

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



ESTUDO FUNCIONAL DE CISTATINAS DO CACAU
(*Theobroma cacao*) POR MEIO DE EXPRESSÃO EM
PLANTAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum*)

LIVIA SANTANA DOS SANTOS

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2012

LIVIA SANTANA DOS SANTOS

ESTUDO FUNCIONAL DE CISTATINAS DO CACAU (*Theobroma cacao*) POR MEIO DE EXPRESSÃO EM PLANTAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum*)

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: Biologia e Genômica.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Fevereiro de 2012

S237

Santos, Livia Santana dos.

Estudo funcional de cistatinas do cacau (*Theobroma cacao*) por meio de expressão em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) / Livia Santana dos Santos. – Ilhéus, BA : UESC, 2012.
xx, 73 f. : il.

Orientador: Carlos Priminho Pirovani.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Referências: f. 51-73.

1. Genética vegetal. 2. Marcadores genéticos. 3. Proteínas. 4. Plantas – Melhoramento genético. 5. Cacau. 6. Regulação da expressão gênica. 7. Reação em cadeia da polimerase. I. Título.

CDD 581.35

LIVIA SANTANA DOS SANTOS

ESTUDO FUNCIONAL DE CISTATINAS DO CACAU (*Theobroma cacao*) POR MEIO DE EXPRESSÃO EM PLANTAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum*)

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: Biologia e Genômica.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2012.

Prof. (a) Dra. Fátima Cerqueira Alvim
UESC

Prof.(a) Dra. Fabienne Micheli
UESC

Prof.(a) Dra. Poliane Alfenas Zerbini
UFV

Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani
UESC - Orientador

Aos meus pais Joselito Alves dos Santos e Anivalda Santana dos Santos pela dedicação e renúncia necessárias para a realização do nosso sonho.

DEDICO

Ao professor Dr. Júlio Cezar de Mattos Cascardo (*in memoriam*) pela amizade, incentivo e participação intelectual na idealização deste projeto, saudades eternas.

OFEREÇO

“Nobody said it was easy
It's such a shame for us to part
Nobody said it was easy.
No one ever said it would be so hard
I'm going back to the start. ”

(The Scientist - Coldplay)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de progredir.

À FAPESB pelo apoio financeiro a este projeto.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À UESC através do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do curso.

Ao meu orientador, Carlos Priminho Pirovani, pelos valiosos ensinamentos, pela amizade e pelo companheirismo em todos os momentos.

Ao professor Dr. Marcio Gilberto Cardoso Costa pela valiosa co-orientação e pela intensiva colaboração.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, em especial ao professor Dr. Leandro Lopes Loguércio exemplo de didática docente e como pessoa.

Aos amigos e colegas de laboratório, principalmente à família LCT, Proteômicos e “agregados” (em especial a Amanda Mendes, Aurizângela Sousa, Luciana Cidade, Laís Freire, Jamilly Azevedo, Ana Camila Freitas, Verônica Santana, Milena Amaral, Genilson Oliveira e Nilza Pirovani), figuras imprescindíveis à condução deste projeto.

As amigas-irmãs: Analine dos Santos Nascimento e Verônica Cordeiro Silva pelo incomensurável apoio e colaboração na realização deste projeto.

Aos amigos de longa data (quer dizer, nem tão longa assim) Eli Cristina, Marcus Montargil, Agnaldo Guimarães, Iara Brito, Alício Costa e Cosme Silva, pela amizade dedicada, que sempre soube superar a distância imposta pelos caminhos trilhados.

Aos colegas de curso: Sanderson Tarciso, Gileno Lacerda, Ricardo Porto, Ronaldo Carvalho, Raoni Souza, Jamile Oliveira, Fernanda Ancelmo, Bruna Melo, Cintia Marques, Caio Vivas, Allan Pereira, Cleiziane Bispo e Luciano Gama, pela amizade e pelos momentos de convívio, dificuldades e alegrias. Vocês serão sempre lembrados.

A José Ailtom (Nego), amigo, companheiro e namorado, sempre presente, mesmo nos momentos em que eu estive ausente para a realização deste sonho, muito obrigada pelo seu carinho.

A minha família paterna e materna: irmãos, sobrinhos, tios, primos e a todos que torceram pela realização deste projeto.

A todos os amigos que participaram direta ou indiretamente na construção e realização deste trabalho, o meu sincero obrigada.

ÍNDICE

EXTRATO.....	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Obtenção de plantas transgênicas	14
3.1.1 Amplificação do cDNA das cistatinas	14
3.1.2 Purificação e subclonagem dos fragmentos de cDNA	15
3.1.3 Digestão e purificação dos fragmentos para clonagem.....	16
3.1.4 Clonagem em pUESC28 e diagnóstico de orientação das clonagens	16
3.1.5 Transformação genética de plantas	17
3.1.5.1 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....	17
3.1.5.2 Transformação das plantas de tabaco	18
3.1.5.3 Acompanhamento das plantas transformadas	19
3.2 Análises Moleculares	20

3.2.1 Extração de DNA genômico.....	20
3.2.2 Detecção dos transgenes	20
3.2.3 Extração de proteínas total das folhas.....	21
3.2.4 Análise do acúmulo de transcritos	22
3.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida e Western Blot.....	22
3.3 Análises fenológicas, fisiológicas e estudo funcional	23
3.3.1 Aclimação de plantas transformantes.....	23
3.3.2 Avaliação fenológica das plantas	24
3.3.3 Análises fisiológicas	24
3.3.4 Estudo funcional.....	25
3.3.4.1 Resposta das plantas de tabaco expressando cistatina à NEP	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Obtenção de plantas transgênicas	27
4.1.1 Amplificação do cDNA das cistatinas via PCR.....	27
4.1.2 Purificação dos fragmentos de cistatina para clonagem	28
4.1.3 Subclonagem dos fragmentos de cDNA em PTZ57R/T e em PGEMT–easy	29
4.1.4 Obtenção dos fragmentos e clonagem em PCambia modificado	31
4.1.5 Acompanhamento das plantas transformadas	35

4.2 Análises Moleculares	36
4.2.1 Extração de DNA genômico.....	36
4.2.2 Análise do acúmulo de transcritos	37
4.2.3 Extração de proteínas	39
4.3 Análises fenológicas	41
4.4 Avaliação do crescimento	43
4.5 Análises fisiológicas	44
4.6 Estudo funcional.....	47
4.6.1 Resposta dos clones de tabaco expressando cistatinas do cacau à proteína NEP	47
5. CONCLUSÕES	50
6. PERSPECTIVAS	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

EXTRATO

DOS SANTOS, Livia S., M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - Bahia fevereiro de 2012. **ESTUDO FUNCIONAL DE CISTATINAS DO CACAU (*Theobroma cacao*) POR MEIO DE EXPRESSÃO EM PLANTAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum*).** Orientador: Dr. Carlos Priminho Pirovani. Co-orientador: Dr. Marcio Gilberto Cardoso Costa.

A região cacaeira tem sofrido grandes perdas desde 1989 devido à ação do fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, causador da vassoura-de-bruxa no cacaeiro. No processo de infecção uma proteína do patógeno, a *MpNEP* (Necrosis Ethylene-inducing Proteins), induz morte celular (PCD) ativando cisteíno-proteases. Em bibliotecas de cDNA da interação *Theobroma cacao* - *M. perniciosa* foram identificadas quatro cistatinas (*Tccys1*, *Tccys2*, *Tccys3* e *Tccys4*). As cistatinas são inibidores de cisteíno-proteases relacionadas com mecanismos de crescimento e desenvolvimento das plantas, estresse biótico e abiótico, defesa contra patógenos e inibição da PCD por inibir as cisteíno-proteases. O presente trabalho teve como objetivo geral superexpressar cistatinas de cacau em plantas modelo de tabaco e avaliar a atividade inibitória das cistatinas frente à proteína relacionada com a morte celular (*MpNEP*) nas plantas transgênicas. Trabalhos anteriores já demonstraram que a *NEP* recombinante induz a morte celular em folhas e células em suspensão de tabaco, e o curto ciclo de vida das plantas de tabaco possibilita seu uso como modelo de transformação genética facilitando a avaliação das alterações fenotípicas e/ou fisiológicas nos transgênicos. As referidas cistatinas foram clonadas no vetor pCambia1390 sob controle do promotor CAMV 35S. As construções foram inseridas em plantas de tabaco, mediante

transformação genética utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. O DNA genômico de folhas jovens de cada construção gênica e da planta controle não-transformada foi extraído e submetido a reação de amplificação via PCR, utilizando *primers* específicos para cistatinas do cacau. A partir da confirmação da transgenia, as plantas transgênicas regeneradas foram avaliadas quanto à expressão de *Tccys3* e *Tccys4* por PCR em tempo real qRT-PCR através do método $\Delta\Delta Ct$. As plantas transformadas com *Tccys4* apresentaram uma expressão 8,9 vezes maior que o calibrador, ao passo que, plantas transformadas com *Tccys3* apresentaram uma expressão 3,2 vezes maior que o calibrador. As análises proteicas por western blot, mostraram que para plantas transformadas com *TcCYS4* a expressão proteica relativa foi até 1,5 maior que nas plantas não transformadas. Análises fenotípicas de crescimento e análises fisiológicas foram efetuadas visando avaliar possíveis alterações decorrentes da transgenia, no entanto, para ambas as análises não houve diferenças significativas entre as plantas transformadas e as plantas não transformadas. A superexpressão das cistatinas foi avaliada com o estudo funcional através da infiltração foliar da *MpNEP* e observação das lesões necróticas, os resultados obtidos revelaram que as plantas que apresentaram superexpressão do gene *Tccys4* no qRT-PCR mostraram-se capazes de inibir a atuação da *MpNEP* no tocante à progressão da PCD em plantas de tabaco. Os dados obtidos com o desenvolvimento deste trabalho permitem um melhor entendimento a cerca da atuação das cistatinas *in vivo* e a partir deste confirmar a participação das cistatinas no processo de morte celular induzido por *MpNEP*.

Palavras Chave: NEP, PCD, Fitocistatinas, Inibidores de proteases.

ABSTRACT

DOS SANTOS, Livia S., M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - Bahia fevereiro de 2012. **FUNCTIONAL STUDY OF COCOA CYSTATINS (*Theobroma cacao*) BY EXPRESSION IN TOBACCO PLANTS (*Nicotiana tabacum*)**. Advisor: Dr. Carlos Priminho Pirovani. Advisor-committee: Dr. Marcio Gilberto Cardoso Costa.

The basidiomycete *Moniliophthora perniciosa* was identified in Bahia in 1989. By the time, Bahia was the major producer of cacao in Brazil. Sense then, numerous projects has been carried out looking for alternatives to control the witches' broom disease (WBD) in cacao. We have previously identified, in a cDNA library representative of *T. cacao*: *M. perniciosa* interaction, four *T. cacao* cystatins (*TcCys1*, *TcCys2*, *TcCys3* and *TcCys4*). All of them proved to have an inhibitory activity against *M. perniciosa* when challenged biochemically. Cystatins are cysteine papain like protease inhibitors and are related to different mechanisms during: a) plant growth and development; b) plant response to biotic and abiotic stress, including fungi, insects, viruses and nematodes defense and c) inhibition of PCD (Programmed Cell Death). During WDB *M. perniciosa* secret *MpNEP* (a Necrosis Ethylene-inducing Proteins), a protein known to induce cell death (PCD) by activating cysteine proteases. The use of cystatin as a biotechnological tool, via transgenic plant, has been the focus of several studies. In the present work two *T. cacao* cystatins were over expressed in *Nicotiana tabacum*. *Tccys3* and *Tccys4* cDNAs were amplified by PCR using specific primers. The DNA fragments were purified and cloned in PTZ57R/ T vectors, when it comes to *Tccys3*, and PGEMT easy to *Tccys4*. *Tccys3* and 4 were then transferred to the modified pCambia 1390 vector, driven under the control of CAMV 35S promoter and NOS terminator. DNA orientation was identified by PCR using the Forward or NOS Poly- A as Reverse primers. *Agrobacterium tumefaciens*, strain

EHA105, were heat shock transformed and used for the *N. tabacum* genetic transformation. Plants regenerated were kept under controlled conditions. *N. tabacum* transformation was confirmed by PCR. Positive plants were evaluated by real time PCR using the method $\Delta\Delta C_t$. It was observed that plants transformed with *TcCYS4* showed an expression 8.9 times higher than the calibrator, whereas plants transformed with *TcCYS3* showed an increment of 3.2 times in comparison to the calibrator. *TcCYS3* and 4 levels in transgenic plants were then revealed. For so, same amounts of protein, isolated from transgenic and control plants, were submitted to a western blot analysis using polyclonal antibody against *TcCYS4*. It was observed that transformed *N. tabacum* presented an 1.5 increment in *TcCYS4* level in comparison to the untransformed plants. Phenotypic analysis, including growth and physiological parameters, were performed to evaluate possible changes resulted from the plants genetic modification., However, for both analyzes no significant differences were observed between the transformed and untransformed plants. A biological test was conducted by infiltrating MpNEP in *N. tabacum* leaves. The result revealed that all transformed plants presented a higher tolerance to MpNEP in comparison to untransformed plants. Furthermore, the level of *Tccys3* and *Tccys4* mRNA correlated with the degree of plant tolerance. Taken together, these data suggests that, as in others pathosystems, cystatins can play a role in *T. cacao* defense against *M. pernicioso* giving new insights to comprehend the molecular basis of the interaction process and to WBD control program.

Key-words: NEP, PCD, Phytocystatins, Proteinase Inhibitor.

1. INTRODUÇÃO

O termo cistatina refere-se a proteínas funcionalmente inibidoras reversíveis da atividade de cisteíno-proteases como a papaína, as catepsinas e as caspases (BODE & HUBER, 1992; GIANOTTI *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2003; VAN DER HOORN & JONES, 2004; YANG & YEH, 2005). As cistatinas são expressas em todos os organismos: bactérias, fungos, plantas, animais, incluindo os mamíferos (BALBIN *et al.*, 1994; GIANOTTI *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2003; PERNAS *et al.*, 1999) e vírus (GHOLIZADEH *et al.*, 2005).

As cistatinas constituem uma superfamília evolutivamente relacionada, subdividida em três famílias: (i) as estefinas, proteínas desprovidas de pontes de dissulfeto; (ii) as cistatinas na qual estão agrupadas as proteínas que apresentam pontes de dissulfeto e, (iii) os kininogênios constituídos por glicoproteínas de alto peso molecular (REIS & MARGIS, 2001). Dentro desta superfamília existem os três grupos de cistatinas de origem animal e um grupo que possui representantes exclusivamente em plantas, as fitocistatinas (MARGIS *et al.*, 1998; MARGIS-PINHEIRO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2003; REIS & MARGIS, 2001).

As fitocistatinas têm sido identificadas em um grande número de plantas, tanto em monocotiledôneas quanto em eudicotiledôneas (MOSOLOV & VALUEVA, 2005). Sua massa molecular varia de 5 a 87 kDa, possuem estabilidade em condições extremas de temperatura e pH (OLIVEIRA *et al.*, 2003; PERNAS *et al.*, 1999).

Várias funções biológicas têm sido atribuídas às fitocistatinas, dentre elas: a regulação endógena das cisteíno-proteases durante o desenvolvimento e germinação da semente (CEITA, 2004; GIANOTTI *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2003); a defesa contra ataque de patógenos, nematódeos e insetos (SOARES-COSTA *et al.*, 2002; MARTINEZ *et al.*,

2005; MITTLER *et al.*, 1995; MOSOLOV & VALUEVA, 2005; RIVARD *et al.*, 2007; SOARES-COSTA *et al.*, 2002; OLIVA *et al.*, 2004; SOLOMOM *et al.*, 1999) e a regulação do processo de PCD (Programmed Cell Death) induzido pela atividade das cisteíno-proteases mediante stress biótico ou abiótico (GIANOTTI *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2003; SOLOMOM *et al.*, 1999).

As interações entre cistatinas e cisteíno-proteases são parte integral dos processos de defesa das plantas e por isso podem ser consideradas ferramentas poderosas para aplicações biotecnológicas, servindo como eficiente mecanismo para aumentar a resistência das plantas contra o ataque fitopatogênico (BELENGHI *et al.*, 2003; KIGGUNDU *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2003; PERNAS *et al.*, 1999; SOLOMOM *et al.*, 1999).

