UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ESTUDOS FUNCIONAIS DE PROMOTORES DE *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA* EM PLANTAS E FUNGOS

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Abril de 2008

JAMILLY AZEVEDO LEAL SENA

ESTUDOS FUNCIONAIS DE PROMOTORES DE *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA* EM PLANTAS E FUNGOS

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: Genética e Biologia Molecular

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL
Abril de 2008

JAMILLY AZEVEDO LEAL SENA

ESTUDOS FUNCIONAIS DE PROMOTORES DE *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA* EM PLANTAS E FUNGOS

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: Genética e Biologia Molecular

APROVADA:

Prof. Dra. Andréa Cristina Mariano
UNEB/DCB

Prof. Dra. Cristina Pungartnik
UESC/DCB

Dra. Karina Peres Gramacho
CEPLAC

Prof. Dr. Júlio Cezar de Mattos Cascardo
UESC/DCB – Orientador

S474 Sena, Jamilly Azevedo Leal.
Estudos funcionais de promotores de Moniliophthora perniciosa em plantas e fungos / Jamilly Azevedo Leal Sena. – Ilhéus, BA : UESC, 2008.
xv, 60f. : il. ; anexos.

Orientador : Júlio Cezar de Mattos Cascardo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.
Bibliografia: f. 50-55.

1. Vassoura-de-bruxa (Fitopatologia). 2. Stress oxidativo. 3. Genética vegetal. 4. Reparo de DNA. 5. Expressão gênica. 6. GUS. I. Título.

CDD 634.72

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

“É melhor tentar, que preocupar-se e
ver a vida passar. É melhor tentar, ainda
que em vão, que sentar-se,
fazendo nada até o final”.

Martin Luther King

A Deus, pela luz e proteção e
à minha avó materna Jardelina Azevedo,
pelo exemplo de sabedoria e
pelo apoio irrestrito.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Jeânia Maria e Carlos Fernandes, pelo amor incondicional e por sempre acreditarem na minha capacidade. À *mana* Fernanda Azevedo, futura psicóloga, por sempre sentir orgulho da irmã aqui. Ao meu irmão Carlos Roberto, pela confiança.

Aos inesquecíveis professores Júlio Cascardo e Fátima Alvim, não só pela orientação dada, mas principalmente pela confiança e amizade.

Aos professores Márcio Costa, Cristina Pungartnik e Carlos Priminho, pela co-orientação e pelas colaborações dadas ao meu trabalho.

A todos meus amigos, em especial, Fernanda Amorim, Naiara, Marcos, Laíse, Lidyanne, Vivyanne, Vanessa, Lucas, Raul, Rafaele, Fábio, Jullian, Amanda Amorim.

Aos meus tios paternos e maternos, pelo apoio.

Aos meus primos, em especial, Jorge Luís Filho, pelas hilárias conversas sobre política. E à “tia Nilma”, por ser sempre prestativa.

Ao casal João Mendonça e Berenildes Maria, pelo imenso carinho e pela especialidade.

À família do Laboratório Cultura de Tecidos: Thiago Edson, Amanda Mendes, Elyabe Matos, Everson Batista, Laís Freire, Marina Rocha, Diana Matos,

Mayana Passos, Luciana Cidade, Sandra, Antônio Carlos (Pelé), Jaci, Augusto César, pela agradável convivência e sincera amizade.

À IC Tharcilla Braz, pela dedicação aos trabalhos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Genética e Biologia Molecular, pelas bancadas de trabalho compartilhadas e pelas ajudas oferecidas. Em especial, Cristiano, Braz, Sizenando, Sarah, Luciana, Heliana, Maíza, Joci, Daniele, Tharcilla, Wagner, com os quais pude compartilhar momentos agradáveis e dos jamais irei esquecer.

À professora Delmira Costa e sua bolsista Valéria, pela ajuda nas análises de anatomia vegetal.

À equipe do Laboratório de Monitoramento Ambiental, em especial a técnica Cristiane pela amizade e presteza.

À Universidade Estadual de Santa Cruz e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade. E à secretária do PPGGBM, Luciana Calazans, pela força e compreensão dispensadas quando sempre foi preciso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e a todos os amigos e familiares que, de alguma maneira, contribuíram ao meu crescimento pessoal e profissional.

E, acima de tudo e de todos, ao Autor da minha vida, agradeço.

ÍNDICE

EXTRATO x
ABSTRACT xii
LISTA DE FIGURAS xiv
LISTA DE TABELAS xvi
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 4
2.1. O fungo *Moniliophthora perniciosa* 4
2.2. Análises de promotores 5
2.3. Transformação genética de plantas via *Agrobacterium tumefaciens* 8
2.4. A biologia de *Saccharomyces cerevisiae* e sua utilização na pesquisa .. 10
2.5. Estresse oxidativo e reparo de danos no DNA 11
3. OBJETIVO 16
4. MATERIAL E MÉTODOS 17
4.1. Construção da rede neural e identificação das regiões regulatórias 17
4.2. Clonagem dos promotores em vetores de transformação 18
4.3. Obtenção de plantas de *Nicotiana tabacum* (tabaco) 21
4.4. Transformação genética de *Nicotiana tabacum* (tabaco) 21
4.4.1. Extração de DNA genômico 22
4.5. Ensaio histoquímico da expressão de *GUS* em plantas transgênicas de tabaco 23
4.6. Transformação genética de *Saccharomyces cerevisiae* 23
4.7. Elementos regulatórios em *MpFen* e *MpSod* 24
4.8. Alinhamento das seqüências promotoras de *M. perniciosa* 25
4.9. Ensaio de irradiação UV em plantas transgênicas 25

4.10. Ensaio de indução de estresse oxidativo em plantas transgênicas 25
5. RESULTADOS 27
5.1. Isolamento e caracterização do promotor *MpFen* 27
5.2. Análise do promotor *MpFen* em plantas de tabaco 27
5.3. *MpFen* possui elementos regulatórios de resposta a danos causados ao DNA e estresse oxidativo 31
5.4. O promotor *MpFen* mostrou sua funcionalidade em *S. cerevisiae* 35
5.5. Isolamento e caracterização do promotor *MpSod* 37
5.6. A região promotora *MpSod* é capaz de promover a transcrição do GUS 37
5.7. Seqüência de *MpSod* possui *cis*-elementos regulatórios envolvidos na resposta ao estresse oxidativo 38
5.8. Padrão de expressão do GUS é maior em plantas de *MpSod:GUS* submetidas ao ensaio de estresse oxidativo 40
6. DISCUSSÃO 42
7. CONCLUSÕES 48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 49

EXTRATO

SENA, Jamilly Azevedo Leal, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, abril de 2008. **Estudos funcionais de promotores de *Moniliophthora perniciosa* em plantas e fungos.** Orientador: Júlio Cezar de Mattos Cascardo. Co-orientador: Márcio Gilberto Cardoso Costa. Conselheira: Cristina Pungartnik.

Com o advento do projeto genoma do fungo *Moniliophthora perniciosa*, agente causador da doença vassoura-de-bruxa no cacaueiro (*T. cacao* L.), ferramentas de bioinformática do Laboratório de Bioinformática da UESC foram desenvolvidas, entre eles, um programa computacional baseado em redes neurais capaz de identificar seqüências conservadas em promotores. Promotores isolados da biblioteca genômica do fungo *M. perniciosa,* dirigindo a expressão dos genes *MpFen* e *MpSod* foram amplificados do DNA genômico via PCR. O gene *MpSod* codifica para a enzima superóxido dismutase (SOD), envolvida nas defesas contra danos causados ao DNA pelas espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo levar à morte celular, sendo, portanto, vital para a sobrevivência das células. O gene *Mpfen* (**f**lap **e**ndo**n**uclease) codifica para uma DNA polimerase capaz de reparar danos causados ao DNA. O entendimento da função desses genes é importante em função do ambiente altamente oxidante que o fungo *M. perniciosa* encontra durante o processo de infecção na planta. Os promotores foram inseridos no vetor de expressão da série pCambia, dirigindo a expressão do gene repórter *Gus* e utilizados na transformação genética *Nicotiana tabacum* (fumo). A análise do promotor do gene *MpFen* demonstrou sua funcionalidade em organismos eucariotos mais complexos como plantas de tabaco*,* por meio do ensaio histoquímico da atividade de GUS, em regiões meristemáticas, em tricomas, caules e em folhas senescentes, ficando evidente a atividade do promotor em partes da planta

com elevada taxa de replicação. A análise da função do promotor *MpSod* revelou a funcionalidade deste em plantas de tabaco, após realização do ensaio histoquímico. Elementos de resposta a estresses oxidativos, bem como de reparo de DNA foram identificados nas seqüências dos promotores e com isso, ensaios biológicos realizados nas plantas na presença de agentes indutores de lesões no DNA e de estresses oxidativos (UV e H_2O_2) mostraram elevada expressão do gene repórter, quando comparadas com os controles. Com o intuito de analisar a função dos promotores em *Saccharomyces cerevisiae* (levedura), o promotor do gene *MpFen* foi inserido no vetor que dirige a ativação do gene de síntese de histidina e então células de leveduras foram transformadas. Este resultado permitiu abrir novas perspectivas de estudos funcionais de promotores do *M. perniciosa* em outros fungos. É válido ressaltar que ainda não foram executados trabalhos como este com o *M. perniciosa* e os resultados aqui obtidos indicam que os promotores podem ser usados como ferramentas para produzir plantas transgênicas tolerantes a estresses que acarretem em danos oxidativos e/ou acúmulo de H_2O_2, bem como podem ser úteis para a expressão controlada de genes de interesse em *Moniliophthora perniciosa*.

Palavras-chave: promotores, *Moniliophthora perniciosa*, *GUS*, estresse oxidativo, reparo de DNA

ABSTRACT

SENA, Jamilly Azevedo Leal, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, May, 2008. **Functional studies of *Moniliophthora perniciosa* promoters in plants and fungi**. Advisor: Júlio Cezar de Mattos Cascardo. Comitte members: Márcio Gilberto Cardoso Costa and Cristina Pungartnik.

With the launching of *Moniliophthora perniciosa* genome project, the causal agent of the Witche's broom disease in cacao (*Theobroma cacao* L.), new bioinformatic tolls were developed by the Bioinformatic Laboratory at UESC. Among then, a script based on neural networks (NN) was able to identify conserved promoter sequences. The promoters were isolated from the genomic library of *M. perniciosa*, using specific primers designed to amplify the *MpFen* e *MpSod* genes. The *MpSod* gene encodes for a superoxide dismutase enzyme (SOD) involved on the dismustation of the hydrogen peroxide, being involved on the defense against damages caused on the DNA by the reactive oxygen species (ROS), leading to cell death, therefore its activity essential to cell survivor under oxidative stress. The *MpFen* gene (**f**lap **e**ndo**n**uclease), encodes for a DNA polymerase capable of repair damages on the DNA. Understanding how the expression of these genes occur is important due to the highly oxidant environment that the fungus experiences during the colonization of the infected tissues. The promoters were cloned into the vector pCAMBIA driving the expression of the reporter gene *Gus* and used to transform *Nicotiana tabacum* (tobacco). The promoter analyses revealed their functionality in more complex eukaryotes as plants, by the detection of GUS activity on meristems, tricomes, stems and senescing leaves, with a higher activity related to tissues under replication or DNA repair situations, such as senescent tissues. The analysis of the *MpSod* promoter revealed that it is functional in tobacco. Elements involved

on the response to oxidative stress and DNA repair were identified in the promoter sequence, hence, biological assays submitting the plants to the presence of DNA lesion inducers such as UV and H_2O_2 led to a strong induction of the reporter gene, when compared with the controls. Aiming to evaluate the activity on another fungus, we used *Saccharomyces cerevisiae*. The *MpFen* promoter was inserted in a vector that drives the activation of the histidine biosynthesis gene and used to transform cells. This result opened new perspectives of functional studies of *M. perniciosa* in other fungi. So far, this is the only report with *M. perniciosa* promoters functional analyses and the results obtained suggest that these promoters can be used as biotechnological tools aiming to produce transgenic plants tolerant to several stresses that lead to oxidative damages and, or the accumulation of H_2O_2. They can also be used to control the expression of *Moniliophthora perniciosa* key genes.

Key words: promoters, *Moniliophthora perniciosa, GUS,* oxidative stress, DNA repair.

