35	ácido	secretada
IV	β GLU antera	Tag1	35	ácido	secretada

Fonte: Leubner-Metzger e Meins Jr. (1999).

6. CONCLUSÃO

- O gene *TcGlu-2* codifica uma proteína do grupo das hidrolases glicosídicas.
- Não houve mudanças no perfil de expressão do gene *TcGlu-2* na interação compatível entre *T. cacao* (Catongo) e *C. pernicioso*, nas fases avaliadas.
- A proteína TcGLU-2 isolada da biblioteca de cDNA da interação entre *Theobroma cacao* e *Crinipellis pernicioso* teve atividade antifúngica no desenvolvimento do Cp e ação fungistática contra os esporos do mesmo.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADAMS, D.J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v. 150, p. 2029–2035, 2004.

AKIYAMA, T.; SHIBUYA, N.; HRMOVA, M.; FINCHER, G.B. Purification and characterization of a (1,3)- β -D-glucan endohydrolase from rice (*Oryza sativa*) bran. **Carbohydrate Research**, v. 297, p. 365-374, 1997.

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

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAM, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

BACIC, A.; HARRIS, P.J.; STONE, B.A. Structure and function of plant cell walls. In: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. (Eds) **The Biochemistry of Plants**. Academic Press: New York, v. 14, p. 297-371, 1988.

BASTOS, C.N. Retrospectiva e avanços no controle da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro. (Suplemento). **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 305-306, 2000.

BENEDETTI, C.E.; COSTA, C.L.; TUREINELLI, S.R.; ARRUDA, P. Differential expression of a novel gene in response to coronatine, methyl jasmonate, and wounding in the Col1 mutant of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 116, p. 1037-1042, 1998.

BOLLER, T. Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. In: KOSUGE, T.; NESTER, E.W. (Eds) **Plant-Microbe Interactions. Molecular and Genetic Perspective**. Macmillan: New York, v. 2, p. 385-413, 1987.

BOS, L.; PARLEVLIET, J.E. Concepts and Terminology on Plant/Pest Relationships: Toward Consensus in Plant Pathology and Crop Protection. **Annual Review Phytopathology**, v. 33, p. 69-102, 1995.

BOWERS, J.H.; BAILEY, B.A.; HEBBAR, P.K.; SANOGO, S.; LUMSDEN, R.D. The impact of plant diseases on world chocolate production. (Online) **Plant Health Progress** DOI:10.1094/PHP-2001-0709-01-RV, 2001.

BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA -SPI, 1998.

CASTRO, O.L.; BACH, E.E. Increased production of beta-1,3 glucanase and proteins in *Bipolaris sorokiniana* pathosystem treated using commercial xanthan gum. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 165-169, 2004.

CHEN, L.; FINCHER, G.B.; HOJ, P.B. Evolution of Polysaccharide Hydrolase Substrate Specificity: Catalytic amino acids are conserved in barley 1,3-1,4 and 1,3- β -glucanases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 18, p. 13318-13326, 1993.

COOMBS, J.; BRENCHLEY, J.E. Characterization of Two New Glycosyl Hydrolases from the Lactic Acid Bacterium *Carnobacterium piscicola* Strain BA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5094–5099, 2001.

CORDEIRO, M.C.R.; SÁ, M.F.G. de Biotecnologia e Resistência a Patógenos. **Revista Biotecnologia**, v. 10, p. 34-39, 1999.

DELLEDONNE, M.; ZEIER, J.; MAROCCO, A.; LAMB, C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. **PNAS**, v. 98, n. 23, p. 13454-13459, 2001.

DING, C.-K.; WANG, C.Y.; GROSS, K.C.; SMITH, D.L. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. **Planta**, v. 214, p. 895–901, 2002.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

EVANS, H.C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicios*a, causal agent of witches broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, p. 515–523, 1980.

FINCHER, G.B. Molecular and cellular biology association with endosperm mobilization in germination cereal grains. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 305-346, 1989.

FREITAS, L.B. de; KOEHLER-SANTOS, P; SALZANO, F.M. Pathogenesis-related proteins in Brazilian wheat genotypes: Protein induction and partial gene sequencing. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, p. 497-500, 2003.

GESTEIRA, A. da S.; MICHELI, F.; FERREIRA, C.F.; CASCARDO, J.C. Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cacao tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis pernicioso*. **Biotechniques**, v. 35, n. 3, p. 494-496, 498-500, 2003.

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

HAAS, B.J.; VOLFOVSKY, N.; TOWN, C.D.; TROUKHAN, M.; ALEXANDROV, N.; FELDMANN, K.A.; FLAVELL, R.B.; WHITE, O.; SALZBERG, S.L. Full-length messenger RNA sequences greatly improve genome annotation. **Genome Biology**, v. 3, n. 6, 2002.

HAMMERSCHMIDT, R.; SMITH-BECKER, J.A. The role of salicylic acid in disease resistance. In: AGRAWAL, A.A; TUZUN, S.; BENT, E. (Ed) **Induced plant defenses against pathogens and herbivores-biochemistry, ecology and agriculture**. Saint Paul: APS Press, p. 37-53, 1999.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J.D.G. Responses to Plant Patoghens. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W; JONES, R. (Eds) **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, p. 1102, 2000.