A região cacaeira sul baiana têm vivenciado grave crise econômica desde o final da década de 80, decorrente da proliferação do fitopatógeno *Moniliophthora (=Crinipellis) perniciosa* (Stahel) Singer (AIME & PHILLIPS-MORA, 2005) agente causal da doença popularmente denominada vassoura-de-bruxa. O processo infeccioso inicia-se através da germinação dos basidiósporos na superfície dos tecidos do hospedeiro seguido da penetração das hifas fúngicas na epiderme e estabelecimento do micélio biotrófico, algumas semanas depois se manifesta a fase saprofítica, na qual a sintomatologia característica é a morte celular (CEITA, 2004; SANTOS, 2005). A morte celular programada é um processo geneticamente controlado e essencial para o desenvolvimento e crescimento da planta, que também é desencadeada em resposta a alterações ambientais, presença de toxinas e em resposta ao ataque de patógenos pela ação de elicitores (CEITA, 2004).

Analisando a biblioteca de cDNA da interação *Theobroma cacao* – *Moniliophthora perniciosa*, confeccionada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz, foram identificados genes envolvidos em rotas metabólicas no processo de

colonização e de resposta de defesa nos tecidos do hospedeiro (GESTEIRA *et al.*, 2007). Dentre eles foram encontradas quatro sequências de cistatinas envolvidas no processo de inibição das cisteíno-proteases desencadeadoras do processo de morte celular programada (SANTOS, 2005). As referidas cistatinas foram identificadas como sendo diferencialmente expressas nas interações compatível e incompatível entre o cacau- *M. perniciosa* divergindo também: (i) quanto à sua abundância nos tecidos infectados, (ii) quanto à presença nas diferentes fases de desenvolvimento da sintomatologia característica do processo infeccioso (vassoura verde e vassoura seca), (iii) bem como quanto à localização subcelular, confirmada pela presença e/ou ausência de peptídeo sinal nas sequências gênicas das referidas cistatinas (PIROVANI *et al.*, 2008; PIROVANI *et al.*, 2010). Gesteira *et al.*, 2007 também identificaram a proteína *MpNEP* (*Necrosis Ethylene-inducing Proteins*) produzida pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* durante a interação compatível com o *Theobroma cacao*. Trabalhos anteriores já demonstraram que a *MpNEP* recombinante induz a morte celular em folhas e células em suspensão de tabaco (CEITA, 2004; GARCIA, 2007), o curto ciclo de vida das plantas de tabaco possibilita seu uso como modelo de transformação genética facilitando a avaliação das alterações fenotípicas e/ou fisiológicas nos transgênicos.

A presente dissertação teve por objetivo geral produzir plantas de tabaco superexpressando cistatinas de cacau. A hipótese de trabalho preconiza que a superexpressão de cistatinas de cacau em plantas de tabaco afetar a ação da *MpNEP* ao inibir cisteíno-proteases ativadas durante o processo de PCD desencadeado pela *MpNEP*.

O tabaco foi utilizado por se tratar de uma planta modelo nas pesquisas genéticas envolvendo a cultura de tecidos, tecnologia do DNA recombinante, e mutação induzida.

O genoma da planta de tabaco foi modificado via *Agrobacterium tumefaciens*, uma bactéria gram negativa, aeróbica, presente no solo,

que tem a capacidade de transferir segmentos do seu próprio DNA (T-DNA) para o genoma das plantas, o que torna o T-DNA um vetor adequado ao processo de engenharia genética (ANDRADE *et al.*, 2003; PARK, 2006).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O cacauero

O cacauero é uma planta alógama, botanicamente classificada na família Malvaceae e pertencente ao gênero *Theobroma* o qual possui mais de 20 espécies descritas, dentre as quais se destacam: *Theobroma cacao*, *Theobroma grandiflorum*, *Theobroma glaucum* e *Theobroma angustifolium* (FAVARIN, 2011). O cacau (*Theobroma cacao* L.) é o fruto do cacauero uma planta perene, arbórea e eudicotiledônea típica de clima tropical úmido que tem como ponto de origem as regiões tropicais da América Central e do Sul (ALVERSON *et al.*, 1999; JOHNS, 1999).

O fruto é do tipo baga, externamente pode ser liso ou enrugado, amelonado ou fusiforme e de coloração verde/violeta quando imaturo ou amarelo/alaranjado quando maduro. Suas amêndoas possuem em média 55% de ácidos graxos e 1,5 a 3% de teobromina (FAVARIN, 2011).

O cacau é produto nobre e de alto valor comercial na agricultura brasileira devido aos seus mais diversos subprodutos dentre os quais se destacam o chocolate, a manteiga de cacau, os cosméticos, os licores e geleias, vinagres, sucos e doces (BISPO, 2005).

O Brasil ocupa atualmente o posto de quinto maior produtor de cacau do mundo precedido por Costa do Marfim, Gana, Indonésia e Nigéria (ESTIVAL *et al.*, 2010; FAOSTAT 2010).

No Brasil, o cacau adaptou-se perfeitamente às condições edafoclimáticas da região sul da Bahia sendo utilizado desde a década de 1980 como fonte de renda exclusiva devido à monocultura estabelecida na região (DA COSTA *et al.*, 2006; GUTIÉRREZ CUENTA & NAZÁRIO, 2004).

O sul da Bahia é responsável por 70% da produção de cacau no Brasil, sendo os demais estados produtores: Pará, Rondônia, Espírito

Santo, Mato grosso e Amazonas (GUTIÉRREZ CUENTA & NAZÁRIO, 2004).

A região sul baiana de Itabuna-Ilhéus sofreu grande impacto com a queda acentuada na produtividade das lavouras devido às perdas resultantes de diversos fatores, dentre os quais se destaca a atuação do fungo *Moniliophthora perniciosa* (MANDARINO E SENA GOMES, 2009).

2.2 As interações no patossistema cacau/vassoura-de-bruxa

O estudo das interações estabelecidas entre as plantas e seus patógenos é imprescindível para o entendimento dos processos inerentes à batalha molecular que ocorre nas células vegetais (CURSINO-SANTOS *et al.*, 2003).

De forma geral a presença de um organismo invasor (fungos, bactérias, vírus ou nematódeos) ativa no hospedeiro diversas barreiras: a primeira é a produção de substâncias com a finalidade de impedir a instalação do organismo, diversas vezes ainda externamente à célula. Se esta barreira for vencida, mecanismos secundários são ativados visando impedir a proliferação do invasor dentre os quais se destacam o reforço de parede celular, a ativação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a morte celular programada dos quais os últimos ocorrem intensamente no processo infectivo do *M. perniciosa* (CEITA, 2004; CURSINO-SANTOS *et al.*, 2003; DA SILVA *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2011; LITHOLDO JUNIOR, 2009; SANTOS, 2005) bem como a participação de substâncias reguladoras principalmente o etileno, o ácido salicílico e o ácido jasmônico, respondendo à tentativa de proliferação do invasor alterando também o influxo e o efluxo de íons como o Ca^{++} , H^+ , K^+ e Cl^- (CURSINO-SANTOS *et al.*, 2003).

A cacauicultura sul Baiana tem sofrido grave crise desde o final da década de 80, decorrente da proliferação do fungo hemibiotrófico *Moniliophthora (=Crinipellis) perniciosa* (Stahel) Singer (AIME & PHILLIPS-MORA, 2005) agente causal da doença popularmente denominada vassoura-de-bruxa. O ciclo de vida do fungo inicia-se na forma do micélio biotrófico a partir da germinação dos basidiósporos (propágulos de dispersão e infecção do fungo), num primeiro contato dos basidiósporos com as regiões meristemáticas da planta ocorre a emissão do tubo germinativo e penetração deste nos tecidos do hospedeiro, as hifas primárias diferenciam-se no apoplasto onde compõem o micélio monocariótico, após algumas semanas, cerca de 60 a 90 dias após a infecção, se manifesta a fase saprofítica, na qual a sintomatologia característica é a morte celular programada (PCD) dos tecidos e presença dos grampos de conexão no micélio que então passa a ser dicariótico (CEITA, 2004; LIMA, 2007; SANTOS, 2005).

A vassoura-de-bruxa é uma doença endêmica da Amazônia, no entanto, foi detectada pela primeira vez nas lavouras baianas numa fazenda em Uruçuca em 1989, desde então se instalou uma grave crise regional devido à queda na produção das amêndoas e baixo preço internacional do cacau levando ao empobrecimento da região e conseqüentemente ao êxodo rural (DA COSTA *et al.*, 2006; OLIVEIRA & LUZ, 2005; PEREIRA *et al.*, 1996; ROCHA, 2006).

Os processos evolutivos levaram a uma co-adaptação das relações estabelecidas entre os fitopatógenos e as plantas consolidando relações espécie específicas nos mecanismos de defesa, estes mecanismos podem agir de forma constitutiva ou ser induzidos em resposta ao ataque do patógeno (VALUEVA & MOSOLOV, 2004; TREMACOLDI, 2009). A instalação da doença na região cacauieira motivou diversos estudos visando entender/elucidar os mecanismos de propagação, regulação e controle da doença (CARDOSO, 2011; CEITA *et al.*; 2007; DIAS *et al.*, 2011; GARCIA *et al.*, 2007; GESTEIRA *et al.*,

2007; PIROVANI *et al.*, 2008; PIROVANI *et al.*, 2010; PUNGARTNIK *et al.*, 2009; DA SILVA *et al.*, 2011).

2.3 Proteases, Inibidores de proteases e morte celular programada

As proteases e seus inibidores compõem uma classe proteica que atua de maneira intensa nas mais diversas reações bioquímicas que ocorrem dentro das células, hidrolisando proteínas do hospedeiro ou dos patógenos, e podem atuar na defesa e na regulação dos processos inerentes ao metabolismo celular (TREMACOLDI, 2009; VAN DER HOORN, 2008). De forma geral as proteases de atuação extracelular catalisam a clivagem proteica produzindo moléculas menores que subsequentemente serão absorvidas pelas células e exercerão a sua função efetiva, ao passo que as proteases de atuação intracelulares desempenham papel fundamental nos processos de regulação metabólica (CARDOSO, 2011; CARVALHO, 2007; VAN DER HOORN *et al.*, 2004).

Contrastando com a multiplicidade das funções atribuídas às proteases, os mecanismos através dos quais elas executam suas atividades ainda é limitado (TREMACOLDI, 2009). Dentre os processos fisiológicos que mais requerem a participação das proteases estão os processos de renovação de proteínas, a esporulação e germinação de esporos, modificações enzimáticas, processos nutricionais e mecanismos de regulação da expressão gênica; neste contexto os inibidores de proteases apresentam-se como moléculas regulatórias chave destes processos atuando na modulação positiva ou negativa dos mecanismos nos quais as proteases necessitam atuar (RAO *et al.*, 1998).

Maiores esforços têm sido empregados no estudo de proteases e de seus inibidores que desempenham uma função chave em processos fisiológicos de interesse (CARDOSO, 2011). Os fungos são os

organismos que produzem a maior variedade de proteases extracelulares revelando que estas enzimas desempenham um papel ativo nos processos de infecção (VALUEVA & MOSOLOV, 2004).

No processo de infecção do *T. cacao L.* pelo *M. pernicioso* a proteína MpNEP do patógeno induz morte celular (PCD), ativando cisteíno-proteases (SOLOMON *et al.*, 1999; CEITA, 2004; GARCIA *et al.*, 2007) e aumentando a produção de peróxido de hidrogênio (DA SILVA *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2011) através da conversão de cristais de oxalato de cálcio depositados em grande quantidade no mesófilo foliar de genótipos de cacau suscetíveis, formando drusas, que são posteriormente convertidas em espécies reativas de oxigênio (CEITA *et al.*, 2007; DA SILVA *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2011). Keates *et al.*, (2003) avaliaram as características histológicas de plantas de *Arabidopsis thaliana* frente a tratamento com NEP1, as plantas expostas à proteína NEP1 sofreram rápidas mudanças estruturais nas cutículas e extravasamento dos cloroplastos.

O estudo funcional das proteases e dos seus inibidores poderá ser utilizado na busca de moléculas alvo para a ativação de respostas de defesa do hospedeiro e/ou alvos que possam inibir os mecanismos de ataque ou de defesa do patógeno (CURSINO-SANTOS *et al.*, 2003).

2.4.1 Cistatinas

As cistatinas são moléculas expressas em todos os organismos: bactérias, fungos, plantas, animais, incluindo os mamíferos (BALBIN *et al.*, 1994; GIANOTTI *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2003; PERNAS *et al.*, 1999).

As cistatinas constituem uma superfamília evolutivamente relacionada que possui representantes de origem animal e um grupo que

possui representantes exclusivamente nas plantas, as fitocistatinas (VIDAL, 2003). A superfamília das cistatinas é constituída de quatro famílias: as estefinas, proteínas desprovidas de pontes de enxofre; as cistatinas na qual estão agrupadas as proteínas que apresentam duas pontes de sulfeto e um peso molecular variando entre 11 e 13 kDa; os kininogênios constituídos por glicoproteínas de alto peso molecular formadas por três ou mais cópias em tandem das cistatinas; e as fitocistatinas, as quais são encontradas apenas em plantas, não possuem pontes dissulfeto e apresentam uma estrutura diferenciada (MARGIS *et al.*, 1998; MARGIS-PINHEIRO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2003; REIS & MARGIS, 2001).

Para explicar a atividade inibitória das cistatinas contra as cisteíno-proteases são propostos diversos modelos de interação, todos sugerem três regiões de interação: (i) Um ou dois resíduos de Gly perto da região amino-terminal; (ii) Região central conservada, caracterizadora do sítio ativo Gly-X-Val-X-Gly (QXVXG); (iii) Um resíduo de triptofano na segunda alça perto da região carboxi-terminal, mas a possibilidade de que existam outras regiões que contribuam à atividade inibitória ainda pode existir (OLIVEIRA *et al.*, 2003; REIS & MARGIS, 2001).

As cistatinas possuem várias funções como a regulação dos processos de maturação e germinação das sementes, defesa contra herbivoria, atividade antifúngica, ativação em resposta a estresse biótico e abiótico, bem como a inibição da morte celular programada (BENCHABANE *et al.*, 2010; GRZONKA *et al.*, 2001; HABIB *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2003; VAN DER HOORN, 2008), desencadeada por peróxido (SOLOMON *et al.*, 1999; BELENGHI *et al.*, 2003).

A utilização das cistatinas como ferramenta biotecnológica tem sido foco de diversos trabalhos nos quais os genes que codificam inibidores de proteases oriundos de vários organismos são expressos em plantas, em sua maioria visando à proteção contra o ataque de insetos

e/ou fitopatógenos (BELENGHI *et al.*, 2003; PERNAS *et al.*, 1999; SOLOMOM *et al.*, 1999).

2.4.1.1 Fitocistatinas

As fitocistatinas têm sido identificadas em um grande número de plantas, tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas (MOSOLOV & VALUEVA, 2005), constitui-se de uma família formada por mais de 80 membros evolutivamente relacionados. A família das fitocistatinas pode ter evoluído de um ancestral comum que se expandiu para os diversos grupos taxonômicos de plantas vasculares através de duplicações gênicas (MARTINEZ E DYAZ, 2008). Estas proteínas apresentam ponto isoelétrico geralmente neutro ou ácido, sua massa molecular varia de 5 a 87 kDa e possuem estabilidade em condições extremas de temperatura e pH (OLIVEIRA *et al.*, 2003; PERNAS *et al.*, 1999).

Em plantas de cacau as sequências de cDNA de quatro cistatinas foram identificadas e caracterizadas por PIROVANI *et al.*, (2008) e PIROVANI *et al.*, (2010) através da análise da biblioteca de interação *Theobroma cacao* – *Moniliophthora perniciosa* (GESTEIRA *et al.*, 2007). As referidas cistatinas apresentam alta identidade entre si: *TcCYS1* e *TcCYS3* possuem 96% de identidade e possuem peptídeo sinal indicando que ambas são secretadas. *TcCYS3*, corresponde a uma forma gerada pelo splicing alternativo de *TcCYS1*. *TcCYS2* e *TcCYS4* possuem 88% de identidade. *TcCYS1* e *TcCYS4* apresentam uma região carboxi estendida com um provável sítio inibitório de leguminas (sequência SNSL) (ALVAREZ-FERNADEZ *et al.*, 1999; MARTINEZ *et al.*, 2007).