LISTA DE FIGURAS

1. Esquema ilustrando a estrutura típica de um promotor eucarioto ativo 07
2. Reação DAB *in vivo* de *T. cacao* (cacau) após 45 dias de inoculação com fungo *M. perniciosa* 12
3. Rotas de reparo de DNA 14
4. Construção da rede neural de promotores de *Moniliophthora perniciosa*. 17
5. A melhor configuração de rede neural para identificação do TATA-box em sequências de DNA 18
6. Esquema ilustrativo do pCAMBIA1381 após inserção dos promotores de *M. perniciosa, MpFen* e *MpSod* (pUESC4 e pUESC80, respectivamente) 20
7. Estratégia de clonagem do promotor *MpFen* em vetor de *Saccharoromyces cerevisiae*..... 20
8. Obtenção de plantas transformadas 28
9. Diagnóstico molecular das plantas transformadas 28
10. Localização da expressão do gene repórter *Gus*, comprovando a funcionalidade do promotor *MpFen* em plantas de *Nicotiana tabacum* L..... 29
11. Ensaio histoquímico das plantas transgênicas 30
12. Expressão do gene repórter *Gus* sob controle do promotor *MpFen* em folhas de *N. tabacum* 30
13. Alinhamento do DRE do promotor do *M. perniciosa* com o de *Saccharomyces cerevisiae* 31
14. Ensaio de indução de mutagênese em plântulas de *MpFen:GUS* 32

15. Identificação do elemento YRE (*Yap1p response element*) na seqüência do promotor *MpFen* 33
16. Alinhamento da seqüência *MpFen* junto à do promotor *MDR1* do fungo *C. albicans* 33
17. Ensaio histoquímico em plântulas *MpFen:GUS* 34
18. Esquema ilustrativo dos *cis*-elementos presentes na sequência promotora *MpFen* 35
19. Colônias de *S. cerevisiae* após transformação com pGREG506:*MpFen* 36
20. Diagnóstico de transformação de *S. cerevisiae* 36
21. Ensaio histoquímico realizado em broto de *MpSod:GUS* 38
22. Esquema ilustrativo dos *cis*-elementos presentes na sequência promotora *MpFen* 39
23. Localização dos elementos presentes na seqüência promotora *MpSod* 40
24. Alinhamento de *MpSOD* com *SODCc1* de arroz (região CORE) 40
25. Ensaio de estresse oxidativo em plantas transgênicas de *MpSod:GUS* 41

LISTA DE TABELAS

1. Seqüências TATA-box de genes encontradas no banco de dados de promotores eucarióticos ..... Anexo 1
2. Oligonucleotídeos empregados na amplificação dos promotores 19
3. *Mix* de transformação de *S. cerevisiae* pelo método acetato de lítio 24

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o dogma central da biologia molecular, o gene é o segmento DNA que codifica uma seqüência de um produto gênico final, como um RNA ou uma proteína, bem como o segmento que controla a expressão de tal produto, dirigindo e determinando cada fase de desenvolvimento das características da espécie.

Os últimos anos foram marcados pela revolução na biologia molecular devido ao alto grau de automação na análise de genomas e seus produtos. A identificação de genes e as condições para a expressão dos transcritos são necessárias para a compreensão detalhada da constituição genética de um organismo. Assim, o conhecimento das seqüências completas do gene e das regiões que o controlam torna-se indispensável para entender corretamente as funções dos diferentes genes e como eles são regulados nas diferentes células e processos.

Muitas são as informações oferecidas pelos bancos de dados de seqüências de numerosos seres vivos, como de plantas e do homem, desde que foi iniciado o Projeto Genoma Humano (LANDER et al., 2001). Tais informações permitem determinar e/ou analisar a estrutura e a função dos genes, desde que tenham sido identificadas seqüências de DNA responsáveis pela codificação de proteínas (VIDAL, 2006), visto que estas executam as mais variadas funções nos organismos, como o transporte de nutrientes e metabólitos e catálise de reações biológicas (GRIFFITH et al., 2004).

Com o advento do Projeto Genoma do fungo *Moniliophthora perniciosa* (*Crinipellis perniciosa*) (www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura), agente causador da doença conhecida como vassoura-de-bruxa no cacaueiro (*Theobroma cacao*

L.), muitas ferramentas de bioinformática foram desenvolvidas com o intuito de buscar soluções moleculares para o controle do fitopatógeno. Com isso, foi criado um programa computacional no Laboratório de Bioinformática da Universidade Estadual de Santa Cruz, (LABBI-UESC), baseado em redes neurais capaz de identificar seqüências conservadas em promotores de genes de *M. perniciosa* (VIDAL et al., 2004).

Geralmente, a estrutura básica de um gene eucariótico é dividida em duas regiões: a região codificadora, seqüência que será transcrita em um RNA mensageiro (mRNA), localizada na região "downstream" do sítio de início da transcrição; e a seqüência que regula a expressão desse gene, chamada de região não-codificadora, localizada na região "upstream" do sítio de iniciação, que contém os elementos regulatórios, denominada região promotora.

Os promotores contêm seqüências específicas de DNA, os *cis*-elementos, que são reconhecidos pela RNA polimerase II e pelos fatores de transcrição específicos na formação do complexo de iniciação. Os elementos mais comuns num promotor são o TATA-box (por apresentar a seqüência consenso TATAAA) e o elemento Iniciador (INR).

Organismos eucarióticos possuem genes bastante complexos, cujas regulações ocorrem em diversos níveis (ABDELHAY, 2003). Existem genes que possuem regiões reguladoras (promotores) pequenas (aproximadamente 500 pares de bases), assim como existem genes envolvidos em processos como desenvolvimento, possuindo regiões regulatórias maiores que sua região codificante. Este fato pode estar relacionado com a complexidade dos genes, visto que estes apresentam, em sua região promotora, elementos distintos capazes de ativar ou inibir sua expressão em diferentes células ao longo do desenvolvimento do organismo. Vale ressaltar a duplicidade desses elementos, ou seja, elementos regulatórios apresentados em duplicata no promotor, visto que o gene é essencial à vida do organismo.

Poucos são os genes que possuem sua região promotora mapeada. Isso porque as análises exigem estudos "*in vitro*" e "*in vivo*" (por exemplo, transformações genéticas e bioensaios, respectivamente) para que haja entendimento do(s) elemento(s) responsável (is) pela regulação de certa(s) atividade(s) (ABDELHAY, 2003).

Essa dissertação teve como objetivo analisar a função de duas regiões promotoras de genes, isoladas da biblioteca genômica do fungo *M. perniciosa*, validando assim o programa computacional baseado em redes neurais desenvolvido no LABBI-UESC (VIDAL et al., 2004). Um deles, o promotor do gene *MpFen*, foi analisado por meio de transformações genéticas de *Nicotiana tabacum* e de *Saccharomyces cerevisiae*. O outro, promotor do gene *MpSod,* em plantas de *N. tabacum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O fungo *Moniliophthora perniciosa*

O fungo *Moniliophthora perniciosa* (=*Crinipellis perniciosa*) Stahel, agente etiológico da doença vassoura-de-bruxa do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.), é um basidiomiceto, da ordem Agaricales, pertencente à família *Tricholomataceae* (EVANS, 1978). Foi nomeado por Singer em 1942 como *Crinipellis perniciosa* (GRIFFITH et al., 1994) e recentemente foi renomeado como *Moniliophthora perniciosa* (AIME; PHILIPS-MORA, 2005).

Moniliophthora perniciosa é um fitopatógeno hemibiotrófico, ou seja, apresenta uma fase parasítica, com formação de micélios monocarióticos; e uma fase saprofítica (micélios dicarióticos) em seu ciclo biológico. No campo, a doença vassoura-de-bruxa se inicia quando os tubos germinativos que infectam tecidos meristemáticos (ramos, botões florais, frutos) em desenvolvimento do cacaueiro, ou diretamente através da epiderme, levando a uma série de sintomas na planta, como o desenvolvimento desordenado de ramos, conhecido como vassoura-verde (ou vegetativa); bem como hiperplasia, hipertrofia, superbrotamento, associados com a perda da dominância apical (FRIAS et al., 1995; GRIFFITH, 2004). Após algumas semanas, o fungo apresenta-se na forma saprofítica (dicariótica), forma grampos de conexão (CALLE et al., 1982), iniciando o processo de necrose nas células infectadas chamado apoptose, ou seja, morte celular programada. Uma vez estabelecida a doença, e após múltiplos ciclos de umidade e seca, o fungo produz pequenos basidiocarpos (por meio da frutificação do micélio secundário) na superfície do tecido vegetal e numeroso basidiósporos, completando, assim, o ciclo de vida do fungo (MEINHARDT et al., 2006). A partir dos basidiocarpos formados,

novos basidiósporos serão disseminados ativamente pelo vento, infectando outras plantas (BASTOS, 1990).

Com a disseminação do fungo e sua colonização nos tecidos da planta em crescimento, há uma redução da produtividade, bem como do tempo de vida do hospedeiro (RUBINI et al., 2005). Em função dos danos sócio-econômicos causados pela doença nas plantações de cacau, principalmente no Sul da Bahia (desde 1989), que possui condições climáticas favoráveis à proliferação do fungo, houve intensificação das pesquisas e muitas ferramentas de controle da doença foram desenvolvidas. Podas sanitárias e controle biológico, análises genéticas, são exemplos de alternativas usadas no controle da doença, as quais visam obter plantas resistentes ao fitopatógeno. Pensando nisso, técnicas de identificação de genes de resistência do hospedeiro têm sido desenvolvidas num intuito de transferir tais genes para as plantas que possuam aspectos agronômicos interessantes, caracterizando, assim, mecanismos envolvidos nas reações de resistência e de susceptibilidade de plantas à doença (DANGL e JONES, 2001).

Diante das informações supracitadas, o projeto genoma do fungo *M. perniciosa*, desenvolvido no intuito de entender a interação cacau:*Moniliophthora*, tornou-se uma ferramenta de grande valia, pois o isolamento de seqüências que regulam a expressão dos genes durante essa interação pode colaborar também na identificação de proteínas elicitoras envolvidas nesse processo, o que auxilia o entendimento dos mecanismos de ação e reconhece moléculas responsáveis em desencadear modificações no padrão de expressão gênica do organismo.

2.2. Análises de promotores

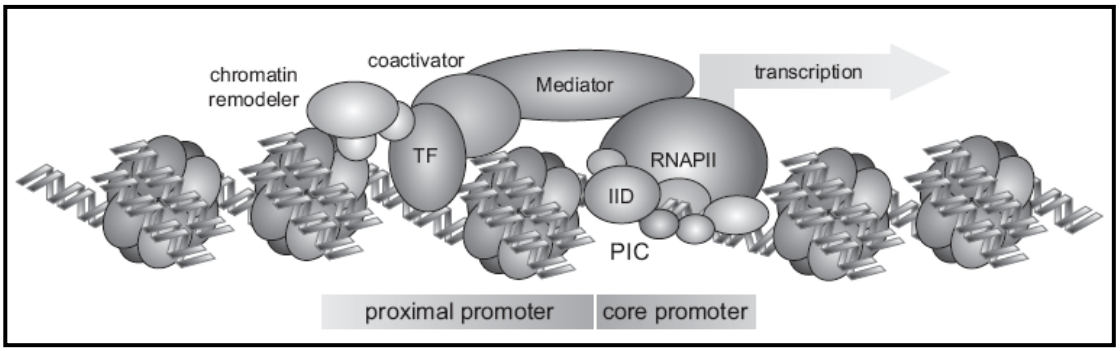
Cada célula contém uma cópia do genoma inteiro, embora muitos tecidos sejam construídos de células diferentes, que são responsáveis por várias funções. A regulação dos genes é feita em diferentes estágios da expressão gênica. O processo de expressão gênica é regulado por múltiplos pontos incluindo modificações da cromatina, controle da transcrição,reposição alternativa do DNA (*splicing*), transporte e controle da tradução (MOSSERI et al., 2005).

A regulação da transcrição de um gene é efetuada principalmente em regiões do DNA chamadas promotores, seqüências de DNA que sinalizam exatamente onde o a síntese do RNA deve ser iniciada, ou ainda, a região *cis*-regulatória do DNA num local específico (o sítio de iniciação da transcrição ou TSS), que dirige a transcrição do gene alvo em resposta aos sinais biológicos e ambientais (ZHANG, 2007). A iniciação da síntese de RNA em pontos aleatórios numa molécula de DNA seria um processo extraordinariamente perdulário (LEHNINGER et al., 1995).

Computacionalmente, o promotor é frequentemente dividido em três regiões: a '*core-promoter*', a '*proximal-promoter*' e a '*distal-promoter*' (Figura 1). A primeira é requerida para unir o complexo de pré-iniciação (PIC) e pode dirigir um gene repórter a um nível basal do TSS. A segunda, geralmente contém os principais elementos *cis*-regulatórios para ativar a expressão do gene repórter. E a terceira, ocorre em íntrons e regiões downstream (ZHANG, 2007).

Um dos métodos de estudos de promotores está na análise dos níveis de expressão do RNA, ou seja, genes que têm níveis de expressão similares têm controle da regulação transcricional similar, e assim, compartilha um sítio de ligação, devido ao fato de que a regulação transcricional causa níveis de expressões similares (MOSSERI et al., 2005).