HOJ, P.B.; FINCHER, G.B. Molecular evolution of plant β -glucan endohydrolases. **The Plant Journal**, v. 7, n. 3, p. 367-379, 1995.

HONG, T.-Y.; CHENG, C.-W.; HUANG, J.-W.; MENG, M. Isolation and biochemical characterization of an endo-1,3- β -glucanase from *Streptomyces siوياensis* containing a C-terminal family 6 carbohydrate-binding module that binds to 1,3- β -glucan. **Microbiology**, n. 148, p. 1151–1159, 2002.

HUGHES, M.A. The molecular biology of disease and pest resistance. In: HUGHES, M.A. **Plant Molecular Genetics**. Harlow: Longman, p. 192-204, 1996.

HRMOVA, M.; FINCHER, G.B. Structure-function relationships of β -D-glucan endo- and exohydrolases from higher plants. **Plant Molecular Biology**, n. 47, p. 73-91, 2001.

JACH, G.; GÖRNHARDT, B.; MUNDY, J.; LOGEMANN, J.; PINSDORF, E.; LEAH, R.; SCHELL, J.; MAAS, C. Enhanced quantitative resistance against fungal disease combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. **The Plant Journal**, v. 8, n. 1, p. 97-109, 1995.

JONES, J.D.G; DUNSMUIR, P.; BEDBROOK, J. High level expression of introduced chimaeric genes in regenerated transformed plants. **EMBO Journal**, v. 4, p. 2411-2418, 1985.

JR, C.; KUÉ, J. Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 45, p. 257-265, 1996.

LEUBNER-METZGER, G.; JR., F.M. Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2). Review in: DATTA, S.K.; MUTHUKRISHNAN, S. (Eds) **Pathogenesis-related proteins in plants**. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, p. 49-76, 1999.

LIBERTINI, E.; LI, Y.; McQUEEN-MASON, S.J. Phylogenetic Analysis of the Plant Endo- β -1,4-Glucanase Gene Family. **Journal Molecular Evolution**, v. 58, p. 506-515, 2004.

LUSSO, M.; KUÉ, J. The effect of sense and antisense expression of the PR-N gene for β -1,3-glucanase on disease resistance of tobacco to fungi and viruses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 267-283, 1996.

McLEOD, A.; SMART, C.D.; FRY, W.E. Characterization of 1,3- β -glucanase and 1,3;1,4- β -glucanase genes from *Phytophthora infestans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, p. 250-263, 2003.

MOTILAL, L.A.; SIRJU-CHARRAN, G.; SREENIVASAN, T.N. Effect of *Crinipellis pernicios*a Infection on Abscission of Cacao Cotyledons, Reserve Mobilization and Dry Matter Partitioning. **Journal Phytopathology**, v. 151, p. 546-552, 2003.

MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PEREIRA, G.A.G. **O projeto genoma de *Crinipellis pernicios*a, fungo causador da vassoura de bruxa: fundamentos e potencial contribuição**. Acesso em:11/2003. Disponível em: <<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/>>

PURDY, L.H.; SCHMIDT, R.A. Status of Cacao Witches' Broom: Biology, Management. **Annual Review Phytopathology**, v. 34, p. 573–94, 1996.

ROSE, J.K.C.; BENNETT, A.B. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: Parallels between cell expansion and fruit ripening. **Trends Plant Science**, v. 4, p. 176-183, 1999.

RUSHTON, P.J.; SOMSSICH, I.E. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 1, p. 311-315, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2 edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

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 witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 413, p. 865–877, 2005.

SCHAEFER, S.C.; GASIC, K.; CAMMUE, B.; BROEKAERT, W.; van DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; KORBAN, S.S. Enhanced resistance to early blight in transgenic tomato lines expressing heterologous plant defense genes. **Planta**, DOI 10.1007/s00425-005-0026-x, 2005.

SELA-BUURLAGE, M.B.; PONSTEIN, A.S.; BRES-VLOEMANS, S.A.; MELCHERS, L.S.; van den ELZEN P.J.M.; CORNELISSEN, B.J.C. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. **Plant Physiology**, v. 101, p. 857-863, 1993.

SLATER, A.; SCOTT, N.; FOWLER, M. Plant disease resistance. In: SLATER, A.; SCOTT, N. and FOWLER, M. **Plant Biotechnology: The Genetic Manipulation of Plants**. OXFORD: New York, p. 157-178, 2003.

SOUZA, C.A.S.; DIAS, L.A.S. Melhoramento Ambiental e Sócio-Economia. In: DIAS, L.A.S. **Melhoramento genético do cacauero**. FUNAPE - UFG, 2001. Cap.1.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; M'ETRAUX, J.P. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review Phytopathology**, v. 35, p. 235–70, 1997.

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

VARGHESE, J.N.; GARRETT, T.P.J.; COLMAN, P.M.; CHEN, L.; HOJ, P.B.; FINCHER, G.B. Three-dimensional structures of two plant β -glucan endohydrolases with distinct substrate specificities. **Biochemistry**, v. 91, p. 2785-2789, 1994.

WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Cocoa**. Longman: London, 1985.

ZAREIE, R.; MELANSON, D.L.; MURPHY, P.J. Isolation of fungal cell wall degrading proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves infected with *Rhynchosporium secalis*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 15, n. 10, p. 1031-1039, 2002.