Várias funções biológicas têm sido atribuídas às fitocistatinas, dentre elas: (i) a regulação endógena das cisteíno-proteases durante o desenvolvimento das plantas conforme experimentos de Rivard *et al.*, (2007) com cistatinas de alfafa, os quais revelaram a participação destas nos processos de desenvolvimento dos tecidos de ramos e folhas promovendo uma inibição acentuada da atividades das cisteíno proteases (CORRE-MENGUY *et al.*, 2002; VAN DER VYVER *et al.*, 2003) (ii) a regulação endógena das cisteíno-proteases durante a germinação das sementes em conformidade com experimentos de Valdés-Rodríguez *et al.*, (2007) onde cistatinas de *Amaranthus hypochondriacus* L. apresentavam expressão constitutiva de cistatinas em sementes maduras e sofreram um redução dos níveis desta expressão com o desencadear do processo germinativo (ABE *et al.*, 1987; GRUDKOWSKA & ZAGDANSKA, 2004; HWANG *et al.*, 2009; HWANG *et al.*, 2010; MUNTZ *et al.*, 2001; MARTINEZ *et al.*, 2009; SAKUTA *et al.*, 2001); (iii) a defesa contra ataque de patógenos comprovada em experimentos de Pirovani *et al.*, (2010) no qual o crescimento micelial *in vitro* do fungo *Moniliophthora perniciosa* foi inibido através da pré-incubação das hifas fúngicas com as cistatinas do cacau (MARTINEZ *et al.*, 2003; MARTINEZ *et al.*, 2005; PERNAS *et al.*, 1998; PERNAS *et al.*, 1999; PIROVANI *et al.*, 2010; SOARES-COSTA *et al.*, 2002; YANG & YEY, 2005; WANG *et al.*, 2008; ZAINAL *et al.*, 2009), (iv) a defesa contra nematódeos: experimentos de Chan *et al.*, (2010) utilizando plantas transgênicas de tomate superexpressando cistatinas possibilitaram a inibição e o desenvolvimento do nematódeo *Meloidogyne incognita* e interferiu também na determinação sexual e no desenvolvimento de sua prole (VIDAL, 2003; TREMACOLDI, 2009; SAMAC & SMIGOCKI, 2003; URWIN *et al.*, 1997; VAIN *et al.*, 1998); (v) a defesa contra insetos: Carrillo *et al.* (2009), confirmaram a ação das cistatinas contra ácaros por meio de expressão heteróloga de cistatinas da cevada em plantas de milho através da alteração das suas cisteíno

proteases (BOUCHARD *et al.*, 2003; FABRICK *et al.*, 2002; FAN & WU, 2005; FRANCO *et al.*, 1999; GOULET *et al.*, 2008; LAWRENCE & KOUNDAL, 2002; MELO *et al.*, 2003; MIYAJI *et al.*, 2007; MOSOLOV & VALUEVA, 2005; SCHLUTER *et al.*, 2010); (vi) a defesa contra vírus haja visto que a atuação das cisteíno proteases é essencial para a replicação dos vírus: experimentos de Gutierrez-Campos *et al.*, (1999) utilizando plantas de tabaco super expressando cistatinas de arroz mostraram que estas plantas tornaram-se mais resistentes à infecção viral causada por potyvirose (GHOLIZADEH *et al.*, 2005) e (vii) a regulação no processo de PCD (Programmed Cell Death) induzido pela atividade das cisteíno-proteases, as quais são moléculas chave do processo, Solomom *et al.* (1999) em experimentos com soja confirmaram a participação das cistatinas bloqueando a morte celular programada mediante stress biótico ou abiótico (BELENGHI *et al.*, 2003; BENCHABANE *et al.*, 2010; CEITA, 2004; CEITA *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2007; GRUDKOWSKA & ZAGDANSKA, 2004; HWANG *et al.*, 2010; MARTINEZ *et al.*, 2003; MARTÍNEZ *et al.*, 2007; MITTLER *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2003; VAN DER VYVER *et al.*, 2003; VALDÉS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de plantas transgênicas

3.1.1 Amplificação do cDNA das cistatinas

A partir da biblioteca de interação *Theobroma cacao* – *Moniliophthora perniciosa* (GESTEIRA *et al.* 2007) as sequências de cDNA de *TcCYS1*, *TcCYS2*, *TcCYS3* e *TcCYS4* foram amplificadas via PCR (Polymerase Chain Reaction) com a utilização de primers específicos para as cistatinas do cacau. Para *TcCYS1* e 3 foram utilizados os primers Cys1e3BamHIF (5'-CCT AAG AAA AGG ATC CGG AAT GAA GA) e Cys1e3BamHIR (5'-CAC AAT GGT ACG GAT CC CTG TAT CAG) e para *TcCYS2* e 4, os primers Cys2e4BamHIF (5'-GTT TTC TGC TGA ATG GAT CCT CTG CTC) e Cys2e4BamHIR (5'-CAT GAT GCA AGG ATC CAA CCA TTT TTT C).

As reações de amplificação, foram preparadas com 10 µL de tampão 10X com (NH₄)₂SO₄ (Fermentas), 6 µL de MgCl₂ 25 mmol.L⁻¹ (Fermentas), 6 µL de dNTP, 8 µL de Primer Forward (10 pmol.L⁻¹), 8µL de Primer Reverse (10 pmol.L⁻¹), 8 µL de cDNA molde, 1,2 µL Taq DNA polimerase (Fermentas), 52,8 µL de água Milli-Q estéril (completando o volume final de 100 µL). O programa da PCR utilizado foi de 95 °C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55 °C por 45 segundos, 72°C por um minuto, 72°C por 5 minutos para finalização e estocagem a 15°C.

3.1.2 Purificação e subclonagem dos fragmentos de cDNA

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1 %, contendo EtBr (SAMBROOK et al, 1989). As bandas foram excisadas do gel e os fragmentos de DNA purificados com o uso do Kit PCR DNA and Gel Band Purification (Fermentas), de acordo com as recomendações do fabricante.

Os fragmentos das cistatinas do cacau purificados foram subclonados nos vetores, PTZ57R/T (Fermentas) em se tratando de *TcCYS1* e 3 e, em PGEMT– easy (Promega) para *TcCYS4*, através de reações com o uso da enzima T4 DNA ligase (Fermentas). A reação foi mantida por 1 hora a 22 °C, para posterior transformação de células competentes da estirpe *TOP10* de *Escherichia coli*. A confirmação dos transformantes foi feita pela técnica de PCR de colônia, utilizando 7 colônias para as *TcCYS1* e 3 subclonadas em PTZ57R/T. Para *TcCYS4* subclonado em PGEMT-easy Vector foram efetuadas utilizando 5 colônias. As condições da PCR foram mantidas conforme item 3.1.1, variando apenas o tempo inicial que foi de 94°C por 4 minutos.

As colônias transformadas contendo o plasmídeo foram cultivadas em 5 mL de meio de cultura LB (Luria Berthany) acrescido de Ampicilina 100 µg.mL⁻¹, durante 12 horas a 37°C sob agitação de 200 rpm. O plasmídeo foi recuperado das culturas com o GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas). Um clone de cada cistatina foi utilizado para o preparo de um estoque permanente em glicerol 25% e mantido no freezer a -80°C. A partir desses estoques, os clones foram nomeados pUESC67, pUESC79 e pUESC68, para *TcCYS1*, 3 e 4, respectivamente.

3.1.3 Digestão e purificação dos fragmentos para clonagem

Vetores foram preparados para a clonagem das colônias a partir de pCambia 1390 modificado (pUESC28), digerido com as enzimas *BamHI* e *EcoRI*. Os fragmentos subclonados e purificados foram digeridos com o uso de enzimas específicas: para pUESC67 e pUESC79, utilizou-se a enzima *BamHI* e para pUESC68 a enzima *EcoRI*, a digestão dos fragmentos e dos vetores foi confirmada através de corrida em gel de agarose (1 %). As bandas obtidas foram excisadas do gel e purificadas com o uso do Kit PCR DNA and Gel Band Purification (Fermentas).

3.1.4 Clonagem em pUESC28 e diagnóstico de orientação das clonagens

A partir das purificações dos fragmentos, foram preparadas reações de ligase para pUESC67 e pUESC79 no vetor pUESC28 *BamHI* e para pUESC68 no vetor pUESC28 *EcoRI*, as reações foram mantidas por 1 hora a 22 °C, para transformação de células competentes da estirpe *TOP10* de *E. coli*, a confirmação dos transformantes foi feita pela técnica do PCR de colônia, conforme reação de PCR supra citada.

Os clones foram cultivados em 5 mL de meio de cultura LB (Luria Berthany) acrescido de Canamicina 50 µg.mL⁻¹ por 12 horas a 37°C sob agitação de 200 rpm. De cada cultura foi feita a extração e purificação do DNA plasmidial com o uso do Kit GeneJET™ Plasmid Miniprep (Fermentas).

A partir dos minipreps foi efetuado o diagnóstico de orientação dos fragmentos clonados pra verificar se os mesmos encontravam-se na orientação senso ou antisenso com relação ao promotor CAMV35S no vetor pUESC28 (Figura 1).

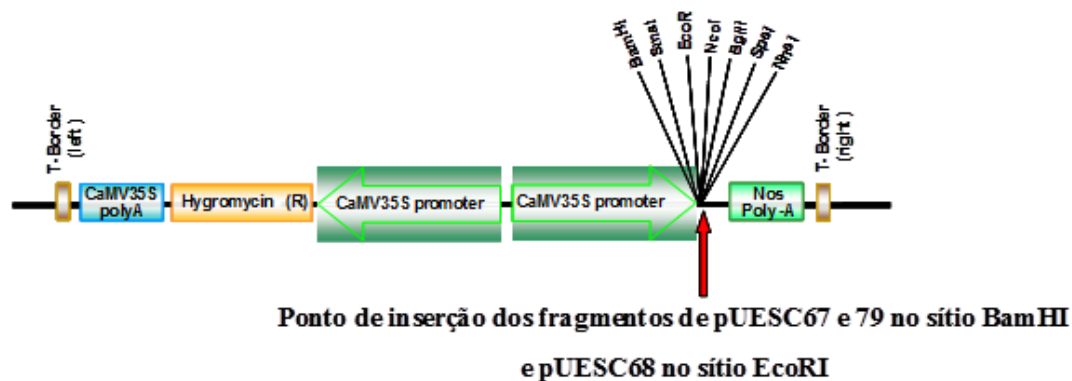


Figura 1: Mapa físico do vetor pUESC28 (pCambia 1390 modificado). A seta vermelha indica o ponto de inserção dos fragmentos de cistatina na fita, ao lado do promotor CAMV35S nos sítios *BamHI* ou *EcoRI*.

Para cada Miniprep foram preparadas 2 reações de PCR, sendo uma com primer F e outra com R, descritos no item 3.1.1, específicos para cada cDNA, e ambas usando o NosPoly-A (5' CCG ATC TAG ATA CAT AGA TG-3') como reverso; para pUESC67 e 79 primers Cys1e3BamHIF e Cys1e3BamHIR e, para pUESC68 primers Cys46NdeIF (5' CTGCTCTGAACATATGGCCACCAC) e Cys46XhoIR (5' GGTTC AACCTCGAGCAATATACAGC).

3.1.5 Transformação genética de plantas

3.1.5.1 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Um clone de cada cistatina inserida no vetor pUESC28 foi utilizado para o preparo de um estoque permanente em glicerol 25% e mantido no freezer a -80°C. A partir desses estoques, os clones foram renomeados pUESC85, pUESC86, pUESC87, pUESC88, pUESC89 e pUESC90 para pUESC67, pUESC79 e pUESC68 nas orientações senso e antisenso, respectivamente.

A partir dos clones na orientação senso, isto é, pUESC85, pUESC87 e pUESC89, foi efetuada a transformação em *Agrobacterium tumefaciens* da estirpe *EHA105* por choque térmico.

As colônias obtidas com a transformação foram confirmadas pela técnica de PCR de colônia. As reações de amplificação, foram preparadas com 10 µL de tampão 10X com (NH₄)₂SO₄ (Fermentas), 6 µL de MgCl₂ 25 mmol.L⁻¹ (Fermentas), 6 µL de dNTP, 8 µL de Primer *Forward* (10 pmol.L⁻¹), 8 µL de Primer *Reverse* (10 pmol.L⁻¹), 1,2 µL Taq DNA polimerase (Fermentas), 52,8 µL de água Milli-Q estéril (completando o volume final de 100 µL), o DNA molde utilizado foi obtido com uma amostra da colônia em placa. O programa da PCR utilizado foi de 95°C por 4 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por um minuto, 72°C por 5 minutos e finalização a 15°C. Um estoque permanente em glicerol 25% foi preparado com as colônias transformadas em agrobactéria, e estocada em freezer -20°C. A partir desses estoques, os clones foram renomeados pUESC92, pUESC93 e pUESC94 para respectivamente pUESC85, pUESC87 e pUESC89.

3.1.5.2 Transformação das plantas de tabaco

As construções confirmadas na orientação senso apenas para *TcCYS3* e *TcCYS4* foram utilizadas para transformar células de *Agrobacterium tumefaciens* da estirpe *EHA105*. O protocolo básico de transformação consistiu no co-cultivo de explantes de tabaco em meio de cultura líquido juntamente com a linhagem de agrobactéria contendo o vetor com o gene a ser introduzido na planta. Os explantes foram transferidos para um meio sólido de regeneração contendo (Cefotaxima 500 mg.L⁻¹ e Higromicina 10 mg.L⁻¹ e BAP 5 mg.L⁻¹) respectivamente

utilizados: para eliminar as células de *Agrobacterium* que se tornam desnecessárias a partir desse momento; um agente de seleção, responsável pela inibição do crescimento de células não-transformadas; e um regulador de crescimento dos brotos. O processo de transformação das plantas de tabaco demonstrou resultados eficientes com a obtenção de calos. Durante as semanas seguintes, as células transformadas diferenciaram-se naturalmente em brotos para todos os clones utilizados.

3.1.5.3 Acompanhamento das plantas transformadas

As plantas transformadas foram individualizadas e transferidas para recipientes do tipo magenta contendo meio sólido de enraizamento MS – Murashige and Skoog (1962), suplementado com sacarose 30 g.L⁻¹ e I-inositol 100 mg.L⁻¹, acrescido dos antibióticos Cefotaxima 500 mg.L⁻¹, Higromicina 50 mg.L⁻¹, respectivamente utilizados: para eliminar as células de *Agrobacterium* e um agente de seleção (presente na construção do vetor). A cada 15 dias as plantas foram transferidas para uma nova magenta contendo o mesmo meio de cultura, até que as plantas apresentassem folhas grandes o suficiente para a extração de DNA.

3.2 Análises Moleculares

3.2.1 Extração de DNA genômico

Folhas medindo aproximadamente 5 cm de comprimento foram utilizadas para a extração de DNA. O protocolo utilizado para a extração do DNA das plantas foi o apresentado por Brasileiro & Carneiro (1998) com algumas alterações, o qual consiste basicamente da maceração do material vegetal com a adição de nitrogênio líquido, tratamento do mesmo com um tampão de extração, contendo CTAB a 5 %, seguido de tratamento com acetato de potássio 5 M e lavagens: com Isopropanol gelado, seguido de lavagem com álcool 70%, o precipitado formado foi ressuscitado em 30 µL de água Milli-Q estéril.

Foram efetuadas extrações de 10 amostras para cada clone (pUESC93 e pUESC94 que correspondem respectivamente ao cDNA de *TcCYS3* e *TcCYS4* acrescido de 2 extrações de plantas controle, sem a adição dos genes da cistatina, após a extração todas as amostras foram tratadas com RNase A (10 mg.mL⁻¹) durante 40 minutos à 37°C.

3.2.2 Detecção dos transgenes

O DNA total das plantas transformantes foi usado como molde para técnica da PCR utilizando primers específicos para as cistatinas, como primer Forward, Cys1e3rtF (5' GTATGGGTGAGCCCTGGAC – 3') em se tratando de pUESC93, ao passo que para pUESC94 utilizou-se o primer Cys2e 4rtF (5' – ACGGTGGAAGCTATTGATGC – 3') e o primer NOS poly-A (5' – CCCGATCTAGTAACATAGATG – 3') como Reverse da reação de amplificação. O uso do primer NOS poly-A como reverso preveniu a amplificação da cistatina endógena da planta, evitando assim,

a ocorrência de falso positivo. As reações de amplificação, foram preparadas com 2,5 μL de tampão 10X com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Fermentas), 1,5 μL de MgCl_2 25 mmol.L^{-1} (Fermentas), 1,5 μL de dNTP, 1 μL de Primer Forward (10 pmol.L^{-1}), 1 μL de Primer Reverse (10 pmol.L^{-1}), 2 μL de cDNA molde, 0,3 μL Taq DNA polimerase (Fermentas), 15,8 μL de água Milli-Q estéril (completando o volume final de 25 μL).