Nas análises de regulação transcricional, o uso de um gene repórter, que codifica uma proteína com atividade enzimática de fácil detecção é muito comum (OKKEMA e KRAUSE, 2005). Estes genes são importantes, principalmente para quantificar a eficiência da transformação e expressão de genes em plantas transgênicas (SAWAHEL, 1992). A técnica consiste em ligar a seqüência de DNA a ser testada num vetor de transformação ideal, em posição "upstream" da região codificadora do gene repórter, gerando um gene no qual um possível elemento regulador irá controlar a expressão do gene repórter. O vetor ideal deve conter além do gene repórter, um gene marcador de seleção, para conferir células eucarióticas resistentes, por exemplo, a um antibiótico. Tais procedimentos são fundamentais no entendimento da atividade transcricional.



Fonte: Heintzman e Ren, 2007

Figura 1: Esquema ilustrando a estrutura típica de um promotor eucarioto ativo e a ligação com a RNA polimerase, que consiste na região 'core promoter', próxima ao sítio de iniciação (TSS) e adjacente à região 'proximal'. A RNA polimerase II (RNAPII) juntamente com os fatores de transcrição (TF) formam o complexo de iniciação (PIC). Outros fatores regulatórios, incluindo mediadores, coativadores, remodeladores da cromatina são envolvidos na regulação da transcrição.

De acordo com Delú Filho et al. (1999), o conhecimento das interações moleculares controlando expressão gênica constitui um pré-requisito para determinar os eventos moleculares envolvidos na diferenciação e desenvolvimento celular, bem como para definir estratégias de alteração genética de proteínas celulares específicas. Estudos já descritos mostram a complexidade das regiões promotoras dos genes, nas quais uma diversidade de elementos, positivos e negativos, afeta a expressão gênica.

O promotor transcricional é o nexo de todos os níveis de regulação, servindo como principal determinante na transcrição de um gene pela integração das múltiplas influências da seqüência de DNA, dos fatores de transcrição, das características epigenéticas e dos eventos de sinais de transdução (HEITZMAN e REN et al., 2007). É quem controla e direciona a expressão de um gene, determinando onde, quando e em que nível o gene será expresso. Entender os mecanismos pelos quais os promotores integram os elementos regulatórios é fundamental para a compreensão da regulação transcricional. A identificação e análise de promotores ao longo do genoma são importantes para o nosso entendimento das suas contribuições na regulação transcricional.

Ainda de acordo com Heintzman e Ren (2007), como os promotores são fisicamente e funcionalmente ligados aos seus transcritos gerados, o sequenciamento completo de diversos organismos tem facilitado o uso de

informações de transcritos completos para identificar os promotores envolvidos na sua regulação. A transcrição reflete o estado fisiológico da célula e, portanto, é extremamente variável às suas necessidades. Ela representa a diversidade e a complexidade da expressão dos genes contidos em um determinado genoma (ZAHA, 2003).

Nesse sentido, com a obtenção das informações depositadas no banco de dados da biblioteca genômica do *Moniliophthora perniciosa*, foi possível identificar e isolar seqüências conservadas em promotores do fungo, a fim de entender os mecanismos de regulação da transcrição gênica envolvidos na interação cacau-*Moniliophthora*.

2.3. Transformação genética de plantas via *Agrobacterium tumefaciens*

A combinação de técnicas de biologia molecular, cultura de tecidos e transferência de genes representa uma ferramenta poderosa para introduzir novas características em uma determinada planta. Há muitos anos, plantas cultivadas vêm sendo geneticamente manipuladas pelo homem, por meio do melhoramento clássico, no entanto, os métodos convencionais de melhoramento esbarram em uma série de problemas, como a redução do *pool* gênico, a ligação gênica e a incompatibilidade sexual. Atualmente, o melhoramento de plantas pode recorrer às técnicas de engenharia genética (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1998).

Segundo Brasileiro e Carneiro (1999), métodos de obtenção de plantas transgênicas vêm sendo desenvolvidos e alguns já estão bem estabelecidos e, de acordo com Busov et al. (2005), a transformação genética tem se tornado uma ferramenta indispensável na biologia molecular de plantas e em pesquisas relacionadas à genômica funcional. A *Agrobacterium tumefaciens* é um eficiente vetor na engenharia genética de plantas e por isso, a explosão do interesse por *A. tumefaciens* dirigiu várias observações que têm ramificações puramente científicas e biotecnológicas (SLATER et al., 2003), visto que muitas espécies com importância econômica têm sido rotineiramente transformadas por meio dessa bactéria (GELVIN, 2003a; GELVIN, 2003b). Para Tzfira e

Citovsky (2002), a obtenção de plantas transgênicas por meio de *Agrobacterium* pode melhor contribuir para o entendimento de processos biológicos básicos tais como comunicação celular, transporte intracelular, bem como recombinação e reparo de DNA. Essas bactérias do solo, do tipo bacilo aeróbico e Gram-negativas, transferem naturalmente parte de seu genoma às células vegetais, no momento da infecção, que passam a sintetizar substâncias que estimulam a divisão celular no sítio de infecção.

A transformação genética mediada por *A. tumefaciens* é um processo de várias etapas que começa com o reconhecimento da célula hospedeira pela bactéria e termina com a expressão do T-DNA da *Agrobacterium* integrado nas células transformadas do genoma hospedeiro (CITOVSKY et al., 2007). As bactérias são atraídas em direção ao tecido vegetal por quimiotactismo em relação às moléculas-sinal (compostos fenólicos, açúcares e aminoácidos), que são exsudadas por células lesadas em decorrência de ferimentos superficiais causados por insetos, geadas ou tratos culturais (BRASILEIRO e LACORTE, 2003). Devido à presença de um plasmídio de alto peso molecular, o *Ti*, ocorre a infecção das células vegetais. Este plasmídio possui genes (região *vir*) que são ativados pelas moléculas-sinal da planta, que vão promover a transferência do T-DNA, outra região do plasmídio Ti. O T-DNA é delimitado por duas extremidades (direita e esquerda) compostas por oncogenes envolvidos na biossíntese de citocininas e auxinas e de genes responsáveis pela síntese de opinas.

Para obter uma planta transgênica usando como vetor a *Agrobacterium,* é necessário que essa apresente condições favoráveis de regeneração por meio da técnica de cultura de tecidos *in vitro*. Todavia, a remoção dos oncogenes presentes no T-DNA é fundamental na diferenciação e regeneração das plantas transformadas, uma vez que se pode eliminar parte do T-DNA sem que isso afete o processo de transferência. Assim, a *Agrobacterium* precisa ser modificada para que haja uma controlada transformação genética de plantas (ESCOBAR e DANDEKAR, 2003)

A regeneração das células que contêm o DNA exógeno dará origem a plantas transgênicas, transmitindo o gene integrado à progênie de forma mendeliana. Em adição, as técnicas de introdução e expressão de DNA exógeno permitem o estudo da função e regulação de genes, contribuindo para

o entendimento dos processos de crescimento e desenvolvimento da planta (BRASILEIRO e DUSI, 1999).

Um dos interesses da transformação genética está no estudo da função e regulação da expressão gênica. Os fatores que influenciam ou medeiam tal expressão podem ser também estudados com o uso de fusões gênicas, onde seqüências que codificam para um gene (repórter) estão sob a direção de seqüências controladoras de um outro gene. Estas construções são introduzidas nas células, e sua expressão acompanhada e por meio disso, pode-se analisar a função de promotores, dos sinais de poliadenilação e dos íntrons bem como a estrutura secundária do RNA mensageiro (mRNA) (BRASILEIRO e DUSI, 1999).

2.4. A biologia de *Saccharomyces cerevisiae* e sua utilização na pesquisa

Saccharomyces cerevisiae é um simples organismo eucarioto, ascomiceto, unicelular de grande importância econômica, sendo convenientemente usada nos estudos de processos biológicos dos organismos eucarióticos, principalmente devido à alta conservação das principais rotas bioquímicas (ALVES-RODRIGUES et al., 2006). Foi o primeiro organismo eucarioto a ter seu genoma seqüenciado com sucesso, com aproximadamente 6000 genes localizados em 16 cromossomos (GOFFEAU et al., 1996; ALVES-RODRIGUES et al., 2006; BORNEMAN et al., 2007) e, desde então, tornou-se o grupo de modelo básico da célula biológica para estudos complexos, (HOFMANN et al., 2003).

Com seu genoma compacto e simples, *S. cerevisiae* tem sido usada para o desenvolvimento de muitos experimentos em larga escala. Numerosas metodologias têm sido utilizadas para identificar funções de genes e as leveduras têm contribuído significativamente para o conhecimento básico da biologia dos eucariotos (BHARUCHA e KUMAR, 2007), sendo objeto de intensas pesquisas em genética, biologia celular e molecular, genômica e proteômica. O conhecimento acumulado de sua biologia e fisiologia pode ajudar na elucidação de variações fenotípicas em populações naturais (LANDRY et al., 2006). Particularmente, os processos celulares em leveduras

são tipicamente conservados, assim como nos organismos eucariotos superiores.

Um complemento essencial aos estudos experimentais de leveduras tem sido o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática sofisticadas para análises de dados. O sequenciamento de outras espécies de *Saccharomyces* tem ajudado na introdução de estudos comparativos e o desenvolvimento computacional significante ocorreu quando a riqueza da genômica e das informações metabólicas presentes em *S. cerevisiae* foi usado para produzir um modelo computacional de rotas metabólicas em leveduras (BORNEMAN et al., 2007). Dada a riqueza de dados experimentais e computacionais disponíveis para *S. cerevisiae*, não é de surpreender que esta espécie esteja à frente nas pesquisas de sistemas biológicos.

Entretanto, para Landry et al. (2006), *S. cerevisiae* possui um histórico de vida complexo, pois ela é comumente classificada como um organismo unicelular diplóide que pode se reproduzir vegetativamente por brotamento. Além disso, sua composição química depende de muitos fatores, destacando-se a espécie, o substrato utilizado, o grau de aeração, composição dos meios de cultura, bem como concentração de sais. Possui a composição de aminoácidos bastante balanceada, com exceção de metionina e treonina e isso ajuda na avaliação do valor nutricional das proteínas em vegetais.

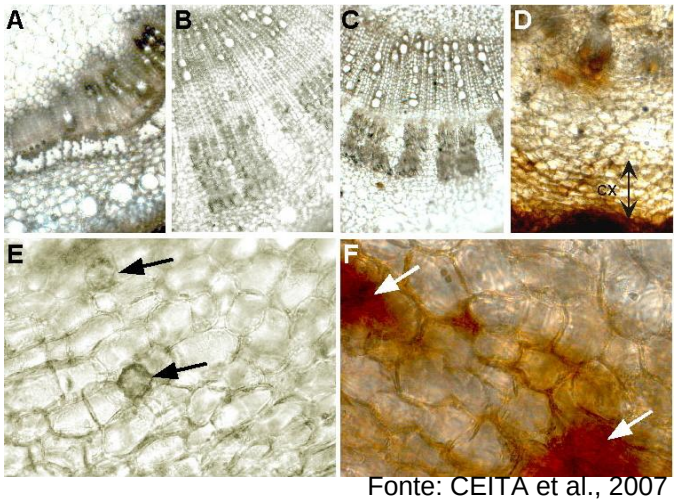
2.5. Estresse oxidativo e reparo de danos no DNA

O genoma de qualquer organismo está sob constante ameaça de agentes endógenos e exógenos que danificam o DNA, como por exemplo, as espécies reativas de oxigênio (*Reative Oxygen Species*, ROS) que induzem a oxidação das bases e a quebra do DNA (endógenos), a radiação ultravioleta (UV) e os agentes químicos (exógenos) (BRANZEI e FOIANI, 2008).

As espécies reativas de oxigênio, como os radicais superóxido ($O_2^{-\bullet}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila ($OH^{\bullet}$) provocam estresse oxidativo devido à sua ação tóxica e mutagênica sobre as células. Elas são produzidas pelo organismo durante o curso do metabolismo e são processadas pelo sistema antioxidante, o qual compreende enzimas e compostos de baixo peso molecular. Embora a presença do oxigênio molecular terminal na

respiração seja vantajosa, a presença de oxigênio no ambiente celular constitui-se de maneira ameaçadora às suas próprias estruturas, pois a formação das ROS torna-se prejudicial às células e tecidos, se sua produção não for estritamente controlada. A produção acelerada de ROS é considerada um fator chave de estresse fisiológico (NOCTOR et al., 2000).

Em plantas, a produção das ROS é estimulada por vários fatores ambientais, como exposição elevada de luminosidade, seca, metais pesados, extremos de temperatura, altas concentrações de sais, radiação UV, poluição do ar, herbicidas e também como resposta aos estresses bióticos, tais como o ataque de fitopatógenos (GUELFI, 2001). Ou ainda, por exemplo, a produção de H_2O_2, que pode ter papel importante em resposta a uma variedade de estresses bióticos e abióticos causados na planta (KIM et al., 2008). A produção de ROS em plantas pode prevenir o desenvolvimento e colonização do fitopatógeno. Entretanto, em algumas interações planta:fungo hemibiotrófico, a produção de ROS é um fator importante para a colonização do fungo (CEITA et al., 2007). Em plantas de *T. cacao* infectadas pelo fitopatógeno *M. perniciosa* (doentes), há um acúmulo de peróxido de hidrogênio nas células (CEITA et al., 2007) (Figura 2F).