O programa da PCR utilizado foi modificado diversas vezes, até a obtenção da melhor amplificação com o programa: 95°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 45 segundos, 72°C por um minuto, 72°C por 5 minutos e finalização a 15°C. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1 %, contendo EtBr. Para todos os clones foram obtidas 10 plantas transformadas e confirmadas pela técnica de PCR.

3.2.3 Extração de proteínas total das folhas

Folhas jovens foram excisadas das plantas transformadas e controle para a extração proteica, esta etapa foi feita até a obtenção do ADP (pó seco de acetona). Uma massa de 0,1 a 0,2 grama de tecido foi triturada em almofariz na presença de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Em seguida, foi adicionado 1 mL de ácido tricloroacético 10% em acetona(gelado), contendo 0,07% de 2-mercaptoetanol e homogeneizado em ultrassonicador. Em seguida o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. A fase sólida foi submetida a lavagens com acetona gelada contendo 2-mercaptoetanol 0,07%, até completa despigmentação. A massa foi seca ao ar e estocada em freezer a -20°C . A recuperação de proteínas do ADP foi feita por adição de tampão de carregamento da eletroforese na proporção de 500 μL para 10 a 50 mg de ADP. Após

ultrassonicação no gelo, a fase líquida foi recuperado por centrifugação a 10.000 rpm por 10 min.

3.2.4 Análise do acúmulo de transcritos

A análise da expressão das cistatinas do cacau nas plantas transgênicas de tabaco foi feita por qRT-PCR, utilizando o kit Power SYBER[®] Green PCR Master Mix da Applied Biosystems no equipamento Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System. Os *primers* específicos para os cDNAs das cistatinas do cacau, com T_m em torno de 60 °C, foram desenhados utilizando o software Primer Express 3D para Cys1e3rtF (5' GTATGGGTGAAGCCCTGGATC – 3') e Cys1e3rtR (5' CCTTATTGCCCTCCTTAACTTCAG) em se tratando de pUESC93, ao passo que, para pUESC94 utilizaram-se o primer Cys2e 4rtF (5' – ACGGTGGAAGCTATTGATGC – 3') e Cys2e 4rtR (5' GGAAACATCAGCATCACCAGC) ambos os primers para amplificar um amplicon de 70 a 140 pb. Foram efetuadas 3 repetições biológicas, onde cada uma das réplicas biológicas possuiu 5 replicas experimentais e para normalização foi utilizado gene constitutivo actina.

3.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida e Western Blot

Os extratos de proteínas totais dos tecidos de plantas controle e transformados com os genes das cistatinas foram separados por SDS-PAGE 15 %, seguido por western blot. A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS foi realizada como descrito por (LAAEMMLI, 1970). As proteínas extraídas das folhas de todos os

clones foram, dosadas com o uso de 2D-Quant kit (GeHealthCare), conforme e recomendação do fabricante.

A análise de expressão das cistatinas do cacau foi feita por meio da técnica de western blot para TcCYS4. Para o western blot, após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose no sistema miniprotean II Xi Cell (BioRad). As membranas foram tratadas como descrito por Sambrook (1989). Os anticorpos primários foram IgG's de coelho contra as cistatinas do cacau produzidas por vias heterólogas por Pirovani *et al.* (2010). Como sistema de detecção foi utilizado anti-IgG de coelho conjugado com Fosfatase Alcalina (SIGMA), seguido de revelação com os substratos NBT/BCIP (azul de nitrotetrazólio/5-bromo-4-cloro-indolilfosfato) (GIBCO/BRL).

3.3 Análises fenológicas, fisiológicas e estudo funcional

3.3.1 Aclimação de plantas transformantes

As plantas transformadas passaram pelo processo de aclimação. Procedimento que consiste na retirada dessas plantas das condições ótimas de crescimento em laboratório (meio nutritivo, condições de temperatura, umidade e iluminação controladas) transpondo-as à condições adversas, com umidade relativa superior a 70%. Para cada clone foram aclimatadas cerca de 3 plantas, as quais posteriormente foram transferidas para o substrato Plantmax e mantidas em vasos para plantas.

3.3.2 Avaliação fenológica das plantas

O crescimento das plantas transgênicas e controle foi acompanhado por meio de fotografias periódicas e medições de altura, os dados obtidos foram plotados em um gráfico comparativo dos tratamentos, a data do início da floração serviu de limite final para as medições, possíveis alterações fenológicas foram registradas.

3.3.3 Análises fisiológicas

As plantas mantidas em casa de vegetação foram submetidas à medições no Portable Photosynthesis System modelo LI 6400 – IRGA (Figura 2) o qual gerou dados sobre a taxa fotossintética, a condutância estomática e os níveis de transpiração.

As medições foram realizadas em uma folha completamente expandida e madura, em cinco mudas por tratamento, os dados foram correlacionados visando observar se existia alguma diferença fisiológica entre as plantas de tabaco transformadas com cistatinas do cacau e as plantas não transformadas.

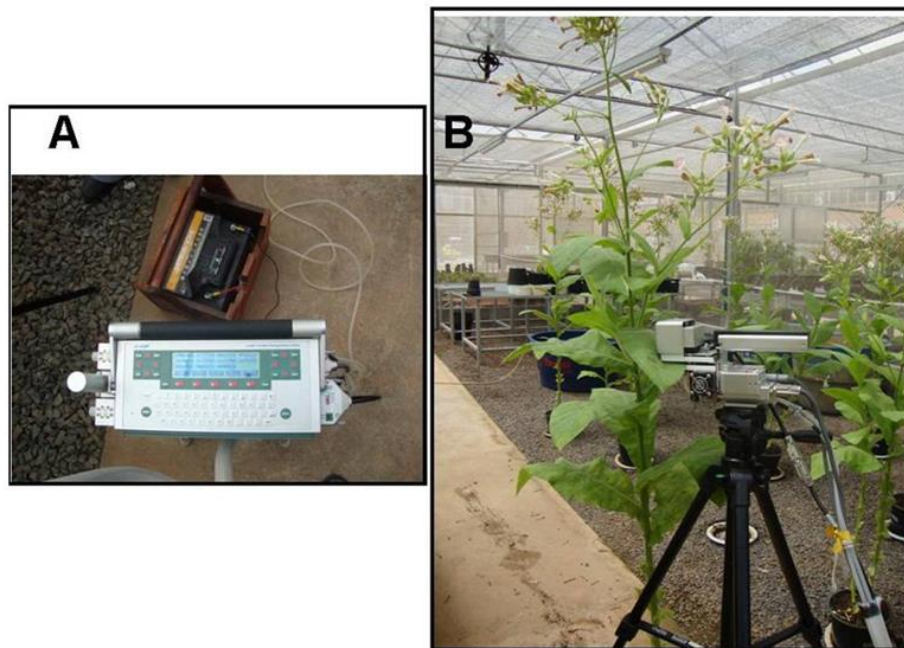


Figura 2: Equipamento utilizado para as avaliações dos padrões fisiológicos das plantas. Em A apresenta-se uma visão frontal do Portable Photosynthesis System, em B observa-se uma planta sendo avaliada.

3.3.4 Estudo funcional

3.3.4.1 Resposta das plantas de tabaco expressando cistatina à *MpNEP*

A proteína *MpNEP* recombinante, foi expressa e purificada a partir do clone produzido por Garcia *et al.* (2007) a proteína foi infiltrada no mesófilo foliar das plantas de tabaco transformadas e do controle com uso de seringa de insulina, em diluições seriadas a partir de $2,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7,6) estéril. A evolução dos efeitos da *MpNEP* foi avaliada, observando-se a intensidade das lesões

necróticas, as folhas foram escaneadas 8 horas após a infiltração da proteína.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção de plantas transgênicas

4.1.1 Amplificação do cDNA das cistatinas via PCR

As fitocistatinas têm sido identificadas em diversas espécies vegetais, e constituem uma família formada por mais de 80 membros oriundos de um mesmo ramo evolutivo (HABIB & FAZILI, 2007). Em cacau, os primeiros trabalhos que identificaram e caracterizaram as cistatinas foram de Gesteira et al. (2007), Pirovani et al (2008) e Pirovani et al (2010).

Os cDNAs de *TcCYS1*, *TcCYS2*, *TcCYS3* e *TcCYS4*, identificadas na biblioteca de cDNA da interação *T. cacao* – *M. perniciosa* (GESTEIRA et al., 2007), expressos em bactéria e caracterizados por Pirovani et al. (2010) foram amplificados via PCR com a utilização de primers específicos (Figura 3). As reações com *TcCYS1* e 3 amplificaram eficientemente os fragmentos no tamanho esperado de 700 e 500 pb, respectivamente (Figura 3, colunas 1 e 3). Para *TcCYS2* e *TcCYS4* utilizando de variações nas condições do PCR, não houve amplificação para *TcCYS2* (Figura 3, coluna 2), no entanto, para *TcCYS4*, ocorreu a amplificação de um fragmento com o tamanho esperado de 600 pb (Figura 3, coluna 4).

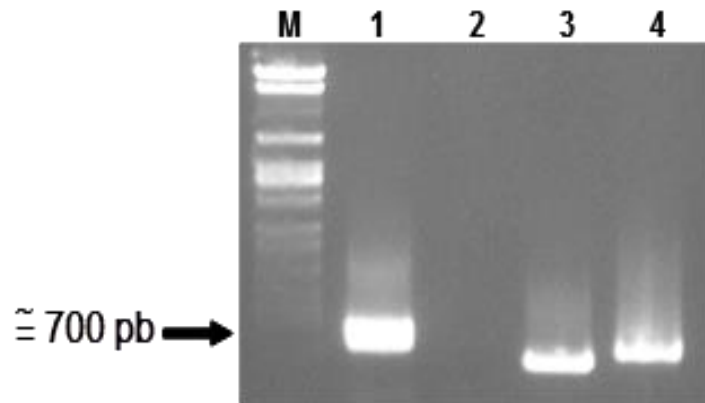


Figura 3: Amplificação dos fragmentos de cistatina via PCR. M, corresponde ao marcador Lambda *EcoRI* + *BamHI*+ *HindIII*; 1 e 3, indicam amostras de *TcCYS1* e 3 com primers *Cys1e3BamHIF* e *Cys1e3BamHIR*, respectivamente; 2 e 4, identificam amostras de *TcCYS2* e 4 com primers *Cys46NdeIF* e *Cys46XhoIR*.

4.1.2 Purificação dos fragmentos de cistatina para clonagem

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1 %, contendo EtBr , as bandas foram excisadas do gel e os fragmentos de DNA purificados com o uso do Kit PCR DNA and Gel Band Purification (Fermentas). O resultado da purificação é mostrado na figura 4, onde uma alíquota da amostra purificada foi analisada em gel de agarose.

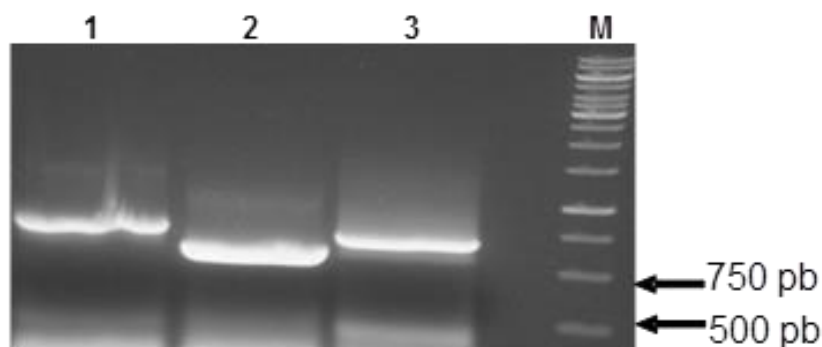


Figura 4: Fragmentos das cistatinas *TcCYS1*, *TcCYS3* e *TcCYS4*, amplificados via PCR, respectivamente identificados como 1, 2 e 3 em gel de agarose. Em M encontra-se o marcador de peso molecular Kilobase (Fermentas).

4.1.3 Subclonagem dos fragmentos de cDNA em PTZ57R/T e em PGEMT–easy

Os fragmentos purificados foram subclonados nos vetores, PTZ57R/T (Fermentas) em se tratando de *TcCYS1* e 3 e em PGEMT–easy (Promega) para *TcCYS4*. A confirmação dos transformantes foi feita pela técnica de PCR de colônia, utilizando 7 colônias para as *TcCYS1* e 3 colônias subclonadas em PTZ57R/T. Para *TcCYS1* todas as colônias foram confirmadas devido a amplificação do fragmento no mesmo tamanho que o controle feito com o DNA molde de aproximadamente 700 pb, em se tratando de *TcCYS3*, apenas uma colônia não amplificou (Figura 5, canaleta 1 para *TcCYS3*), tratando-se, provavelmente oriunda de transformante originado de plasmídeo que recircularizou sem inserto, as demais amplificaram num tamanho de aproximadamente 500 pb conforme o controle (Figura 5).

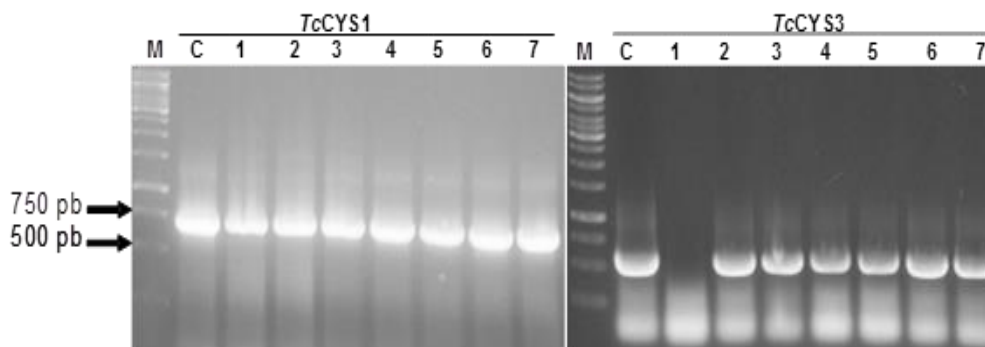


Figura 5: PCR de colônias transformantes. M, corresponde ao marcador de peso molecular Kilobase (Fermentas); C, identifica o controle das reações com cDNA molde. Para *TcCYS1*, todas as colônias amplificaram no mesmo tamanho que o controle e para *TcCYS3* apenas a colônia 1 não amplificou como o controle.

As reações para *TcCYS4* subclonado em PGEMT-easy Vector foram efetuadas utilizando 5 colônias. Para todas as colônias a transformação foi confirmada pelo tamanho do fragmento amplificado de aproximadamente 600pb, o mesmo obtido com o controle (Figura 6, compare canaletas 1 a 5 com a canaleta C).

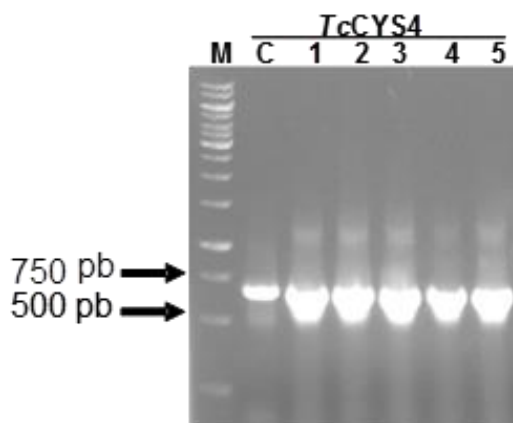


Figura 6: Amplificação do fragmento da cistatina *TcCYS4* a partir de colônias resultantes da transformação. M, corresponde ao marcador de peso molecular Kilobase (Fermentas); C, identifica o controle das reações com cDNA molde de *TcCYS4* e as canaletas de 1 a 5 correspondem às colônias transformadas.

As colônias transformadas contendo o plasmídeo foram cultivadas em meio de cultura LB (Luria Berthany) acrescido de Ampicilina 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O plasmídeo foi recuperado das culturas com o GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas). Um clone de cada cistatina, confirmado por reação de PCR conforme ampliações mostradas nas figuras 4 e 5 foi utilizado para o preparo de um estoque permanente em glicerol 25% e mantido no freezer a -80°C . Esses clones foram denominados pUESC67, pUESC79 e pUESC68, para *TcCYS1*, 3 e 4, respectivamente.

4.1.4 Obtenção dos fragmentos e clonagem em PCambia modificado

O vetor PCambia 1390 modificado (pUESC28), mostrado na figura 1, foi utilizado para a clonagem dos fragmentos de cistatina previamente subclonados nos vetores de clonagem de produtos de PCR. Os fragmentos liberados com *BamHI* dos clones pUESC67 e pUESC79, contendo, respectivamente, 700 e 370 pb (Figura 7, canaletas 1 e 2), a digestão de pUESC67 mostrada não liberou o fragmento no tamanho esperado (Figura 7, coluna 1), em vista disso foi feita uma nova digestão na qual o fragmento de pUESC67 foi obtido (Dado não mostrado); bem como o fragmento de 600 pb liberado com *EcoRI* de pUESC68 (Figura 7, canaleta 3), foram purificados do gel e inseridos no vetor pUESC28.