Fonte: CEITA et al., 2007

Figura 2: Reação DAB *in vivo* de *T. cacao* (cacau) após 45 dias de inoculação com fungo *M. perniciosa*. Plantas de cacau susceptíveis infectadas doentes foram infiltradas com DAB, detectando assim acúmulo de peróxido de hidrogênio nas células vegetais (F, setas brancas).

Na tentativa de combater as ROS formadas, as células dos organismos dispõem de defesas antioxidantes enzimáticas, como catalases, peroxidases e superóxido dismutases (SOD). Estas, encontradas em todos os organismos aeróbicos, caracterizam um grupo de metaloenzimas que catalisam a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir de radicais superóxidos ($O_2^{-\bullet}$) (ver reação abaixo), consumindo-os e, portanto, livrando as células de riscos de oxidação por esses radicais. A SOD é a primeira enzima de defesa usada contra danos provocados pelas ROS nas células (OSMOS et al., 2003). Esta enzima está envolvida nas defesas contra danos causados ao DNA pelas ROS, podendo levar à morte celular (AZEVEDO, 2007), sendo, portanto, vital para a sobrevivência das células (KEN et al., 2005).

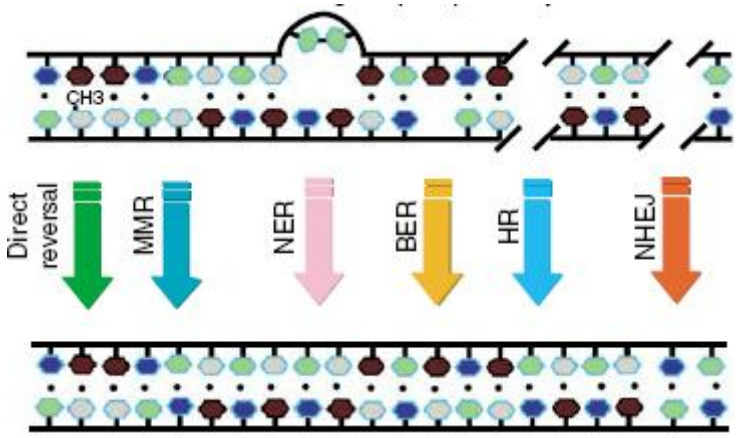
$$2\,O_2^{\bullet -} + 2\,H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} O_2 + H_2O_2 \qquad (1)$$

Bowler et al. (1991) demonstraram que plantas transgênicas com níveis elevados de SOD tiveram significante aumento na proteção destas a estresses oxidativos. E, evidências claramente indicam que, a expressão aumentada de SOD em plantas pode proporcionar elevada tolerância a estresses oxidativos sob determinadas condições (ALLEN et al., 1997), tornando-se um fator limitante na prevenção de danos oxidativos nas plantas (VAN CAMP et al., 1997).

Infecções causadas por fungos em plantas hospedeiras podem levar à “reações hipersensitivas”. Tais reações incluem um colapso no tecido localizado e morte celular no sítio de infecção. Esse é um processo ativado por elicitores, que levam a uma “explosão oxidativa”, a qual ocorre rapidamente, logo após o ataque pelo fitopatógeno. Esta explosão oxidativa é uma das primeiras respostas das plantas ao ataque por fitopatógenos biotróficos ou necrotróficos, levando a lesões no DNA do hospedeiro (MAYER et al., 2001).

Em nível celular, o DNA danificado que não é propriamente reparado, pode levar à instabilidade genômica, apoptose ou senescência, os quais podem afetar o desenvolvimento do hospedeiro (HAKEM, 2008).

Entretanto, o sistema de reparo depende do tipo de lesão e da fase do ciclo celular. Células na fase G1, por exemplo, precisam reparar danos acidentais, que geralmente são causados pelas ROS, UV e agentes químicos. Estes danos devem ser reparados antes ou no momento da replicação, quando as lesões primárias podem atrelar a replicação ou podem ser convertidas em outros tipos de danos, com conseqüências prejudiciais para a célula. Existem diferentes tipos de reparo de DNA. Primeiro, há processos não relacionados com a eliminação de lesões no DNA, que não envolvem excisão ou re-síntese de parte do DNA, neste caso, o reparo é conhecido como 'reversão direta' (*direct reversal*). Todos os outros processos de reparo envolvem degradação de pelo menos um nucleotídeo acompanhado de re-síntese do DNA (ZHARKOV, 2008). Dentre os processos de reparo se destacam o reparo de excisão de nucleotídeos (NER), reparo de excisão de bases (BER), recombinação homóloga (HR), *mismatch repair* (MMR) – que corrige erros causados pela DNA polimerase durante a replicação (Figura 3).



Fonte: HAKEM, 2008

Figura 3: Rotas de reparo de DNA

De acordo com Bibikova et al. (1998), a proteína FEN-1 foi inicialmente isolada e parcialmente caracterizada em 1969 por Lindahl et al., sendo nomeada de DNase IV. Posteriormente, foi renomeada para FEN-1, por Harrington e Lieber (1994), após verificarem sua atividade capaz de clivar substratos ramificados. O papel de FEN-1 durante o processo de reparo de

DNA envolve as rotas de reparo de excisão de bases (BER) bem como reparo de excisão de nucleotídeos (NER) (RUYMGAART et al., 2004). Além disso, a proteína FEN-1 possui atividades 5'-flap endo (FEN) e 5' → 3' exonuclease, importantes atividades na remoção de RNA primário durante a síntese da fita de DNA e no reparo de excisão de bases (LIU et al., 2006). Sendo assim, o acrônimo FEN denota as funções de flap endonuclease e five-prime exonuclease (BIBIKOVA et al., 1998).

Estudos genéticos feitos com leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*) mostraram que deleções realizadas em homólogos de FEN-1 resultaram numa notável sensibilidade de leveduras a raios ultravioletas, bem como apresentaram instabilidade genômica (MURRAY et al., 1994; JOHNSON, et al., 1995). Nesse sentido, essas observações indicaram que FEN-1 está envolvida em reparo de DNA (KIMURA et al., 2000).

Ainda de acordo com Kimura et al. (2000), plantas superiores têm um interessante mecanismo de coordenação entre replicação e reparo de DNA. O desenvolvimento normal dessas plantas é regulado pela iniciação de proliferação das células dos tecidos meristemáticos e a formação de órgãos nas plantas é realizada pela combinação de divisões celulares orientadas e formação de tecidos. Então, as plantas podem ter um eficiente sistema de relação entre replicação de DNA na divisão celular, bem como na reparo de DNA (KIMURA et al., 2000).

Neste trabalho, dois promotores de genes de *M. perniciosa* foram analisados. Um deles é o *MpFen*, referente a FEN-1, uma nuclease multifuncional com importante papel na manutenção da estabilidade genômica, que atua nas rotas BER e NER e codifica para uma enzima envolvida em reparo de DNA. O outro promotor, *MpSod*, refere-se ao gene *Sod* que codifica para a enzima superóxido dismutase, importante no processo de detoxificação das células causadas pelas espécies reativas de oxigênio.

Sendo assim, estudar a função de regiões promotoras citadas é fundamental no entendimento de como as enzimas SOD e FEN-1 agem na interação cacau:*Moniliophthora*, visto que ambas estão envolvidas no combate aos danos causados nas células, seja por estresses bióticos ou abióticos.

3. OBJETIVO

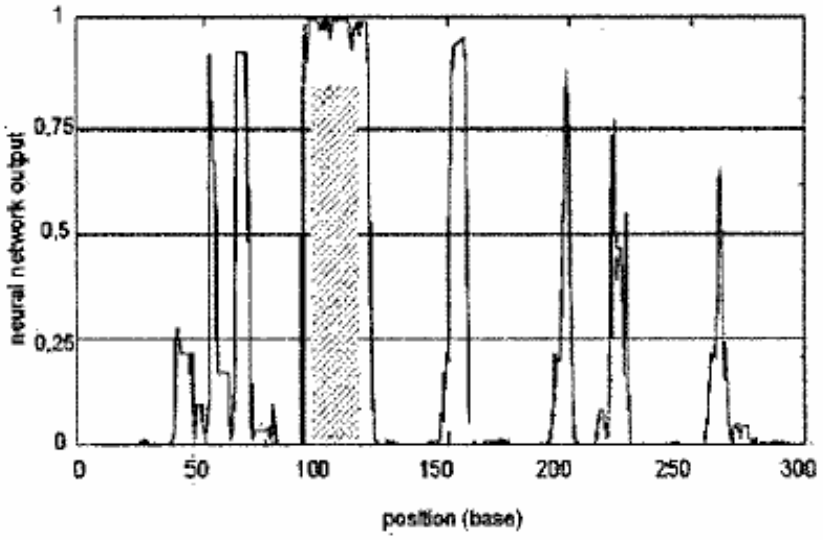
No banco de dados do projeto genoma do fungo *Moniliophthora perniciosa* foi possível identificar seqüências conservadas em promotores, dentre as quais o *MpFen* e *MpSod* foram isoladas. Este trabalho teve como objetivo validar biologicamente o programa computacional baseado em redes neurais (www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura) (VIDAL et al., 2004), criado no Laboratório de Bioinformática da UESC (LABBI) e assim, analisar estrutural e funcionalmente as seqüências promotoras em plantas e fungos. Para alcançar tal objetivo, foram estabelecidas as seguintes metas:

1- Analisar a estrutura e função dos promotores isolados da biblioteca genômica do fungo *M. perniciosa* em plantas de *Nicotiana tabacum* L. e em *Saccharomyces cerevisiae* por meio de transformações genéticas;
2- Identificar os *cis*-elementos presentes nas seqüências dos promotores *MpFen* e *MpSod*;
3- Analisar a atividade dos elementos regulatórios envolvidos nas seqüências por meio de bioensaios.

4. MATERIAL E MÉTODOS

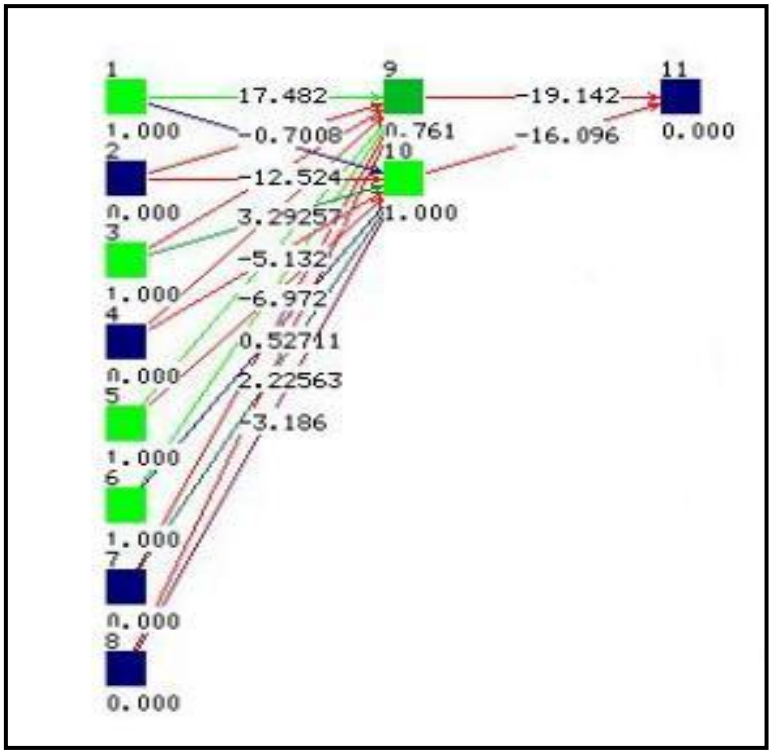
4.1. Construção da rede neural e identificação das regiões regulatórias

De acordo com Vidal et al. (2004), a rede neural foi construída utilizando o programa Stuttgart Neural Network Simulator no laboratório de Bioinformática (LABBI) da UESC, um software que identifica regiões regulatórias presentes no genoma do fungo *Moniliophthora perniciosa* (Figura 4; Tabela 1-anexo). Para a melhor configuração, a rede foi desenvolvida para identificar as seqüências de DNA, representando o padrão característico do TATA-box em eucariotos (Figura 5).



Fonte: Vidal et al., 2004

Figura 4: Construção da rede neural de promotores de *Moniliophthora perniciosa*. Os picos mais altos e mais largos representam uma possível região TATA-box.



Fonte: Vidal et al., 2004

Figura 5: A melhor configuração de rede neural para identificação do TATA-box em sequências de DNA. Treinada com promotores de eucariotos e validada em *Moniliophthora perniciosa.*

4.2. Clonagem dos promotores em vetores de transformação

As sequências dos promotores *MpFen* e *MpSod* foram isoladas da biblioteca genômica do fungo *M. perniciosa* via reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Oligonucleotídeos específicos (*primers*) utilizados como iniciadores, a partir das sequências dos promotores, foram confeccionados (Tabela 2) e as temperaturas de anelamento dos *primers* foram determinadas (constituído de uma etapa de desnaturação a 94°C, por 3 minutos, com 35 ciclos a 94°C, por 30 segundos, 53 ± 10°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 30 segundos e efetuou-se uma etapa de extensão a 72°C por 5 minutos). As seqüências amplificadas foram inseridas em vetor intermediário pGEM-T Easy Vector (Promega, EUA) para facilitar posteriores clonagens em vetores de expressão.

A ligação inserto:vetor foi feita de acordo com o protocolo do fabricante.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos empregados na amplificação dos promotores

Oligonucleotídeo	Seqüência
1. *MpFen* F	5'-GGCCATCCCGGGCAGAGTTC-3'
2. *MpFen* R	5'-GGTGAGGGAGAAGCTTAAGGG-3'
3. *MpSod* F	5'-GGCTGCCCGGGAAGTTGTTC-3'
4. *MpSod* R	5'-GGACCATGGTGGCGGTGGTG-3'

A clonagem dos promotores em vetores de expressão em plantas foi feita de acordo com as técnicas estabelecidas por Sambrook et al. (1989), em vetor binário da série pCAMBIA (pCAMBIA1381) (Figura 6), dirigindo a expressão do gene repórter *Gus*, que codifica a enzima β-glucoronidase, além da região terminadora *nos* (nopalina sintase). O vetor pCAMBIA1381 também contém o gene seletivo *hptII* (higromicina fosfotransferase II), que confere resistência ao antibiótico higromicina em plantas, sob regulação do promotor 35S do vírus-do-mosaico-da-couve-flor (CaMV35S). O pCAMBIA é um típico vetor para análise de promotores por não possuir promotor dirigindo o sítio de clonagem múltipla (MCS). O fragmento amplificado contendo o promotor *MpFen* foi inserido nos sítios correspondentes correspondentes a *SmaI* e *HindIII* no vetor pCAMBIA1381, resultando no clone pUESC4 (*MpFen*:*GUS*).

Esse promotor também foi clonado no vetor de expressão em *Saccharomyces cerevisiae*, pGREG506 (Figura 7), o qual dirige a ativação da síntese de histidina. Para tanto, o *MpFen* foi isolado do pGEM-T usando a enzima de restrição *EcoRI* e inserido no sítio correspondente do vetor, substituindo o promotor *gal* do vetor. O *gal* foi retirado do plasmídio por meio de digestão, usando enzimas *SacI* e *NotI* e o vetor foi em seguida recircularizado, resultando no clone pUESC75 (pGREG506:*MpFen*), utilizado na transformação de células de *S. cerevisiae*.

Por outro lado, fragmento contendo o promotor *MpSod* foi extraído do vetor intermediário pGEM-T com a enzima *EcoRI* e inserido no sítio correspondente no vetor de expressão pCAMBIA1381, dando origem ao clone pUESC80 (*MpSod*:*GUS*), sendo então utilizado na transformação genética de tabaco.

Para estas clonagens, células competentes de *Escherichia coli* (estirpe TOP10 (Invitrogen), bem como de *Agrobacterium tumefaciens* (estirpe LBA4404) foram preparadas e transformadas por choque térmico (vide Anexo).

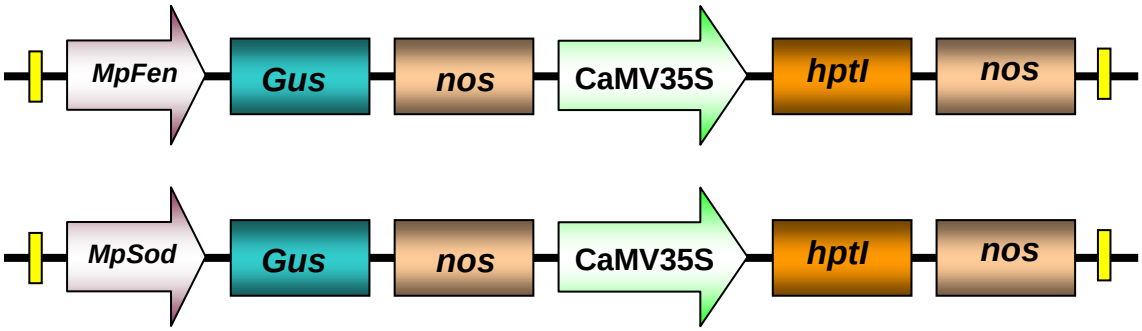


Figura 6: Esquema ilustrativo do pCAMBIA1381 após inserção dos promotores de *M. perniciosa, MpFen* e *MpSod* (pUESC4 e pUESC80, respectivamente).

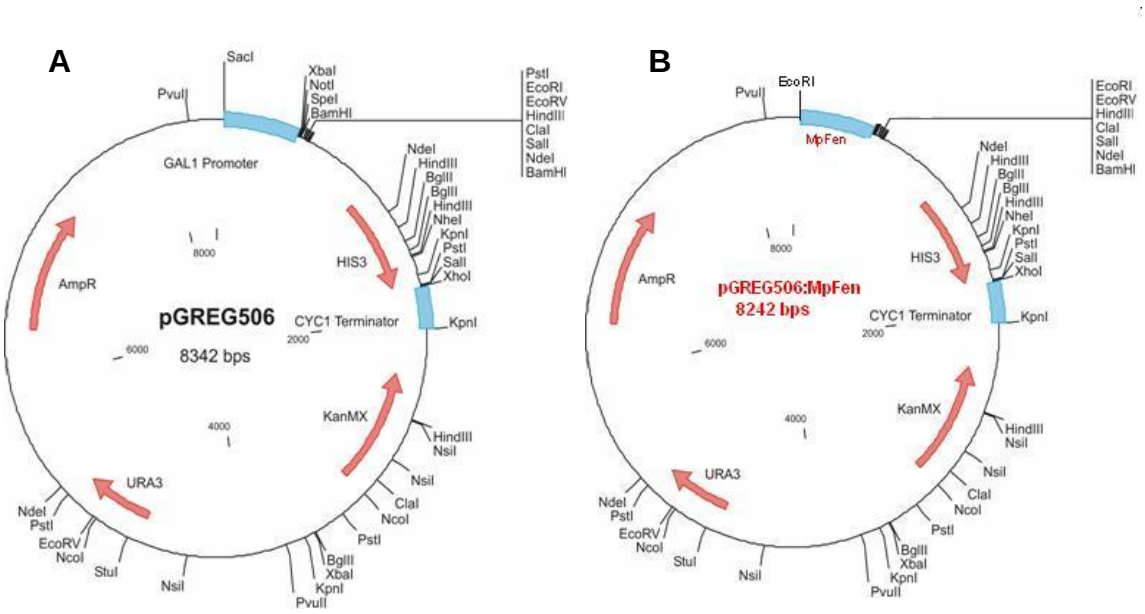


Figura 7: Estratégia de clonagem do promotor *MpFen* em vetor de *Saccharoromyces cerevisiae*. Em A: Mapa do pGREG506 original. Em B, mapa do pGREG506 após inserção do promotor *MpFen* em substituição ao *GAL promoter* do vetor original, sendo então renomeado para pGREG506:*MpFen*.

4.3. Obtenção de plantas de *Nicotiana tabacum* (tabaco)

Sementes de tabaco foram levadas ao Laboratório de Cultura de Tecidos a fim de obter plantas. Primeiramente, as sementes foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas, em etanol 70% durante 1 minuto e em seguida incubadas em solução de hipoclorito de sódio 1% durante 25 minutos, seguidos de três lavagens com água destilada estéril. As sementes foram cultivadas em meio MS sólido (pH 5,7) (MURASHIGE e SKOOG, 1962), sem adição de sacarose e incubadas em sala de crescimento do laboratório à temperatura de 25±2°C, sob irradiância de 16-19µmol $m^{-2}s^{-1}$ e sob regime luminoso de 16/8h (luz/escuro). Após duas semanas, as plântulas obtidas foram transferidas para meio MS sólido em magentas contendo 3% de sacarose e serviram como fonte de explantes para as transformações genéticas.

4.4. Transformação genética de *Nicotiana tabacum* (tabaco)

As clonagens resultantes com o vetor pCAMBIA1381 foram utilizadas na transformação genética de discos foliares de *N. tabacum* mediada por *A. tumefaciens*, de acordo com Brasileiro e Carneiro (1999), com modificações feitas por Fátima Alvim (Laboratório de Cultura de Tecidos, UESC)[1]. Para tanto, discos foliares de tabaco (explantes) foram previamente cortados (utilizando estilete e pinça) sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, e mantidos em meio MS sólido sem adição de antibiótico e regulador de crescimento.

Células de *A. tumefaciens* contendo o plasmídio de interesse foram crescidas em 50mL de meio Rhizo, acrescido de estreptomicina a 100mg.L^{-1} e canamicina a 50mg.L^{-1}, durante 16 horas, sob agitação de 220rpm, a 28°C, até atingir OD_{600}= 0,5. Atingida a densidade desejada, a cultura foi centrifugada a 5.000 x g, a 14°C, por 7 minutos e o *pellet* foi ressuspendido em 2mL de meio MS sem antibiótico.

---

[1] Comunicação pessoal

Os explantes foram então incubados, durante 15 minutos, em 50mL de meio MS contendo as células ressuspensas (OD_{600}= 0,5), posteriormente lavados com água destilada estéril, secos com papel de filtro estéril e mantidos durante 48 horas (período de co-cultivo) em meio MS sólido sem adição de antibiótico em sala de crescimento.

A seleção dos brotos transformados foi feita em meio MS suplementado com o regulador de crescimento 6- benzilaminopurina (BAP) a 500μg.mL^{-1}, e com os antibióticos cefotaxima (500μg.mL^{-1}) , para eliminação da agrobactéria, e higromicina (10μg.mL^{-1}), para a seleção dos brotos transformados.

Os brotos obtidos foram enraizados em meio MS sem adição de reguladores e submetidos ao diagnóstico de transformação, feito por meio de PCR de DNA genômico.

As plantas positivas à inserção dos promotores foram utilizadas para expressão do GUS em ensaio histoquímico. Clones GUS positivos (T_0) foram mantidos *in vitro* e aclimatados em condições controladas para obtenção de sementes.

4.4.1. Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico das plantas transformadas foi feita pelo método Acetato de potássio. Aproximadamente 50mg de material vegetal (folha) foram macerados em N_2 e incubados em 500µL de tampão de extração (Tris-HCl 500mM, pH 7,5, NaCl 5M, EDTA 500mM, SDS 2% e β-mercaptoetanol 0,2%) a 65°C durante 10 minutos. Em seguida, 160µL de acetato de potássio 5M foram adicionados às amostras e essas foram mantidas no gelo por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 30 minutos. Ao sobrenadante, foram adicionados 500μL de isopropanol gelado e mantidos por 20 minutos a -20°C, sendo em seguida centrifugados por 30 minutos a 13.000 x g. O *pellet* foi lavado com etanol 70% (v/v), seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 50μL de tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) acrescido de RNAse. O padrão de DNA foi visualizado em gel de agarose 1%

(500mg de agarose em 50mL de tampão TAE (Tris- 90mM, EDTA 1mM, pH 8,0) contendo 0,2% de brometo de etídio.

4.5. Ensaio histoquímico da expressão de *GUS* em plantas transgênicas de tabaco

Plantas transformadas foram submetidas ao ensaio histoquímico para detecção da atividade do gene *Gus*, conforme Brasileiro e Carneiro (1999). Tecidos vegetais como raiz, caule, folha e meristema foram incubados em tampão de ensaio [$NaH_2PO_4.H_2O$ 100mM (pH 7,0), $K_4Fe(CN)_6.3H_2O$ 0,5mM, $Na_2EDTA.2H_2O$ 10mM, Triton X-100 0,1% (v/v)], acrescido de 1mM de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D glucoronide (substrato X-Gluc), a 37°C durante um período de 5 horas, no escuro. Os tecidos foram despigmentados com etanol 70% (v/v) e a expressão do gene *Gus* foi observada em lupa e microscópio. A presença da pigmentação azul nos tecidos indicou a atividade da enzima β-glucoronidase e, portanto, a funcionalidade dos promotores em estudo.

4.6. Transformação genética de *Saccharomyces cerevisiae*

A avaliação da regulação do promotor *MpFen* também foi investigada em células de *S. cerevisiae*, organismo modelo bastante utilizado em análises funcionais. Para tanto, o promotor de *M. perniciosa* foi inserido no vetor de expressão pGREG506 (JANSEN et al., 2005), substituindo o promotor *GAL1* do vetor citado. Os vetores da série pGREG, de acordo com Jansen et al. (2005), são característicos para uso em expressão de genes, com a vantagem de promover os resultados dos experimentos de maneira imediata. Em pGREG506, o promotor regula a ativação da síntese do aminoácido histidina. A construção pGREG506:*MpFen* foi usada na transformação genética de células da linhagem W303 de *S. cerevisiae* via acetato de lítio.