Os vetores foram digeridos com as enzimas *BamHI* e *EcoRI*, como mostrado na figura 7 (colunas 5 e 6) em comparação com o vetor sem digerir (coluna 4). As bandas obtidas foram excisadas do gel e purificadas com o uso do Kit PCR DNA and Gel Band Purification (Fermentas).

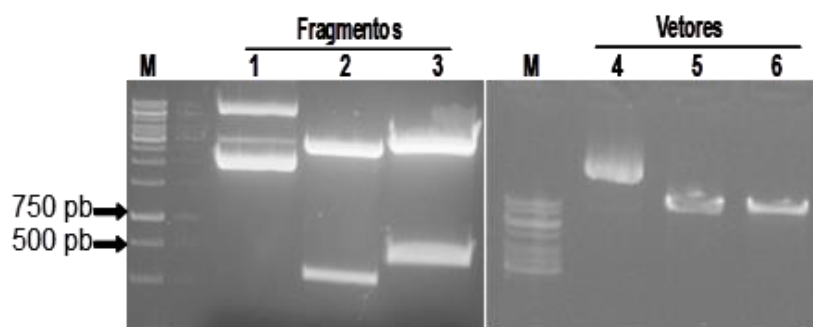


Figura 7: Fragmentos de cistatina e respectivos vetores para clonagem. Em M, encontra-se o marcador de peso molecular Kilobase (Fermentas). As canaletas 1, 2 e 3 correspondem respectivamente à digestão de pUESC67, 79 e 68, ao passo que, as canaletas 4, 5 e 6 respectivamente mostram o vetor pUESC28 não digerido, digerido com *BamHI* e digerido com *EcoRI*.

As reações de ligação para os fragmentos de pUESC67 e pUESC79 no vetor pUESC28*BamHI* e para pUESC68 no vetor pUESC28*EcoRI*, foram usadas para a transformação de células competentes da estirpe *TOP10* de *E. coli*. A confirmação dos transformantes foi feita pela técnica do PCR de colônia, os resultados podem ser observados na figura 8. Para o fragmento de pUESC67, todas as colônias foram positivas para a reação de PCR (Figura 8, pUESC67). Para o fragmento de pUESC79 cinco colônias amplificaram mediante a PCR (Figura 8, pUESC79 – canaletas 4 e 5 e 7 a 9) e para o fragmento de pUESC68 6 colônias foram confirmadas (Figura 8, pUESC68, canaletas 1, 3, 5 e 8 a 10).

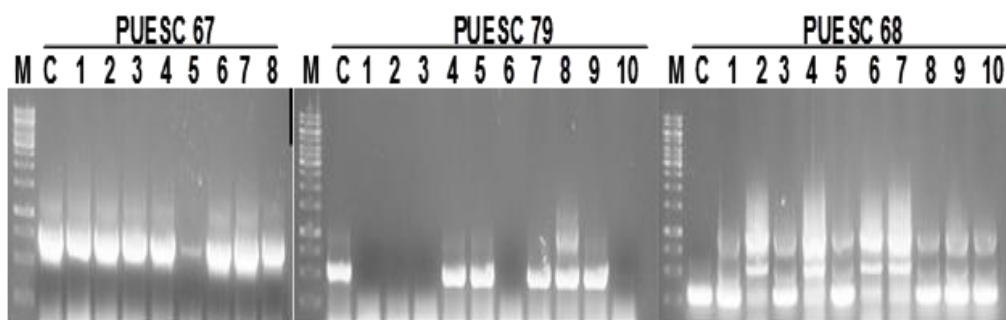


Figura 8: PCR de colônia para confirmação da clonagem dos fragmentos de cistatina no PCambia modificado (pUESC28). Em M, encontra-se o marcador de peso molecular Kilobase (Fermentas). Os números 1 a 10 identificam as colônias obtidas as quais foram comparadas ao controle de cada cDNA representado pela letra C, a banda amplificada no mesmo tamanho que o controle confirma uma colônia transformada.

Para cada clone positivo mostrado na figura 8 foi feita mini preparação de DNA (minipreps), visando o diagnóstico de orientação dos fragmentos clonados pra verificar se os mesmos encontravam-se na orientação senso ou antisenso com relação ao promotor CAMV35S no vetor pUESC28 (Figura 1).

Para cada Miniprep foram preparadas duas reações de PCR, sendo uma com primer F (Figura 9, letra a) e outra com R (Figura 9, letra b), específicos para cada fragmento de cistatina e ambas usando um primer para o Nos Poly-A (parte do vetor pUESC28) como reverso. Os clones cuja amplificação ocorreu na reação contendo o primer F (Figura 9A, B e C, letras a) correspondem a fragmento em orientação senso, ou seja, início do cDNA voltado para o promotor CAMV35S. Desta forma, o clone senso para a *TcCYS1* foi o clone de número 1 da figura 9A; os clones senso para a *TcCYS3* foram os de número 2, 3 e 4 da figura 9B e; os clones senso para a *TcCYS4* foram os de número 3 e 4 mostrados na figura 8C. Os demais clone (Figura 9A, 2 e 3; 9B, 1 e; 9C, 1 e 2) tiveram os fragmentos de cistatinas inseridos na orientação antisenso no vetor pUESC28, ou seja, com o início voltado para o terminador Nos Poly-A.

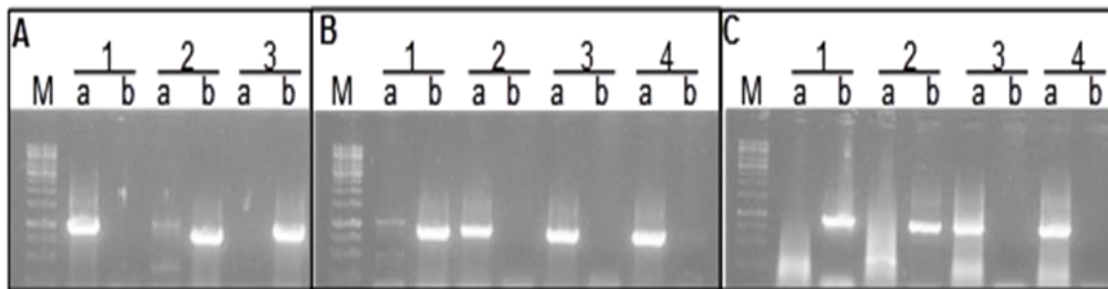


Figura 9: Diagnóstico de orientação dos fragmentos clonados de cistatinas. M, identifica o marcador de peso molecular Kilobase (Fermentas). A, B e C equivalem respectivamente aos fragmentos amplificados de pUESC67, pUESC79 e pUESC68. Os números 1, 2 e 3 correspondem a colônias transformantes, em **a** o PCR foi feito com o uso dos primers F e Nos Poly-A e; em **b**, o PCR foi feito com os primers R e Nos Poly-A.

Para cada fragmento de cistatinas foi escolhido um clone em senso e outro em antisenso para o preparo dos estoques permanentes.

O DNA plasmidial foi extraído de cada preparação para a obtenção dos minipreps apresentados na Figura 10, os quais foram renomeados como pUESC85 e 86 para pUESC67 em senso e em antisenso (canaletas 1 e 2), pUESC87 e 88 para pUESC79 em senso e em antisenso (canaletas, 3 e 4) e pUESC89 e 90 para pUESC68 em senso e em antisenso (canaletas 5 e 6).

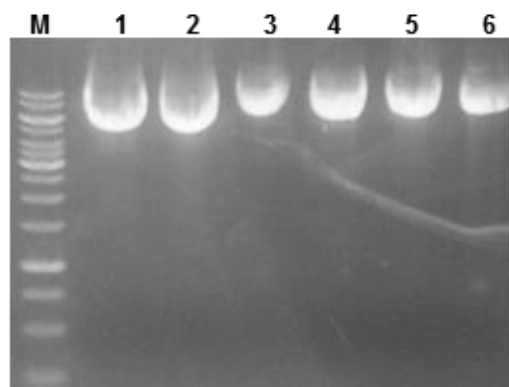


Figura 10: Plasmídeos recombinantes de pUESC28 carregando os fragmentos de três cistatinas do cacau. Em M encontra-se o marcador de peso molecular Kilobase (Fermentas); 1 a 6 são respectivamente pUESC85, 86, 87, 88, 89 e pUESC90.

4.1.5 Acompanhamento das plantas transformadas

A partir dos clones na orientação senso, foi efetuada a transformação em agrobactéria e estoques permanentes em glicerol foram preparados, com base nesses estoques, os clones foram renomeados pUESC92, pUESC93 e pUESC94 respectivamente para pUESC85, pUESC87 e pUESC89. Os estoques pUESC93 e pUESC94 foram utilizados para transformação de plantas de tabaco (*Tccys4*: tabaco e *Tccys3*: tabaco, respectivamente).

Os calos e brotos obtidos mediante processo de transformação foram mantidos em magentas com meio MS com adição de antibióticos e reguladores do crescimento até a obtenção de plântulas.

Os brotos foram transferidos sucessivas vezes para meio MS em magentas até a obtenção de plantas jovens com sistema foliar e radiculares bem desenvolvidos (Figura 11).

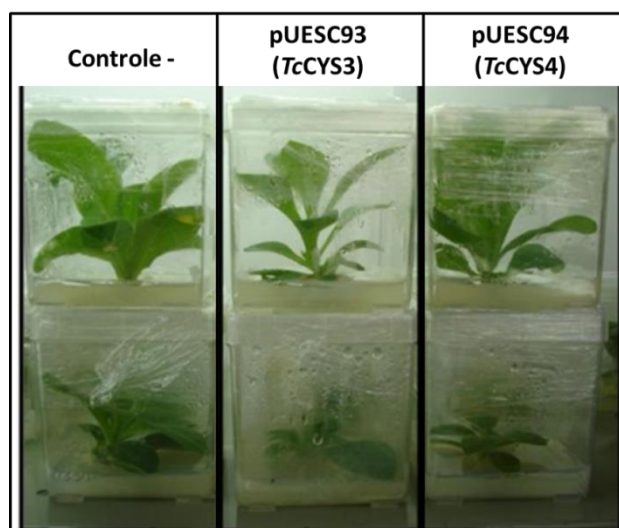


Figura 11: Plântulas de tabaco obtidas 30 dias após processo de transformação a partir de células geneticamente modificadas com cistatinas de cacau. Visualização de 2 exemplares para cada tratamento.

4.2 Análises Moleculares

4.2.1 Extração de DNA genômico

Com a finalidade de confirmar os transgenes, as folhas jovens das plantas obtidas a partir do co-cultivo de explantes com *A. tumefaciens* carreando os plasmídeos recombinantes foram utilizadas para extração de DNA e amplificação via PCR utilizando os primers F descritos no item 3.2.2. e o primer presente na construção usada para transformação das plantas (primer Nos Poly-A) visando excluir a possibilidade de amplificação de genes pertencentes a cistatinas endógenas do tabaco.

Os resultados confirmaram a amplificação dos mesmos fragmentos de cistatina inseridos nas plantas de tabaco (Figura 12) ratificando a inserção do DNA exógeno nas plantas *TcCYS3*: tabaco e

TcCYS4: tabaco, as reações efetuadas utilizando como molde o DNA extraído das plantas controle (não transformadas) não apresentaram ampliações quando utilizando os primers específicos para as cistatinas do cacau, visto que as ampliações foram efetuadas com os primers presentes nas construções inseridas nas plantas (Dados não mostrados).

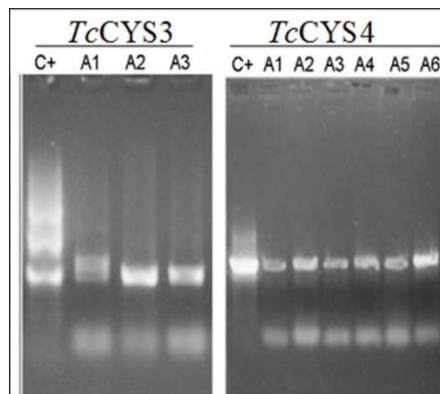


Figura 12: Análise da presença do transgene em plantas por meio de PCR, usando DNA extraído das plantas transformantes e os primers específicos. M, corresponde ao marcador de peso molecular Kilobase (Fermentas); C+, corresponde ao controle positivo das reações com plasmídeo recombinante como molde e as amostras de A1 a A6, correspondem a ampliações com o DNA extraído das plantas transformadas para os cDNAs de cistatina indicados na figura. As amostras foram separadas em gel de agarose a 1% corado com EtBr.

4.2.2 Análise do acúmulo de transcritos

Os transcritos de RNA das plantas não transformadas, *Tccys3*: tabaco e *Tccys4*: tabaco foram extraídos. A quantificação da expressão gênica de *Tccys3*: tabaco e de *Tccys4*: tabaco foi efetuada pelo método

$\Delta\Delta C_t$ (PFAFFL, 2001) com dados provenientes de três repetições biológicas (Figura 13). O programa Dissociation Curve 1.0 (Applied Biosystems, EUA) foi usado para verificar que somente um único produto de PCR foi gerado pela amplificação dos transcritos, no entanto, em ambas as curvas foi possível observar a amplificação de 2 picos distintos, um comum para as plantas transformadas e outro para as plantas não transformadas (Dados não mostrados). Este resultado não permitiu comparações entre os níveis de expressão das plantas transformadas e das plantas não transformadas, assim, a planta que obteve maior C_t foi utilizada como calibrador nas análises de expressão relativa entre as linhagens transgênicas. A utilização deste método de comparação deve-se à inexistência de um banco de dados para o genoma das plantas de tabaco, o que excluiria a possibilidade de amplificações inespecíficas ao se utilizar os primers desenhados para as cistatinas do cacau.

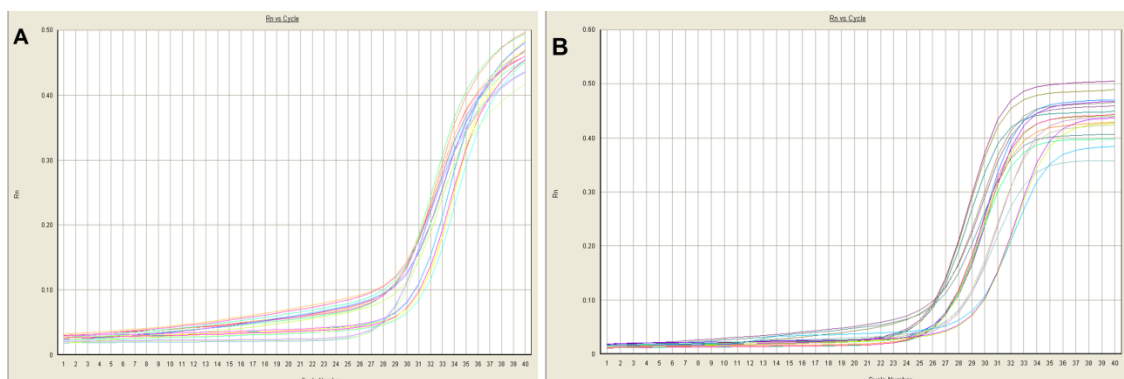


Figura 13: Curvas de amplificações utilizando-se os primers desenhados para *TcCYS3* e *TcCYS4*. Em A, encontram-se as curvas obtidas a partir dos cDNAs das plantas *Tccys3*: tabaco e em B, encontram-se as curvas para cDNAs das plantas *Tccys4*: tabaco.

A análise da expressão relativa para *Tccys3*: tabaco (Figura 14) revelou que existe uma super expressão do gene 3,2 vezes maior que a planta referência (Figura 14, respectivamente unidade experimental 1 e 4).

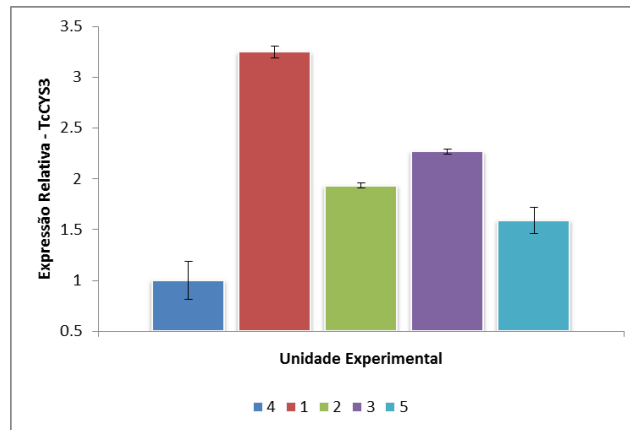


Figura 14: Expressão relativa de *Tccys3*: tabaco. A expressão do gene da β -actina foi usada como normalizador. Os dados representam a média de três réplicas biológicas \pm SE.

A análise dos níveis de expressão relativa de *Tccys4*: tabaco foi até 8,9 vezes maior que a planta referência (Figura 15, respectivamente unidades experimentais 5 e 3).

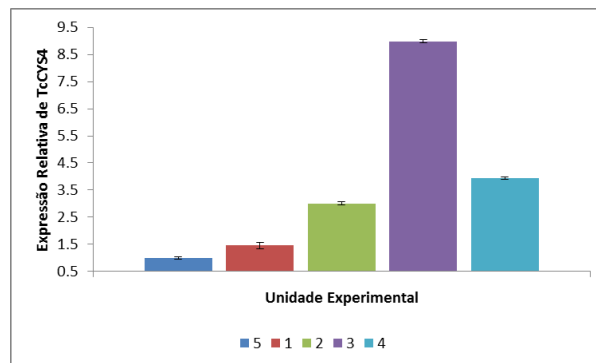


Figura 15: Expressão relativa de *Tccys3*: tabaco. A expressão do gene da β -actina foi usada como normalizador. Os dados representam a média de três réplicas biológicas \pm SE.

4.2.3 Extração de proteínas

A extração das proteínas foliares de *TcCYS4*: tabaco pelo método do ADP, foi eficiente, conforme a nitidez das bandas visualizadas no SDS-PAGE mostrado na figura 16A. A análise da expressão proteica utilizando o western blot das plantas transformadas revelou uma banda com a massa esperada de 25 kDa. A região correspondente à referida

banda é mostrada na figura 16B. A intensidade das bandas reveladas por western blot foi normalizada, com a intensidade das bandas mostradas no SDS-PAGE, utilizando o programa Image Master Platinum (GeHealthCare) que determinou o acúmulo relativo das cistatinas, tomando a média dos controles C1 e C2 (plantas não transformadas) como referência, conforme mostrado na figura 17. O nível de acúmulo da proteína foi até 1,5 vezes maior para *TcCYS4*: tabaco em comparação com o controle. Somente a linhagem 1 *TcCYS4*: tabaco, apresentou expressão da *TcCYS4* inferior ao controle. As linhagens 7 e 10 foram as que mostraram um acúmulo mais elevado. A banda revelada para as plantas controle corresponde à provável reação cruzada do anticorpo policlonal anti-*TcCYS4* contra cistatina endógena do tabaco. De acordo com Pirovani *et al.* (2010) as fitocistatinas de diferentes espécies de plantas podem apresentar epítomos em comum devido à conservação de sequência de forma global ou devido a regiões funcionais conservadas dentro dessa classe de cistatinas. A análise proteica de *TcCYS3*: tabaco por Western blot não apresentou boa visualização (dados não mostrados) provavelmente devido aos baixos níveis de expressão da proteína e/ou devido à reações inespecíficas no imunoblotting, fato recorrente segundo Van Der Vyver *et al.*, (2003) o qual ratifica a dificuldade de detectar a expressão de Oc- I (cistatinas do arroz) nas linhagens transgênicas baseada apenas num *imunoblotting*.

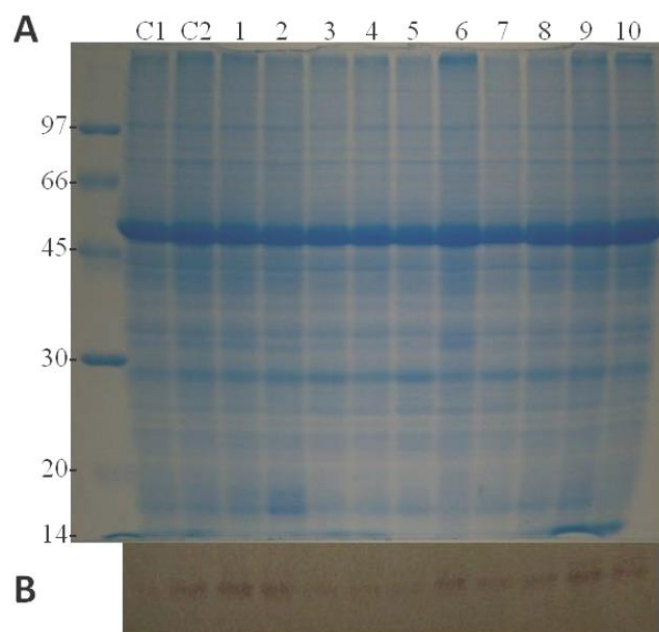


Figura 16: Diagnóstico da expressão de *TcCYS4*: tabaco do cacau em plantas transgênicas de tabaco. Em A, as proteínas foram extraídas pelo método do ADP foram fracionadas em SDS-PAGE 12.5 % corado com azul de coomassie coloidal e em B, as proteínas fracionadas por SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e sondadas com anticorpo anti-*TcCYS4*. C1 e C2 correspondem a plantas controle e 1 a 10 plantas transformadas.

4.3 Análises fenológicas

As características fenotípicas das plantas transformadas e aclimatadas no substrato Plantmax foram analisadas quanto ao tamanho, cor das folhas e altura. As plantas não apresentaram alterações sensíveis entre os tratamentos mediante observação visual, conforme apresentado na figura 18.

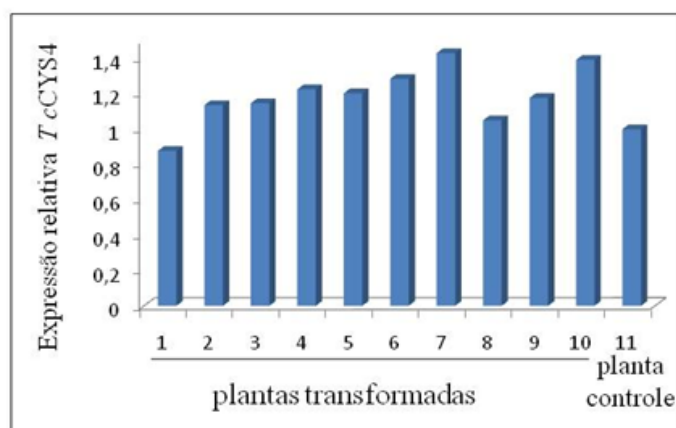


Figura 17: Quantificação relativa da expressão da proteína *TcCYS4* do cacau em linhas de plantas transformadas de tabaco. As bandas detectadas no western blot foram normalizadas com o nível de proteína total detectada no SDS-PAGE e dividida pelo volume da imagem detectado para as plantas controle, com o software Image Master 2D Platinum 6.0 (GeHealthCare).

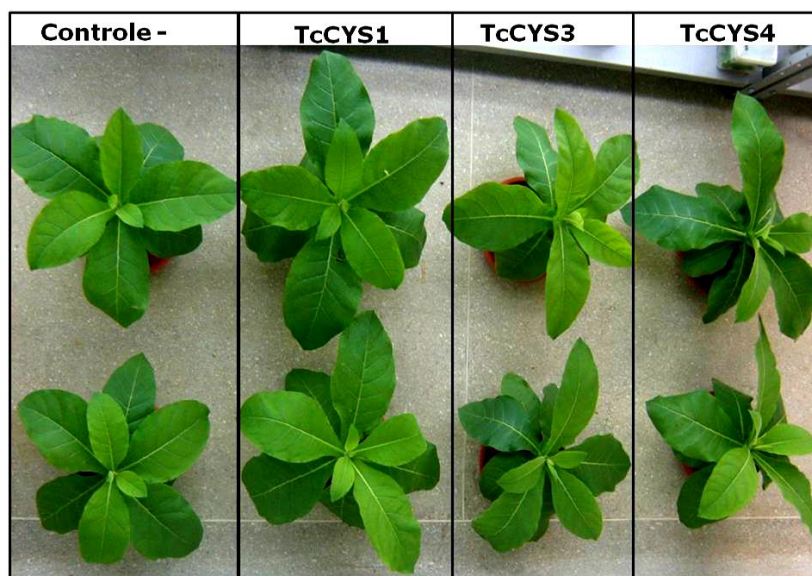


Figura 18: Plantas de tabaco transformadas com genes de cistatinas do cacau. Dois exemplares são apresentados para cada tratamento. As plantas estão aclimatadas em vasos com 17 cm de diâmetro por 17 cm de altura, contendo 3.6 litros de substrato Plantmax.

4.4 Avaliação do crescimento

O crescimento das plantas foi acompanhado por meio de fotografias periódicas, bem como através de medições da altura destas, a cada 2 dias, após transferência para a casa de vegetação até o aparecimento dos primeiros botões florais. Os dados obtidos com relação ao crescimento correspondem às medições de *Tccys3*: tabaco, *Tccys4*: tabaco e do controle negativo, as quais são apresentadas na figura 19 em forma de um gráfico comparativo através da média com base em 5 repetições por tratamento.

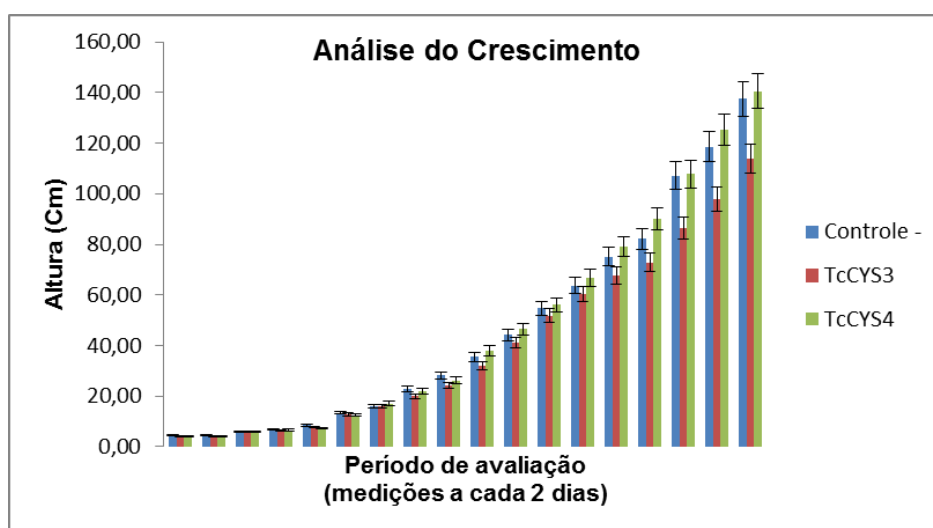


Figura 19: Gráfico de avaliação do crescimento das plantas transformadas em casa de vegetação.

A análise dos dados permitiu observar que houve diferenças visuais no crescimento das plantas transformadas, no entanto não houve diferenças estatisticamente significativas quando o desvio padrão das médias amostrais foi levado em consideração conforme análise dos dados através do Software BioEstat 5.0 (FIGURA 19).

4.4 Análises fisiológicas

A análise conjunta dos padrões avaliados pelo IRGA permite obter o rendimento quântico das taxas fotossintéticas e fatores relacionados à fotossíntese, os quais variam com a temperatura e a concentração de CO₂ devido aos seus efeitos entre as reações de carboxilase e oxigenase da rubisco (TAIZ & ZEIGER, 2003).

As plantas mantidas em casa de vegetação foram submetidas à medições no IRGA (Figura 2), o qual gerou dados sobre a taxa fotossintética, a condutância estomática e os níveis de transpiração. As unidades experimentais foram compostas de cinco plantas, das quais foram coletadas três medições para cada tratamento.

Quanto à taxa fotossintética líquida por unidade de área foliar (A) as plantas transformadas mostraram-se mais eficientes que as controle (não transformadas) conforme Figura 20, alcançando como A máxima de 12,5 $\mu\text{mol.CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para *Tccys4*: tabaco, enquanto que as plantas controle obtiveram média máxima de 10,6 $\mu\text{mol.CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. A análise estatística dos dados no Software BioEstat 5.0 revelou que as diferenças foram significativas apenas para as plantas não transformadas comparadas às *Tccys4*: tabaco ($p < 0,05$). Van Der Vyver *et al.*, 2003 analisaram o efeito da superexpressão de Oryzacistatina I (cistatina do arroz) em plantas de *Nicotiana tabacum*, nas condições avaliadas a transformação gerou um fenótipo de crescimento diferenciado corroborando os dados obtidos no presente estudo, no entanto, no tocante à taxa fotossintética, as plantas transformadas com cistatinas do arroz apresentaram menor taxa fotossintética líquida quando comparadas às plantas não transformadas em condições extremas de temperatura e luminosidade, no presente estudo as plantas foram cultivadas em casa de vegetação à temperatura e luminosidade ambiente o que poderia justificar o aumento estatisticamente significativo das taxas fotossintéticas em *Tccys4*: tabaco.

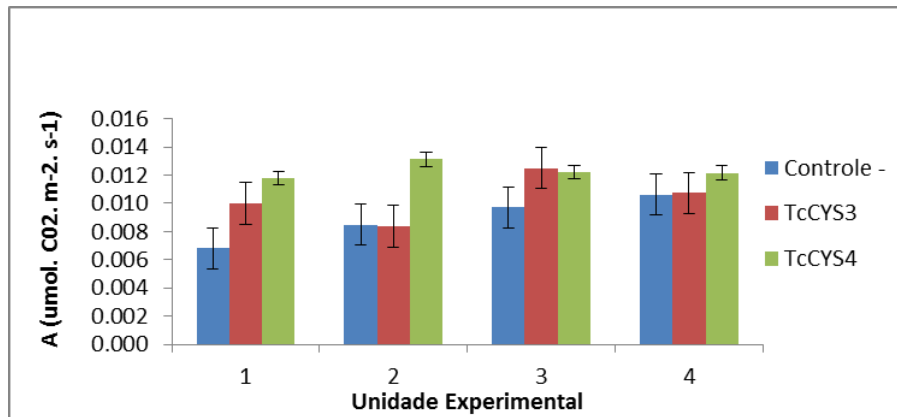


Figura 20: Avaliação da taxa fotossintética líquida (A) obtida através do IRGA em plantas cultivadas em casa de vegetação. Cada unidade experimental corresponde a uma planta da qual foram obtidas 3 medições \pm SE.

Em se tratando da condutância estomática (gs), o funcionamento dos estômatos controla a absorção de CO_2 (DA COSTA & MARENCO, 2007). As plantas controle apresentaram numericamente as maiores taxas de condutância estomática ao vapor d'água (FIGURA 21) alcançando como gs máxima de $0,352 \mu\text{mol.H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ nas plantas controle e gs mínimo de $0,24 \mu\text{mol.H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para *Tccys3*: tabaco, no entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas em análise no Software BioEstat 5.0.

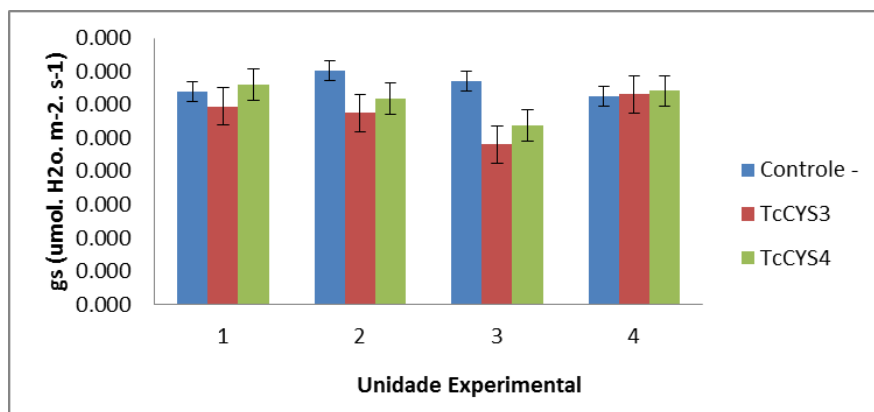


Figura 21: Avaliação da condutância estomática (gs) obtida através do IRGA em plantas cultivadas em casa de vegetação. Cada unidade experimental corresponde a uma planta da qual foram obtidas 3 medições \pm SE.

Quanto à taxa transpiratória foliar (E) alcançando como E máxima de $5,703 \mu\text{mol.H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para *Tccys4*: tabaco e E mínimo de $4,360 \mu\text{mol.H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para *TcCYS3* (Figura 22), no entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas em análise no Software BioEstat 5.0.