O método usado para transformar células de *S. cerevisiae* foi Acetato de Lítio/DNA carreador/ PEG (GIETZ et al., 2002). Células da linhagem W303 de

S. cerevisiae foram inoculadas em meio YPD líquido (Extrato de levedura 1%, Peptona 2% e Glicose 2%) e incubadas a 30°C por 15 horas até atingir a fase exponencial tardia (aproximadamente 2-6 x 10^7 células/mL). Em seguida, as células crescidas foram centrifugadas a 13.000 x g por 30 segundos e à cultura foi adicionado o *mix* de transformação, seguindo a ordem conforme Tabela 3.

Tabela 3. *Mix* de transformação de *S. cerevisiae* pelo método Acetato de Lítio/DNA carreador/ PEG.

COMPONENTE	VOLUME (µL)
1. PEG 4000 50% w/v	240
2. LiAc 1M	36
DNA de esperma de salmão aquecido (2mg/mL)	50
DNA plasmidial em água (1-10ug)	34
Volume Total	360

Após adição dos componentes acima citados, a mistura foi incubada em banho-maria a 42°C durante 4 horas e as células foram coletadas por centrifugação a 13.000 x g, por 30 segundos e cuidadosamente ressuspendidas em 1mL de água milli-Q estéril. Cem microlitros da suspensão foram plaqueados em placas de Petri contendo meio seletivo SynCO (Base nitrogenada de aminoácidos 10X, YNB 10X, Sulfato de amônia 10X e glicose 10X; acrescido de antibiótico canamicina a 50 $mg.L^{-1}$ e sem adição do aminoácido histidina). As placas foram incubadas no escuro a 30°C durante três dias para obtenção das colônias isoladas.

4.7. Elementos regulatórios em *MpFen* e *MpSod*

A identificação dos elementos regulatórios presentes nos promotores *MpFen* e *MpSod* foi realizada por meio da utilização do banco de dados Transfac Matrix Table, Rel.3.3. Foi estabelecido o grau de 90% de similaridade entre as seqüências depositadas no banco de dados.

4.8. Alinhamento das seqüências promotoras de *M. perniciosa*

As seqüências promotoras foram alinhadas com seqüências de outros fungos. Para isso, utilizou-se o programa ClustalW 2.0 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html).

4.9. Ensaio de irradiação UV em plantas transgênicas

Sementes obtidas com a aclimatação de um clone *MpFen:GUS* foram germinadas em meio MS sólido acrescido de higromicina 10mg.L^{-1}. As plântulas obtidas foram submetidas a ensaios na presença de agentes mutagênicos como a luz ultra-violeta (UV). Para tanto, foram feitas irradiações de UV nas plântulas com intensidades de 100J, 200J e 300J, utilizando o equipamento Cross Linker (Stratagene, EUA). As plântulas foram incubadas no escuro por 3 horas, e em seguida foram submetidas ao ensaio histoquímico para avaliar o padrão de expressão do gene repórter em relação ao controle (plântula não irradiada com luz UV).

Estimou-se, com esse bioensaio, validar a função do promotor *MpFen*, em situações de indução de mutagênese no DNA.

4.10. Ensaio de indução de estresse oxidativo em plantas transgênicas

Discos foliares de quatro eventos independentes de *Nicotiana tabacum* transformados com o clone *MpSod:GUS* foram previamente cortados, sob condições assépticas e, sob suave agitação, foram incubados na presença de soluções contendo o agente indutor de estresse oxidativo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na concentração 5mM durante 20 horas de indução.

Como controles, foram utilizados discos foliares de planta *MpSod:GUS* não submetidos ao ensaio de indução, bem como de planta não transformada mantidos na presença do agente peróxido de hidrogênio.

Após o período de indução, os discos foram submetidos aos ensaios histoquímicos para atividade do *Gus*, a fim de avaliar o padrão de expressão do gene repórter e validar a função do promotor, em situações de estresse oxidativo.

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento e caracterização do promotor *MpFen*

O *MpFen*, isolado da biblioteca genômica do fungo *Moniliophthora perniciosa* utilizando o programa computacional Stuttgart Neural Network Simulator, corresponde à região promotora do gene *Fen* (**f**lap-**e**ndo**n**uclease 1), o qual codifica para uma DNA polimerase com função de reparar danos causados ao DNA. A busca no banco de dados do projeto genoma do *M. perniciosa* (www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura) permitiu a identificação de uma seqüência com aproximadamente 400 pares de base (bp) contendo elementos conservados e está presente no *contig* 28761 (seqüência gerada pelo agrupamento de seqüências que possuem regiões sobrepostas), composto por 1354bp e 41 reads. Essa seqüência de 400pb foi amplificada via reação de PCR e clonada no vetor binário pCambia1381 para a análise do promotor.

5.2. Análise do promotor *MpFen* em plantas de tabaco

Para analisar a função de *MpFen* em plantas, foi feita a inserção deste em pCAMBIA1381, o qual é um vetor de expressão específico para estudo de promotores. Brotos de *N. tabacum* obtidos após etapa de transformação foram individualizados e propagados (Figura 8). Seis eventos independentes da transformação foram confirmados com o diagnóstico via reação de PCR, conforme mostra a Figura 9. As plantas transformadas foram submetidas ao ensaio histoquímico e a atividade enzimática de β-glucoronidase foi observada em raízes, folhas, caule e meristema, revelando que o promotor *MpFen* de

Moniliophthora perniciosa mostrou-se capaz de dirigir a expressão do gene repórter em plantas, conforme pode ser observado na Figura 10 (A a D).

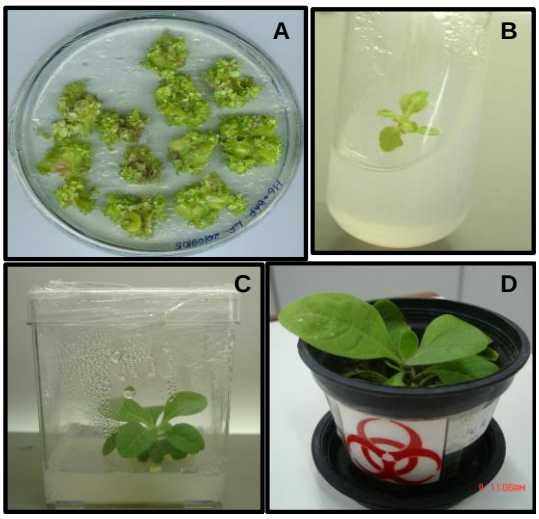


Figura 8: Obtenção de plantas transformadas - Discos foliares de tabaco foram submetidos à transformação mediada por *A. tumefaciens*. Os regenerantes (A) foram isolados, transferidos para tubo de ensaio (B) e, após desenvolvimento, foram micropropagados em caixas de micropropagação (C). As plantas com atividade de *Gus* foram aclimatadas (D) e levadas para casa de vegetação.

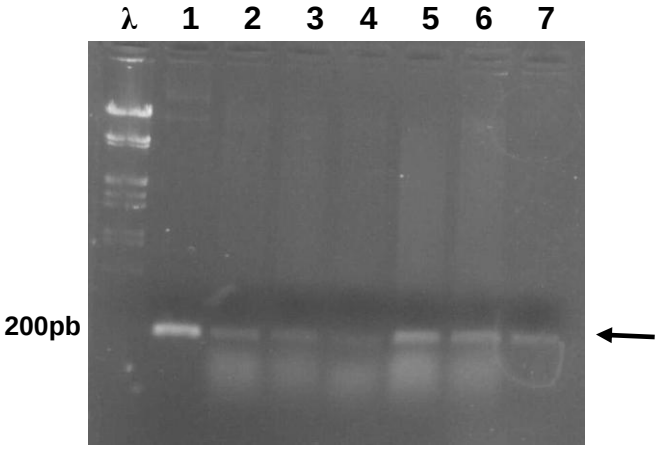


Figura 9: Diagnóstico molecular das plantas transformadas – A clonagem feita no vetor binário pCAMBIA 1381 foi utilizada na transformação de tabaco por *A. tumefaciens.* Dez pmoles do DNA genômico, extraído de folhas das plantas regeneradas, foram utilizados em reação de PCR conduzida com *primers* específicos para o *nos.* Cinco microlitros de cada reação foram aplicados em gel de agarose 1% (canaletas 1 a 6). O controle positivo utilizado foi a amplificação do DNA plasmidial do pCAMBIA 1381 (canaleta 1).

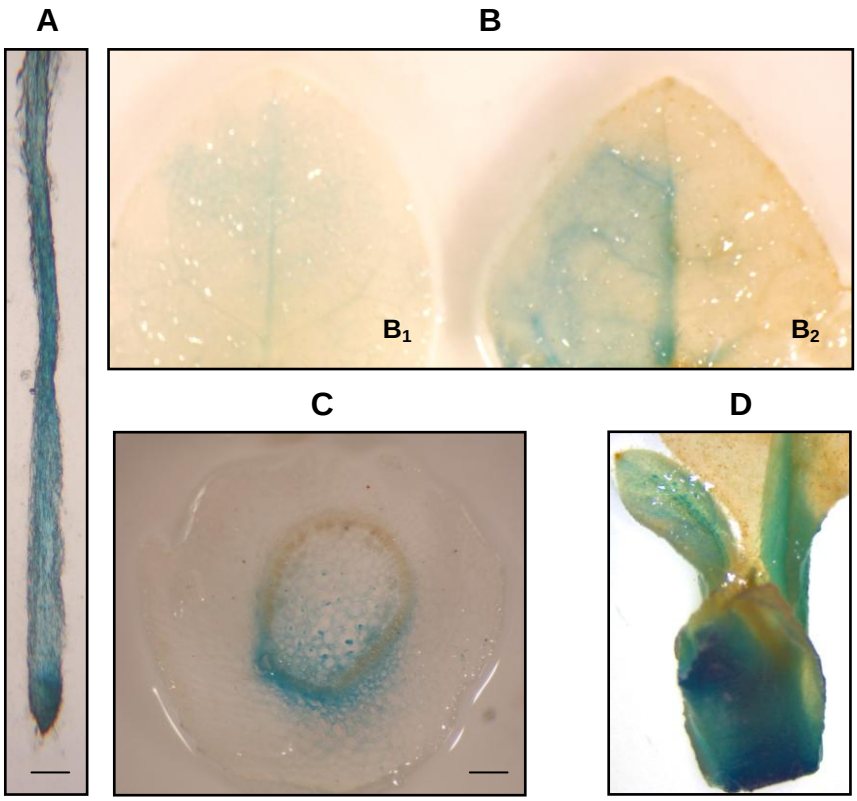


Figura 10: Localização da expressão do gene repórter *Gus*, comprovando a funcionalidade do promotor *MpFen* em plantas de *Nicotiana tabacum* L. – Em A: corte longitudinal de meristema apical da raiz, escala: 20µm. Em B: folhas jovens (B_1) e senescentes (B_2). Em C: corte transversal de caule, escala: 20µm; e em D: meristema apical.

A Figura 11 mostra uma elevada taxa de expressão do GUS em folhas em processo de senescência e no ápice caulinar (11 A). Em uma visão detalhada da folha senescente, foi observada a expressão do gene *Gus* em tricomas (Figura 11 B e C), prolongamentos da parede externa das células epidérmicas, que apresentam elevada taxa de divisão celular.

Análises anatômicas executadas em folhas e tecidos caulinares de tabaco *MpFen*:*GUS* revelaram a elevada expressão do gene repórter em regiões dos feixes vasculares de folhas (Figura 12 A) e nas regiões do procâmbio e da protoderme do caule (Figura 12 B), as quais são responsáveis pela formação do tecido vascular, bem como do tecido de revestimento, respectivamente. Este resultado condiz com a função do *Fen*, já que essas regiões apresentam intensa atividade de divisão celular.