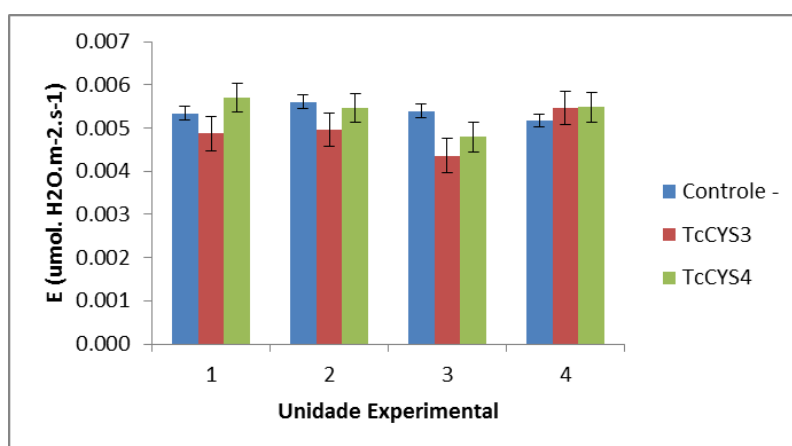


Figura 22: Avaliação da taxa de transpiração foliar (E) obtida através do IRGA em plantas cultivadas em casa de vegetação. Cada unidade experimental corresponde a uma planta, da qual foram obtidas 3 medições \pm SE.

4.6 Estudo funcional

4.6.1 Resposta dos clones de tabaco expressando cistatinas do cacau à proteína *MpNEP*

Para avaliar se as cistatinas do cacau quando superexpressas em plantas de tabaco afetam ação da proteína *MpNEP* a proteína recombinante foi produzida a partir de um clone preparado por Garcia *et al.* (2007). A proteína *MpNEP* recombinante, previamente purificada, foi utilizada em infiltrações no mesófilo foliar das plantas de tabaco transformadas e do controle com uma seringa de aplicação de insulina, conforme GARCIA *et al.* (2007), em diluições seriadas com tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7,6) estéril.

Todas as plantas transferidas para a casa de vegetação foram infiltradas com *MpNEP* nas concentrações de 2,8; 1,4; 1; 0,8; 0,6; 0,4; $0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, um controle negativo no qual apenas o tampão fosfato foi infiltrado e um segundo controle no qual o tampão da última troca da diálise foi infiltrado. Numa avaliação feita 24 horas após a infiltração da *MpNEP*, não foram verificadas diferenças significativas nos tamanhos e intensidade das lesões (dados não mostrados).

Quando o ensaio foi repetido com acompanhamento logo após a infiltração da proteína *MpNEP* no mesófilo foliar, foram observadas diferenças significativas na intensidade das lesões necróticas ainda nas primeiras horas após infiltração da *MpNEP*. O tempo ideal para avaliação das lesões necróticas foi 8 horas após a infiltração e a concentração proteica mínima foi utilizada como padrão, isto é, $0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de *MpNEP* (Figura 23).

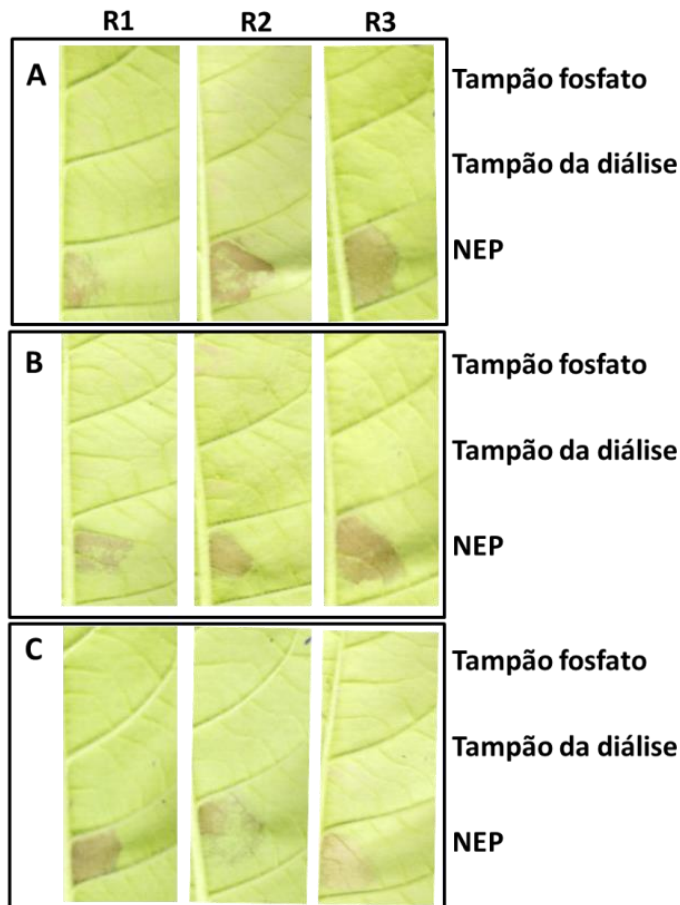


Figura 23: Avaliação das plantas após infiltração com *MpNEP*. Três folhas infiltradas de cada tratamento são apresentadas, A, B e C correspondem, respectivamente, aos tratamentos Controle -, *Tccys3*: tabaco e *Tccys4*: tabaco, 8 horas após a infiltração com o tampão fosfato, o tampão fosfato da última troca da diálise e com $0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ da proteína *MpNEP*.

Com este resultado podemos inferir que a superexpressão *in vivo* de *Tccys4*: tabaco reduz a atuação da *MpNEP*, visto que, as plantas não transformadas apresentam lesões necróticas intensas e expandidas após 8 horas de infiltração, enquanto nas plantas *Tccys4*: tabaco foram observadas apenas lesões necróticas em fase inicial. Corroborando os dados obtidos com a análise dos níveis de expressão de *Tccys4*: tabaco, as unidades experimentais que obtiveram maiores níveis de expressão

também foram aquelas que apresentaram maior inibição no estudo funcional com a *MpNEP* (Figura 23).

Em se tratando de *Tccys3*: tabaco, aparentemente a superexpressão observada no PCR em tempo real não foi suficiente para reduzir a atividade da *MpNEP*, possivelmente, devido ao fato de que esta forma proteica é secretada, ao passo que *TcCYS4* é citoplasmática (PIROVANI *et al.*, 2010).

Estudos com cistatinas e cisteíno proteases ratificam a participação destas moléculas nos processos de defesa das plantas, não somente pela atuação direta nas cisteíno proteases, mas também pelo balanço na atividade das demais proteases atuantes nas cascatas de sinalização celular (QUTOB *et al.* , 2006; VAN DER HOORN & JONES, 2004).

A maioria dos genes que respondem ao tratamento com NEP estão associados com estresse, ativando vias de indução da morte celular (ARENAS *et al.*, 2006; BAE *et al.*, 2006). Durante os processos de morte celular programada ocorre a ativação das cisteíno proteases, as quais são comprovadamente inibidas pela super expressão das cistatinas em plantas (BELENGHI *et al.*, 2003; CEITA *et al.*, 2007; SOLOMON *et al.*, 1999; CARILLO *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram dados de estudos anteriores, os quais relacionam a presença e o papel significativo da NEP no patossistema cacau – *M. pernicioso* (CEITA *et al.*, 2007; DA SILVA *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2011) e trazem uma nova possibilidade de controle da atividade do fungo com o uso das cistatinas, no tocante ao desenvolvimento dos sintomas e da progressão da doença, etapas diretamente relacionadas à morte celular induzida por *MpNEP*.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com o presente trabalho indicam que:

A expressão de cistatinas do cacau em plantas de tabaco não altera as características fenotípicas;

Os padrões fisiológicos avaliados não são alterados nas plantas transgênicas em comparação às plantas não transformadas;

A atividade da *MpNEP* é reduzida em plantas de tabaco superexpressando a cistatina *TcCYS4* do cacau.

6 PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito da infiltração da *MpNEP* por meio de qRT-PCR para outros genes envolvidos em vias de sinalização de estresse;
- Analisar a morte celular decorrente da infiltração de doses mais baixas da proteína *MpNEP*.
- Utilizar o teste de túnel para quantificar a morte celular nos tecidos infiltrados com *MpNEP*.

7 REFERÊNCIAS

ABE, K.; KONDO, E. H.; SUZUKI, K.; ARAI, S. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 262, n. 35, p. 16793 – 16797, 1987.

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. **Mycology**, n. 97, p. 1012 – 1022, 2005.

ALVAREZ-FERNADEZ, M.; BARRET, A. J.; GERHARTZ, B.; DANDO, P. M.; NI, J.; ABRAHAMSON, M. Inhibition of Mammalian Legumain by Some Cystatins Is Due to a Novel Second Reactive Site. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 274, n. 27, p. 19195 – 19203, 1999.

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**, v. 86, p. 1474 – 1486, 1999.

ANDRADE, G. M.; SARTORETTO, L. M.; BRASILEIRO, A. C. M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 465 – 476, 2003.

ARENAS, Y. C.; KALKMAN, E. R. I. C.; SCHOUTEN, A.; DIEHO, M.; VREDENBREGT, P.; UWUMUKIZA, B.; RUIZ, M. O.; VAN KAN, J. A. L. Functional analysis and mode of action of phytotoxic Nep1-like proteins of *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. n. 74, p. 376 – 386, 2010.

BAE, H.; KIM, M. S.; SCHER, R. C.; BAE, H. J. BAILEY, B. A. Necrosis- and Ethylene-Inducing Peptide from *Fusarium oxysporum* Induces a Complex Cascade of Transcripts Associated with Signal Transduction and Cell Death in Arabidopsis. **Plant Physiology**. v. 141, p. 1056 – 1067, 2006.

BALBIN, M.; HALL, A.; GRUBB, A.; MASSON, R. W.; LOPES-OTIN, C.; ABRAHANSON, M. Structural and Functional Characterization of Two Allelic Variants of Human Cystatin D Sharing a Characteristic Inhibition Spectrum against Mammalian Cysteine Proteinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 37, p. 23156 – 23162, 1994.

BELENGHI, B.; ACCONCIA, F.; TROVATO, M.; PERAZOLLI, M.; BOCEDI, A.; POLTICELLI, F.; ASCENZIZ, P.; DELLEDONNE, M. AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 2593 – 2604, 2003.

BENCHABANE, M.; SCHLUTER, U.; VOTER, J.; GOULET, M. MICHAUD, D. Plant cystatins. **Biochimie**, v.3365, p. 1-10, 2010.

BISPO, E. DA S.; FERREIRA, V. L. P.; DE SANTANA, L. R. R.; YOTSUYANAGI, K. Perfil sensorial de pó de cacau (*Theobroma cacao* L.) alcalinizado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, n. 2, p. 375-381, 2005.

BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **European Journal of Biochemistry**, v. 204, p. 433 – 451, 1992.

BOUCHARD, E.; CLOUTIER, C.; MICHAUD, D. Oryzacystatin I expressed in transgenic potato induces digestive compensation in an insect natural predator via its herbivorous prey feeding on the plant. **Molecular Ecology**. v. 12, p. 2439 –2446, 2003.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa-SPI/ Embrapa-Cenargen, p. 309, 1998.

CARDOSO, T. H. **Caracterização de uma cisteíno-protease (TcCYSPR04) do cacau (*Theobroma cacao* L.)**. 2011. 154 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2011.

CARILLO, L. G. **Cistatinas de cevada: proteínas de defense contra artrópodos**. 2009. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Espanha. 2009.

CARVALHO, H. A. S. **Análise bioquímica e molecular de proteases na interação *Theobroma cacao* – *Moniliophthora perniciosa***. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2007.

CEITA, G. de O. **Análise do processo de morte celular em *Theobroma cacao* L. induzido por *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer**. 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2004.

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

CHAN, Y.; YAHG, A.; CHEN, J.; YEH, K.; CHAN, M. Heterologous expression of taro cystatin protects transgenic tomato against *Meloidogyne incognita* infection by means of interfering sex determination and suppressing gall formation. **Plant Cell Reports**, v. 29, p. 231 – 238, 2010.

CORRE-MENGUY, F.; CEJUDO, F. J.; MAZUBERT, C.; VIDAL, J.; LELANDAIS-BRIÈRE, C.; TORRES, G.; RODE, A.; HARTMANN, C. Characterization of the expression of a wheat cystatin gene during caryopsis development. **Plant Molecular Biology**. n. 50, p. 687–698, 2002.

CURSINO-SANTOS, J. R.; DEFINA, T. P. A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.
Os segredos das plantas e de seus patógenos na era molecular.
Ribeirão Preto, 41 p., 2003.

DA COSTA, J. S.; MILTONS, M. M.; ALVES, A. F.; PARRÉ, J. L. Fatores explicativos para a diminuição da produção de cacau no Brasil: uma análise utilizando o modelo shift-share. In: XLIV CONGRESSO DA SOBER, 2006, Fortaleza. **Apresentação.** Maringá-PR, p. 12, 2006.

DA SILVA, L. F.; DIAS, C. V.; CIDADE, L. C.; MENDES, J. S.; PIROVANI, C. P.; ALVIM, F. C.; PEREIRA, G. A. P.; ARAGÃO, F. J. L.; CASCARDO, J. C. M.; COSTA, M. G. C. Expression of an Oxalate Decarboxylase Impairs the Necrotic Effect Induced by Nep1-like Protein (NLP) of *Moniliophthora perniciosa* in Transgenic Tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interactions.** v. 24, n.7, p. 839-848, 2011.

DIAS, C. V.; MENDES, J. S.; DOS SANTOS, A. C.; PIROVANI, C. P.; GESTEIRA, A. S.; MICHELLI, F.; GRAMACHO, K. P.; HAMMERSTONE, J.; AZZAFERA, P.; CASCARDO, J. C. M. Hydrogen peroxide formation in cacao tissues infected by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Physiology and Biochemistry.** v. 49, p. 917 – 922, 2011.

ESTIVAL, K. G. S.; CORREA, S. R. S.; CINTRA da, L. A. V. Do Consumo de Chocolates à Produção Cacaueira: Alternativas para Agregar Valor à Cadeia Produtiva do Cacau Fino em Ilhéus - Bahia – Brasil. In: VIII Congresso Latinoamericano de Sociología Rural, Porto de Galinhas, 2010.

FABRICK, J.; BEHNKE, C.; CZAPLA, T. BALA, K.; RAO, A. G.; HRAMER, K. J.; REECK, G. R. Effects of a potato cysteine proteinase inhibitor on midgut proteolytic enzyme activity and growth of the southern corn rootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 32, p. 405 – 415, 2002.

FAN, S.; WU, G. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 46, p. 273-292, 2005.

FAVARIN, J. L. **Tecnologia da produção de cacau**. Disponível em: <<http://www.lpv.esalq.usp.br/lpv504/Aula%201%20-%20Fumo%20e%20cacao.pdf>>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2011.

FAOSTAT. **Produção Mundial de Cacau.** Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2011.

FRANCO, O. L.; MELO F. R.; DA SILVA, M. C. M.; DE SÁ, M. F. G. Resistência de plantas a insetos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p.36-40, 1999.

GARCIA, O.; MACEDO, J. A. N.; TIBÚRCIO, R.; ZAPAROLI, 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. M. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. **Mycological Research**. n. 3, p. 443 - 455, 2007.

GESTEIRA, A. S.; MICHELLI, F.; CAREL, N.; DA SILVA, A. C.; 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**, 100: 129 – 140, 2007.

GIANOTTI, A.; RIOS, W. M.; SOARES-COSTA, A.; NOGAROTO, V.;
CARMONA, A. K.; OLIVA, M. L. V.; ANDRADE, S. S.; HENRIQUE-
SILVA, F. Recombinant expression, purification, and functional analysis
of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protein
Expression and Purification**, v. 46, n. 2, p. 483 – 489, 2006.

GHOLIZADEH, A.; SANTHA, I. M.; KOHNEHROUZ, B. B.; LODHA, M. L.;
KAPOOR, H. C. Cystatins may confer viral resistance in plants by
inhibition of a virus-induced cell death phenomenon in which cysteine
proteinases are active: cloning and molecular characterization of a cDNA
encoding cysteine-proteinase inhibitor (celostatin) from *Celosia cristata*
(crested cock's comb). **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.
42, p. 197 – 204, 2005.

GOULET, C. **Modulation de la protéolyse chez les plantes
vasculaires dans une perspective de molécule**. 2009. Philosophiae
Doctor (Ph.D) Thèse. Faculté des études supérieures de l'Université
Laval- França, 2009.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; GELBART,
W. M.; SUZUKI, D. T. **Introdução à genética**. 8ª edição. Rio de Janeiro,
Editora Guanabara Koogan, 2006.