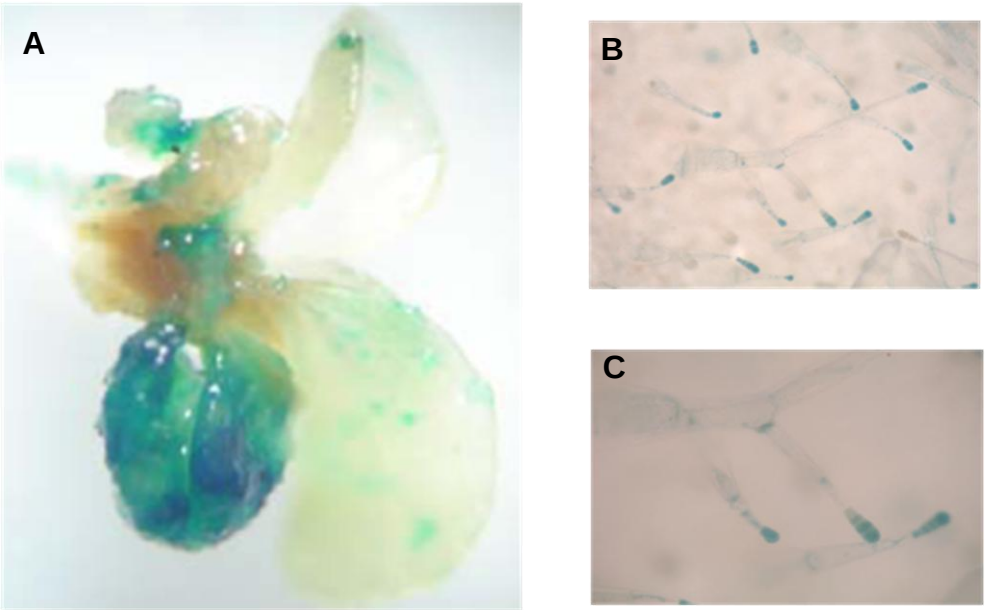


Figura 11: Ensaio histoquímico das plantas transgênicas – Plantas transgênicas foram submetidas ao ensaio histoquímico para atividade do *Gus*. O promotor *MpFen* de *M. perniciosa* mostrou-se funcional em plantas de tabaco (A) sendo mais expresso em folhas em senescência, meristema (A) e tricomas de folhas totalmente expandidas (B e C).

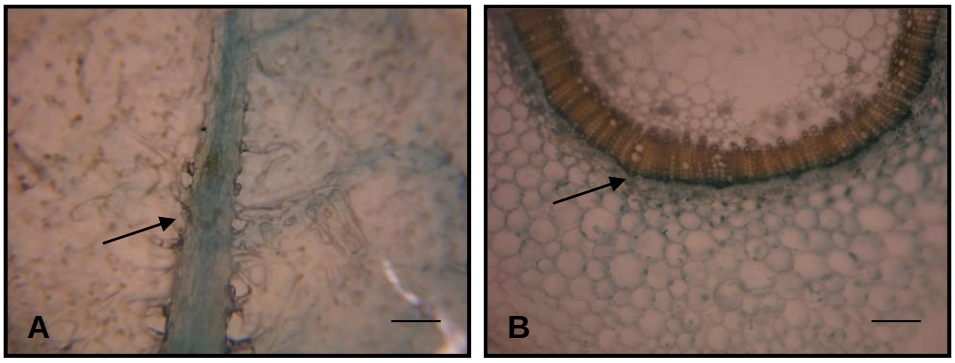


Figura 12: Expressão do gene repórter *Gus* sob controle do promotor *MpFen* em folhas de *N. tabacum*. Setas indicam expressão em regiões do feixe vascular em folhas (A) e do procâmbio em caule (B), regiões que apresentam intensa atividade de divisão celular.
Escala: 20μm

5.3. *MpFen* possui elementos regulatórios de resposta a danos causados ao DNA e estresse oxidativo

O alinhamento utilizando o programa ClustalW 2.0, feito da seqüência promotora *MpFen* junto a seqüências homólogas de genes envolvidos em resposta a danos no DNA do fungo *S. cerevisiae* (Figura 13) permitiu verificar o elemento conservado DRE (*Damage Responsive Element*), ou seja, elemento relacionado à resposta a danos causados ao DNA. Esta relevante informação induziu a experimentos de ensaio de indução de mutagênese em discos foliares (dados não mostrados) e em plântulas obtidas com a germinação das sementes de *MpFen:GUS*. A Figura 14 demonstra o padrão de expressão do gene *Gus* nas plântulas após serem submetidas à irradiação de luz UV a 100, 200 e 300J cada. Percebe-se que houve aumento na expressão do gene *Gus* à medida que foi aumentada a intensidade de luz ultravioleta. Esse resultado, observado através de ensaio histoquímico após 3 horas de indução, indicou que o elemento contido na seqüência promotora *MpFen* foi capaz de ativar a expressão do gene repórter sob condições de elevados danos no DNA, aumentando assim o nível de transcrição do gene repórter *Gus*.

Damage Responsive Element (DRE)

```
MpFen        GAGTAAGGAATGTCAAAA
PHR1         GAGGAAGCA---GTCAAA
DRE1RAD2     GTGGAGGCA---TTAAAA
DRE2RAD2     TTAAAGGGA---TTGAAA
SNM1         GGAAACGGA---CTGAAA
```

Figura 13: Alinhamento do DRE do promotor do *M. perniciosa* com o de *Saccharomyces cerevisiae* – a seqüência de bases do promotor do gene *MpFen* foi alinhada com seqüências de *S. cerevisiae* utilizando o programa Clustal-W 2.0.

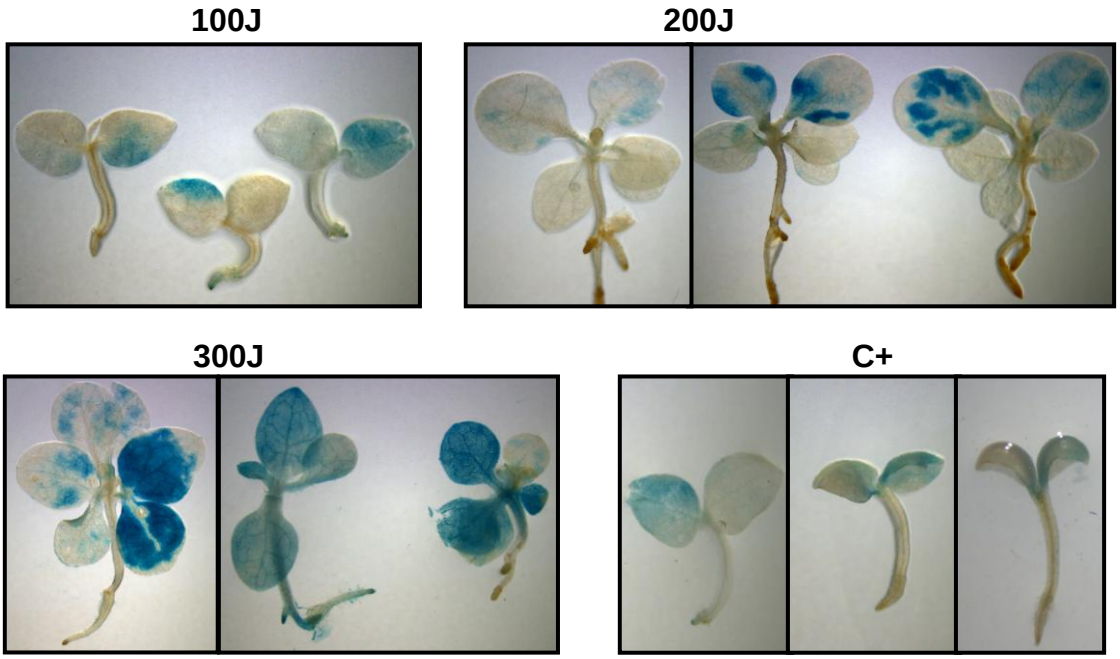


Figura 14: Ensaio de indução de mutagênese em plântulas de *MpFen:GUS* – após submissão de irradiações de luz UV a 100J, 200J e 300J, plântulas de *MpFen:GUS* foram incubadas no escuro durante 3 horas e em seguida submetidas ao teste GUS. Controle positivo (C+): ensaio de GUS em plântulas *MpFen:GUS,* não submetidas ao ensaio de mutagênese.

A Figura 15 mostra a identificação do elemento de resposta a estresse oxidativo presente na seqüência *MpFen*, referindo-se ao palíndromo YRE (*Yap1p Response Element:* TTAC/GTAA) (TOONE e JONES, 1999). E o alinhamento feito desta seqüência junto à seqüência do promotor *MDR1* (***m**ulti**d**rug **r**esistence 1*) do fungo *Candida albicans* (ROGNON et al., 2006), permitiu verificar similaridade entre as seqüências, como pode ser visualizado na Figura 16. Para confirmar a função do gene *MpFen*, plântulas foram mantidas sob condições de estresse oxidativo, em presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas concentrações de 5mM e 10mM. Resultados mostraram elevada expressão em relação ao controle (plântulas transgênicas não submetidas ao ensaio), conforme pode ser visualizado na Figura 17.

```
GTAAGGTGAATTCAAGGCCATCCCGTACAGAGTTCAAAGACACACAAATT
CAGCATATTATAACAGCTGTTTTCGCACTGAGCTAGAGCTATGGATCCAT
CCGGGCACCTAGAGTAAGGAATGTCAAAAAGACTGTTTTGTCCAAGATGT
ACAACTCACTTGAGCTGCTGACCATTTTGCTATCCGAGCGAAATTTCCAG
GTTCTTGGTCAAATTCAAGATTTTCTGTAAGATCAGGAGGCTTGGTGAGG
TCAAGAAGTGGAGGGGACCATGCAGCCTGAAGCTCCTCGACGGCTGTAGC
CATAAAGCTAGGGTAAAGTTTGAGTGTGACAGTAACAAAGAACGCGCTAC
GTCACGCGTTTCTCATCACTCCCTTAACCTTCTCCCTCACCGTCCTTGTC
```

Figura 15: Identificação do elemento YRE (*Yap1p response element*) na seqüência do promotor *MpFen.* Em azul, encontram-se destacados na seqüência *MpFen*, os elementos envolvidos na resposta a estresse oxidativo. Em vermelho, elemento TATA box.

```
MpFen      CTCGACGGCTGTA
MDR1       CACAACGG-TAAA

MpFen      CATAAAGCTAGGGTAAAGTTTGAGTGTGACAGTAACAAAGA
MDR1       CCTAA--TTGGGAAAAATACCGAGAATGACACAACCTAAGA
```

Figura 16: Alinhamento da seqüência *MpFen* junto à do promotor *MDR1* do fungo *Candida albicans*.

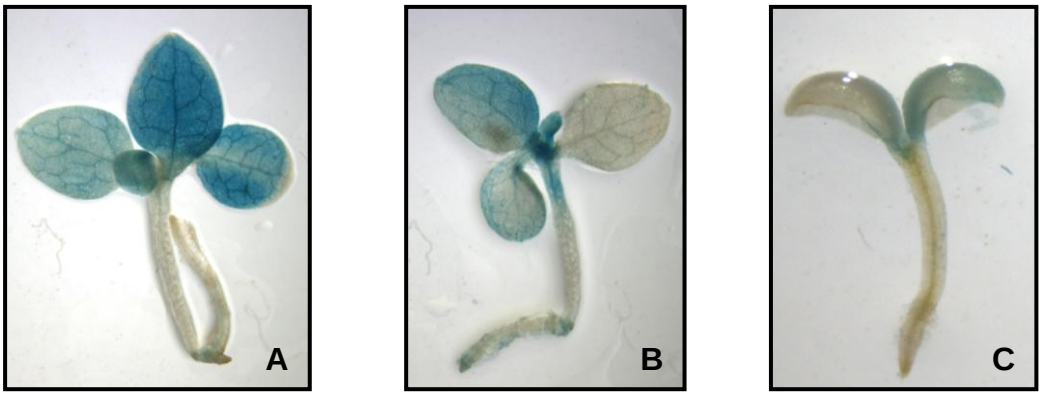


Figura 17: Ensaio histoquímico em plântulas *MpFen:GUS* – após serem mantidas em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas concentrações 5mM (A) e 10mM (B), as plântulas foram submetidas ao ensaio histoquímico após 20 horas de incubação. Em C, plântula *MpFen:GUS* não mantida na presença de H_2O_2.

A busca realizada no programa computacional TRANSFAC MATRIX TABLE (Rel.3.3 06-01-1998) permitiu verificar a presença de elementos, anteriores ao TATA box, envolvidos em resposta a choque térmico (HSF), bem como do gene regulador de álcool desidrogenase 1 (ADR), conforme ilustra a Figura 18. Baseado nessas informações, discos foliares de tabaco *MpFen:GUS* foram incubados a 37°C, durante 3 horas, e a 42°C, durante 10 minutos, a fim de avaliar a regulação da expressão do gene *Gus* quando submetidos a altas temperaturas. Observou-se que a expressão do gene *Gus* nos discos foliares transgênicos sujeitos ao choque térmico de 37°C foi proporcional à expressão dos discos foliares controle (não submetidos ao choque térmico) e os discos transgênicos a 42°C não expressaram o GUS (dados não mostrados).