GRZONKA, Z.; JANKOWSKA, E.; KASPRZYKOWSKI, F.;
KASPRZYKOWSKA, R.; LANKIEWICZ, L.; WICZK, W.;
WIECZERZAK, E.; CIARKOWSKI, J.; DRABIK, P.; JANOWSKI, R.;
KOZAK, M.; JASKOLSKI, M.; GRUBB, A. Structural studies of
cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochimica Polonica**, n. 48
v. 1, p. 1 – 20, 2001.

GRUDKOWSKA, M.; ZAGDANSKA, B. Multifunctional role of plant
cysteine proteinases. **Acta Biochimica Polonica**. v. 51, n. 3, p. 609-624,
2004.

GUTIERREZ-CAMPOS, R.; TORRES-ACOSTA, J. A.; SAUCEDO-
ARIAS, L. J.; GOMEZ-LIM, M. A. The use of cysteine proteinase
inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco
plants. **Nature Biotechnology**. v. 17, p. 1223 – 1226, 1999.

GUTIÉRREZ CUENCA, M. A.; NAZÁRIO, C. C. **Importância Econômica
e Evolução da Cultura do Cacau no Brasil e na Região dos
Tabuleiros Costeiros da Bahia entre 1990 e 2002**. Embrapa Tabuleiros
Costeiros. Aracajú- Sergipe. Documentos 72. 2004.

HABIB, H.; FAZILI, K. M. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology**. v. 2, n. 3, p. 068-085, 2007.

HWANG, J. E.; HONG, J. K.; JE, J. H.; LEE, K. O.; KIM, D. Y.; LEE, S. Y.; LIM, C. O. Regulation of seed germination and seedling growth by an *Arabidopsis* phytocystatin isoform, *AtCYS6*. **Plant Cell Reports**. n. 28, p.1623–1632. 2009.

HWANG, J. E.; HONG, J. K.; LIM, C. J.; CHEN, H.; JE, J.; YANG, K. A.; KIM, D. Y.; CHOI, Y. J.; LEE, S. Y.; LIM, C. O. Distinct expression patterns of two *Arabidopsis* phytocystatin genes, *AtCYS1* and *AtCYS2*, during development and abiotic stresses. **Plant Cell Reports**. n. 29, p. 905–915, 2010.

JOHNS, N. D. Conservation in Brazil's Chocolate Forest: The Unlikely Persistence of the Traditional Cocoa Agroecosystem. **Environmental Management**, v. 23, n. 1, p. 31–47, 1999.

KEATES, S. E.; KOSTMAN, T. A. ANDERSON, J. D.; BAILEY, B. A. Altered Gene Expression in Three Plant Species in Response to Treatment with Nep1, a Fungal Protein That Causes Necrosis. **Plant Physiology**. v. 132, p. 1610–1622, 2003.

KIGGUNDU, A.; MUCHWEZI, J. VAN DER VYVER, C.; VILJOEN, A.; SCHLÜTER, U.; KUNERT, K.; MICHAUD, D. Deleterious effects of plant cystatins against the banana weevil *Cosmopolites sordidus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 73, n. 2, p. 87 – 105, 2010.

LAAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 1, p. 680, 1970.

LAWRENCE, P. K.; KOUNDAL, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.5, n.1, 2002.

LIMA, L. S. **Identificação de polimorfismo em ESTs da interação cacao-*Moniliophthora perniciosa***. 2007. 101 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2007.

LITHOLDO-JÚNIOR, C. G. **Identificação e expressão de genes da biossíntese do jasmonato na interação entre *Theobroma cacao* e *Moniliophthora perniciosa***. 2009. 90 f. Dissertação (Centro de Energia Nuclear na Agricultura) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MANDARINO, E. P.; SENA GOMES, A. R. **Produtividade do cacauero (*Theobroma cacao* L.) cultivado em blocos monoclonais, no sul da Bahia, Brasil.** Boletim técnico N° 197. CEPEC/ CEPLAC. p. 1 – 32, Ilhéus – Bahia. 2009.

MARGIS, R.; REIS, E. M.; VILLERET, V. Structural and Phylogenetic Relationships among Plant and Animal Cystatins. **Archives of Biochemistry and Biophysic**, v. 359, n. 1, p. 24 – 30, 1998.

MARGIS-PINHEIRO, M.; ZOLET, A. C. T.; LOSS, G.; PASQUALI, G.; MARGIS, R. Molecular evolution and diversification of plant cysteine proteinase inhibitors: New insights after the poplar genome. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 1, p.349 – 355, 2008.

MARTINEZ, M.; LÓPEZ-SOLANILLA, E.; RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P.; CARBONERO, P.; DÍAZ, I. Inhibition of Plant-Pathogenic Fungi by the Barley Cystatin Hv-CPI (Gene *Icy*) Is Not Associated with Its Cysteine-Proteinase Inhibitory Properties. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, n. 10, p. 876 –883. 2003.

MARTINEZ, M.; ABRAHAM, Z.; GAMBARDELLA, M.; ECHAIDE, M.; CARBONERO, P.; DIAZ, I. The strawberry gene *Cyf1* encodes a

phytolectin with antifungal properties. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 417, p. 1821–1829, 2005.

MARTÍNEZ, D. E.; BARTOLI, C. G.; GRBIC, V.; GUIAMET, J. J. Vacuolar cysteine proteases of wheat (*Triticum aestivum* L.) are common to leaf senescence induced by different factors. **Journal of Experimental Botany**. v. 58, n. 5, p. 1099–1107, 2007.

MARTINEZ, M.; DIAZ-MENDOZA, M.; CARILLO, L.; DIAZ, I. Carboxy terminal extended phytolectins are bifunctional inhibitors of papain and legumain cysteine proteinases. **FEBS Letters**. v. 581, n. 16, p. 2914 – 2918, 2007.

MARTINEZ, M.; DIAZ, I. The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship. **BMC Evolutionary Biology**. v. 8, n. 198, 2008.

MARTINEZ, M.; CAMBRA, I.; CARILLO, L.; MENDOZA, M. D.; DIAZ, I. Characterization of the Entire Cystatin Gene Family in Barley and Their Target Cathepsin L –Like Cysteine-Proteases, Partners in the Hordein Mobilization during Seed Germination. **Plant Physiology**. v. 151, p. 1531 – 1545, 2009.

MELO, F. R.; MELLO, M. O.; FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELLO, L. V.; GENÚ, A. M.; SILVA-FILHO, M. C.; GLEDDIE, S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Use of phage display to select novel cystatins specific for *Acanthoscelides obtectus* cysteine proteinases. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1651. 146-152, 2003.

MIYAJI, T.; MURAYAMA, S.; KOUZUMA, Y.; KIMURA, N.; KANOST, M. R. KRAMER, K. J.; YONEKURA, M. Molecular cloning of a multidomain cysteine protease and protease inhibitor precursor gene from the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) and functional expression of the cathepsin F-like cysteine protease domain. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.40, p. 835-846, 2010.

MITTLER, R.; SHULAEV, V.; LAM, E. Coordinated Activation of Programmed Cell Death and Defense Mechanisms in Transgenic Tobacco Plants Expressing a Bacterial Proton Pump. **The Plant Cell**, v.7, p. 29-42, 1995.

MOSOLOV, V. V.; VALUEVA, A. Proteinase Inhibitors and Their Function in Plants: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 227–246, 2005.

MÜNTZ, K.; BELOZERSKY, M. A.; DUNAEVSKY, Y. E.; SCHLERETH, A.; TIEDEMANN, J. Stores proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 362, p. 1741 – 1752, 2001.

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

OLIVA, M. L. V.; CARMONA, A. K.; ANDRADE, S. S.; COTRIN, S. S.; SOARES-COSTA, A.; HENRIQUE-SILVA, F. Inhibitory selectivity of canecystatin: a recombinant cysteine peptidase inhibitor from sugarcane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 1082–1086, 2004.

OLIVEIRA, A. S.; XAVIER-FILHO, J.; SALES, M. P. Cysteine proteinases and cystatin. **Brasilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 1, p. 91 – 104, 2003.

OLIVEIRA de, M. L.; LUZ, E. D. M. N. **Identificação e Manejo das Principais Doenças do Cacaueiro no Brasil**. CEPLAC/CEPEC/SEFIT, 2005. 132p.

PARK, S. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaf disks: Evaluation of the co-cultivation conditions to increase β -glucuronidase gene activity. 2006. 74 f. Dissertação (Mestrado em Patologia de Plantas e Fisiologia de Colheita) - Faculdade da Universidade Estadual de Louisiana, Pineville, 2006.

PEREIRA, J. L.; ALMEIDA de L. C. C.; SANTOS, S. M. Witches' broom disease of cocoa in Bahia: attempts at eradication and containment. **Crop Protection**, v. 15, n. 8, 1996.

PERNAS, M.; SÁNCHEZ-MONGE, R.; GÓMEZ, L.; SALCEDO, G. A chestnut seed cystatin differentially effective against cysteine proteinases from closely related pests. **Plant Molecular Biology**. n. 38, p. 1235–1242, 1998.

PERNAS, M.; LÓPEZ-SOLANILLA, E.; SÁNCHEZ-MONGE, R.; SALCEDO, G.; RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P. Antifungal Activity of a Plant Cystatin. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 12, n. 7, p. 624 – 627, 1999.

PFÄFFL, M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**. v. 9, p. 1 – 29, 2001.

PIROVANI, C. P. CARVALHO, H. A. S.; MACHADO, R. C. R.; GOMES, D. S.; ALVIM, F. C.; POMELLA, A. W. V.; GRAMACHO, K. P.; CASCARDO, J. C. DE M.; PEREIRA, G. A. G.; MICHELLI, F. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. **Electrophoresis**, v.29, n. 11, p. 2391-401, 2008.

PIROVANI, C. P.; SANTIAGO, A. S.; DOS SANTOS, L. S.; MICHELI, F.; MARGIS, R.; GESTEIRA, A. DA S.; ALVIM, F. C.; PEREIRA, G. A. G.; CASCARDO, J. C. DE M. *Theobroma cacao* cystatins impair *Moniliophthora perniciosa* mycelial growth and are involved on postponing cell death symptoms. **Revista Planta**, v. 232, n. 1, p. 1485-1497, 2010.

PUNGARTNIK, C.; MELO, S. C. O.; BASSO, T. S.; MACENA, W. G.; CASCARDO, J. C. DE M.; BRENDEL, M. Reactive oxygen species and autophagy play a role in survival and differentiation of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 46, p. 461–472, 2009.

QUTOB, D.; KEMMERLING, B.; BRUNNER, F.; KÜFNER, I.; ENGELHARDT, S.; GUST, A. A.; LUBERACKI, B.; SEITZ, H. U.; STAHL, D.; RAUHUT, T.; GLAWISCHNIG, E.; SCHWEEN, G.; LACOMBE, B.; WATANABE, N.; LAM, E.; SCHLICHTING, R.; SCHEEL, D.; NAU, K.; DODT, G.; HUBERT, D.; GIJZEN, M.; NURNBERGER, T. Phytotoxicity and Innate Immune Responses Induced by Nep1-Like Proteins. **The Plant Cell**. v. 18, p. 3721 – 3744, 2006.

RAO, M. B.; TANKSALE, M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

REIS, E. M.; MARGIS, R. Sugarcane phytocystatins: Identification, classification and expression pattern analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 291-296, 2001.

RIVARD, D.; GIRARD, C.; ANGUENOT, R.; VÉZINA, L.; TRÉPANIER, S.; MICHAUD, D. MsCYS1, a developmentally-regulated cystatin from alfalfa. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.45, p. 508 -514, 2007.

ROCHA, L. B. **A região cacauera da Bahia - uma abordagem fenomenológica.** 2006. 292 f. Tese (Núcleo de Pós-Graduação em Geografia) - Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2006.

SAMAC, D. A.; SMIGOCKI, C. Expression of Oryzacystatin I and II in Alfalfa Increases Resistance to the Root-Lesion Nematode. **Nematology.** v. 93, n. 7, 2003.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E. F; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory Manual.** 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. 1989.

SANTOS, S. C. **Caracterização de hidrofobinas do fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer.** 2005. 72 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2005.

SAKUTA, C.; ODA, A.; KONISHI, M.; YAMAKAWA, S.; KAMADA, H.; SATOH, S. Cysteine proteinase gene expression in the endosperm of germinating carrot seeds. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 65, n. 10, p. 2243 – 2248, 2001.

SCHLÜTER, U.; BENCHABANE, M.; MUNGER, A.; KIGGUNDU, A.; VOSTER, J.; GOULET, M.; CLOUTIER, C.; MICHAUD, D. Recombinant protease inhibitors for herbivore pest control: a multitrophic perspective. **Journal of Experimental Botany**. v. 61, n. 15, p. 4169–4183, 2010.

SOARES-COSTA, A.; BELTRAMINI, L. M.; THIEMANN, O. H.; HENRIQUE-SILVA, F. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 296, p. 1194–1199, 2002.

SOLOMOM, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEN, E.; LEVINE, A. The Involvement of Cysteine Proteases and Protease Inhibitor Genes in the Regulation of Programmed Cell Death in Plants. **The Plant Cell**, v.11, p. 431–443, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. São Paulo: Artmed, 720 p., 2003.

TREMACOLDI, C. R. **Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas**. Documento EMBRAPA 353. Amazônia Oriental. Belém - Pará . 2009.

URWIN, P. E.; LILEY, C. J.; MCPHERSON, M. J.; ATKINSON, H. J.
Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic
Arabidopsis expressing a modified plant cystatin. **The Plant Journal**. v.
12, n. 2, p. 455 – 461, 1997.

VAIN, P.; WORLAND, B.; CLARKE, M. C.; RICHARD, G.; BEAVIS, M.;
LIU, H.; KOHLI, A.; LEECH, M.; SNAPE, J.; CHRISTOU, P.; ATKINSON,
H. Expression of an engineered cysteine proteinase inhibitor
(Oryzacystatin-IDD86) for nematode resistance in transgenic rice plants.
Theor. Appl. Genet. v. 96, p. 266 – 271, 1998.

VALDÉS-RODRÍGUEZ, S.; GUERRERO-RANGEL, A.; MELGOZA-
VILLAGÓMEZ, C.; CHAGOLLA-LÓPEZ, A.; DELGADO-VARGAS, F.;
MARTÍEZ-GALLARDO, N.; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, C.; DÉLANO-
FRIER, J. Cloning of a cDNA encoding a cystatin from grain amaranth
(*Amaranthus hypochondriacus*) showing a tissue-specific expression that
is modified by germination and abiotic stress. **Plant Physiology and
Biochemistry**. n. 45, p. 790-798, 2007.

VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry**. v. 69, n. 11, p. 1305-1309, 2004.

VAN DER HOORN, R. A. L.; JONES, J. D. G. The plant proteolytic machinery and its role in defence. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 400–407, 2004.

VAN DER HOORN, R. A. L. Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, n. 59, p. 191–223, 2008.

VAN DER VYVER, C.; SCHNEIDERREIT, J.; DRISCOLL, S.; TURNER, J.; KUNERT, K.; FOYER, C. H. Oryzacystatin I expression in transformed tobacco produces a conditional growth phenotype and enhances chilling tolerance. **Plant Biotechnology Journal**, v. 1, p. 101 – 112, 2003.

VIDAL, M. S.; **Potencial Biotecnológico das Cistatinas**. Documento 109. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Embrapa – Algodão. Campina Grande – PB. p. 1-27. 2003.

WANG, K.; KUMAR, S.; CHENG, Y.; VENKATAGIRI, S.; YANG, A.; YEH, K. Characterization of inhibitory mechanism and antifungal activity

between group-1 and group-2 phytocystatins from taro (*Colocasia esculenta*). **FEBS Journal**. 275: 4980-4989, 2008.

YANG, A. H.; YEH, E. K. W. Molecular cloning, recombinant gene expression, and antifungal activity of cystatin from taro (*Colocasia esculenta* cv. Kaosiung n°. 1). **Planta**, v. 221, p. 493 – 501, 2005.

ZAINAL, Z.; MAROUF, E.; ISMAIL, I.; FEI, C. K. Expression of the *Capsicum annum* (Chili) defending gene in transgenic tomatoes confers enhanced resistance to fungal pathogens. **American Journal of Plant Physiology**. v. 4, n. 2, p. 70 – 79, 2009.

ZHANG, J.C.; TAO, N.G.; TONG, Z.; DENG, X.X. Phytoeno synthase gene cloning from *Citrus sinensis* Osbeck cv. Cara Cara and its prokaryotic expression. **Agricultural Sciences in China**. v. 7, p. 148-156. 2008.