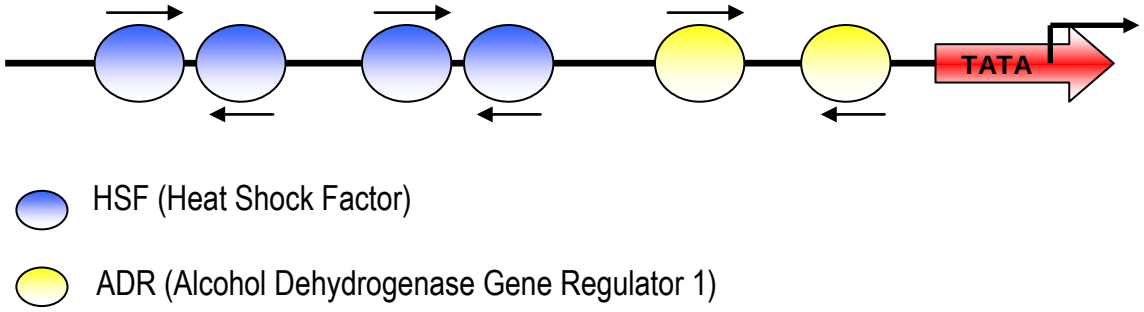


Figura 18: Esquema ilustrativo dos *cis*-elementos presentes na sequência promotora *MpFen*. Para tanto, foi utilizado o programa Transfac Matrix Table (1998).

5.4. O promotor *MpFen* mostrou sua funcionalidade em *S. cerevisiae*

A avaliação da regulação do promotor *MpFen* também foi investigada em células de *S. cerevisiae*, organismo modelo bastante utilizado em análises funcionais. Em pGREG506, o promotor regula a ativação da síntese do aminoácido histidina. A construção pGREG506:*MpFen* foi usada na transformação genética de células da linhagem W303 de *S. cerevisiae* via acetato de lítio. A Figura 19 demonstra as colônias de leveduras obtidas após transformação e, portanto, revela que as células contendo a construção supracitada foram capazes de promover a síntese de histidina em meio seletivo na ausência deste. Por conseguinte, verificou-se que *MpFen* de *M. perniciosa* mostrou sua funcionalidade também em outro fungo (*Saccharomyces cerevisiae*), como era de se esperar. Para diagnosticar as colônias transformantes, foi realizada reação de PCR das mesmas, utilizando *primers* específicos para a região promotora. Os produtos da reação foram visualizados em gel de agarose 1% (Figura 20).

Figura 19: Colônias de *S. cerevisiae* após transformação com pGREG506:*MpFen*. Células da linhagem W303 foram usadas na transformação e plaqueadas em meio seletivo SC (-HIS). As colônias crescidas (A e B) comprovam que a síntese de histidina foi ativada pelo promotor em estudo.

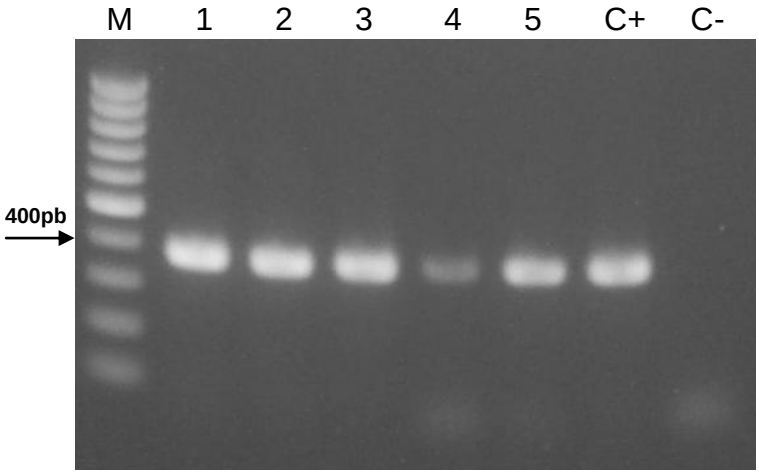


Figura 20: Diagnóstico de transformação de *S. cerevisiae*. Cinco colônias (1 a 5) foram selecionadas e submetidas ao diagnóstico por PCR. O controle positivo utilizado (C+) foi DNA genômico de *M. perniciosa* e o controle negativo (C-) foi DNA de *S. cerevisiae* selvagem (WT). Seta indica o fragmento de 400bp amplificado. M= Ladder de 100 pb.

5.5. Isolamento e caracterização do promotor *MpSod*

O gene *MpSod* codifica para a enzima superóxido dismutase (SOD), envolvida nas defesas contra danos causados ao DNA pelas espécies reativas de oxigênio (ROS). A região promotora foi isolada do banco de dados do projeto via PCR e clonada em vetor binário pCAMBIA1381. A busca no banco de dados do projeto genoma do *M. perniciosa* (www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura) permitiu identificar uma seqüência com aproximadamente 1.093 pares de base (pb) contendo elementos conservados, localizada no *contig* 1569 e composto por 5 reads. Dentre os 1.093pb, uma seqüência de aproximadamente 400pb do promotor foi isolada e amplificada via reação de PCR, sendo então clonada no vetor binário pCambia1381 para a análise do promotor.

5.6. A região promotora *MpSod* é capaz de promover a transcrição do GUS

Sob as mesmas condições de trabalho realizadas em plantas com o promotor *MpFen*, o *MpSod* também foi usado na transformação genética de *N. tabacum*, sendo previamente inserido no vetor de expressão em plantas, pCAMBIA1381, dirigindo a expressão do gene repórter *Gus* (Figura 6). A construção *MpSod:GUS* foi transferida para *Agrobacterium* e usada para obtenção de plantas transgênicas. Os brotos regenerados em meio seletivo contendo o antibiótico higromicina foram utilizados em ensaios de atividade de GUS. Quatro eventos independentes foram submetidos ao ensaio histoquímico e revelaram a expressão do GUS (Figura 21). Isto indica que a região promotora de *MpSod* foi capaz de dirigir a expressão do gene repórter, demonstrando sua funcionalidade em plantas de tabaco.

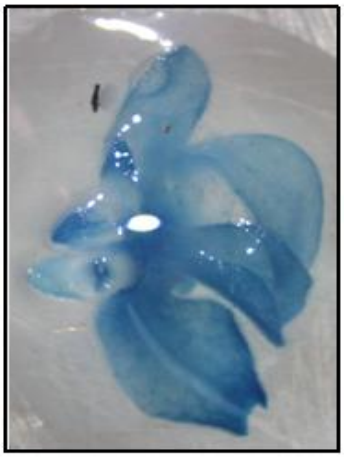


Figura 21: Ensaio histoquímico realizado em broto *N. tabacum* de *MpSod:GUS*

5.7. Seqüência de *MpSod* possui *cis*-elementos regulatórios envolvidos na resposta ao estresse oxidativo

Uma vez que foi comprovada a funcionalidade de *MpSod* em plantas de tabaco, procurou-se identificar os *cis*-elementos regulatórios presentes na seqüência promotora. A análise da região promotora foi realizada com o auxílio do programa computacional Transfac Matrix Table (1998) e revelou a presença dos mesmos elementos encontrados na seqüência *MpFen* (**HSF** e **ADR**). A Figura 22 ilustra a distribuição dos elementos na seqüência.

O alinhamento da seqüência promotora *MpSod,* comparando com seqüências de outros organismos, também foi realizado com o auxílio do programa ClustalW 2.0. Diversos sítios, possivelmente envolvidos com estresses oxidativos foram identificados na seqüência (Figura 23). Dentre os sítios identificados, destaca-se o elemento *SODCc1* relacionado a estresse oxidativo em arroz (TSUKAMOTO et al., 2005). A Figura 24 mostra o alinhamento feito desta seqüência com o *MpSod*.

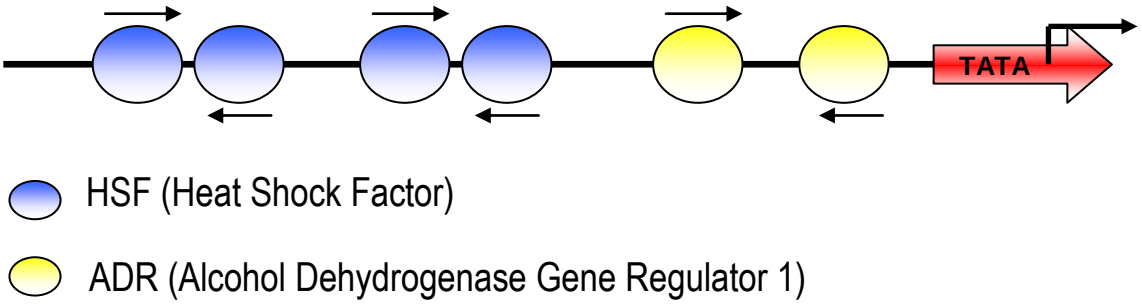
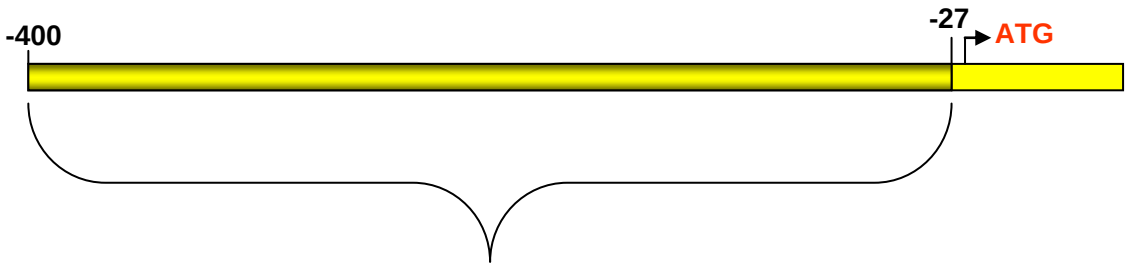


Figura 22: Esquema ilustrativo dos *cis*-elementos presentes na sequência promotora *MpFen*. Programa utilizado: Transfac Matrix Table (1998).

O elemento ERSE (envolvidos em estresse oxidativo no retículo endoplasmático) também foi localizado na seqüência nas posições -40, -220, -232, -246. Diversos elementos de resposta a etileno (ERE) também foram identificados no *MpSod*, tais como GCC box (posições -32, -67, -369), o qual está presente em muitos promotores de genes relacionados à patogênese (PR) em tomate (ZHANG et al., 2004). Foram localizados ainda na seqüência, alguns elementos de resposta a estresses em mamíferos (posições -265, -317, -366).

Uma seqüência também encontrada no *MpSod* consiste no elemento STRE, localizado nas posições -279, -301. Tal elemento é responsável pela expressão gênica sob condições de calor, alta osmolaridade e alta concentração de etanol (WATANABE et al.,2007).




```
-400  ACTCAAGGCTGGCCGAGAAGTTGTTCTCGGTA
-368  TGATGGGTGCTTTAATGTTGGGAAGCTTTGGT
-336  GTCTTTATGCTTTAAGTCATGACCTGATCATC
-304  TAGGGTGGGATGTTGCTTCGATCTTCAGTGGT
-272  ACTGAAAGAGAACAGATTTTCTTGCATTGGCA
-240  ATTGATCATTGGAGTGATCATTGGCGAATTTT
-208  CGTAACTTAACAAGCATACCGTGAAGTAATTT
-176  TTACTCCATTTCGTAAGTAATCTAATAATCAG
-144  TTGTAAGTGTGCACAATAATACAGGGTGTTCG
-112  GCAAGGTTCTTTAGGGTTCTCCGGCATTTCGG
 -80  GGACAATCAAGAAGCCGGAGTGGTACCCATAC
 -48  TCTTTATCCACCACCGCCAGC
```

Figura 23: Localização dos elementos presentes na seqüência promotora *MpSod.* Em destaque: TATA box (sublinhado); GCC box (azul); STRE (rosa); ERSE (laranja, verde); GTACT (cinza) e elementos presentes em promotores de mamíferos (lilás, marrom).

```
SODCc1   AATAATTTATAAAT-AAAACTTTTATATA
         |||.|.|||.|||.|  ...||..|.|||.|
MpSod    AATCAGTTGTAAGTGTGCACAATAATACA
```

Figura 24: Alinhamento de *MpSOD* com *SODCc1* de arroz (região CORE)

5.8. Padrão de expressão do GUS é maior em plantas de *MpSod:GUS* submetidas ao ensaio de estresse oxidativo

Uma vez identificados os elementos regulatórios relacionados a estresses oxidativos na seqüência promotora *MpSod*, discos foliares de plantas transgênicas *MpSod:GUS* foram submetidos ao ensaio de estresse oxidativo em soluções contendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na concentração 5mM.

Os resultados obtidos mostraram que os discos foliares mantidos em peróxido durante vinte horas foram capazes de expressar o gene *Gus* após ensaio histoquímico. A Figura 25 mostra uma elevada taxa de expressão nas quatro plantas usadas no ensaio, enquanto que no controle (disco foliar de *MpSod:GUS* não sujeito ao ensaio) houve uma menor expressão. Este resultado leva a inferir que os elementos conservados presentes na seqüência promotora *MpSod* ativam a regulação do gene, em resposta a danos oxidativos causados ao DNA das plantas.

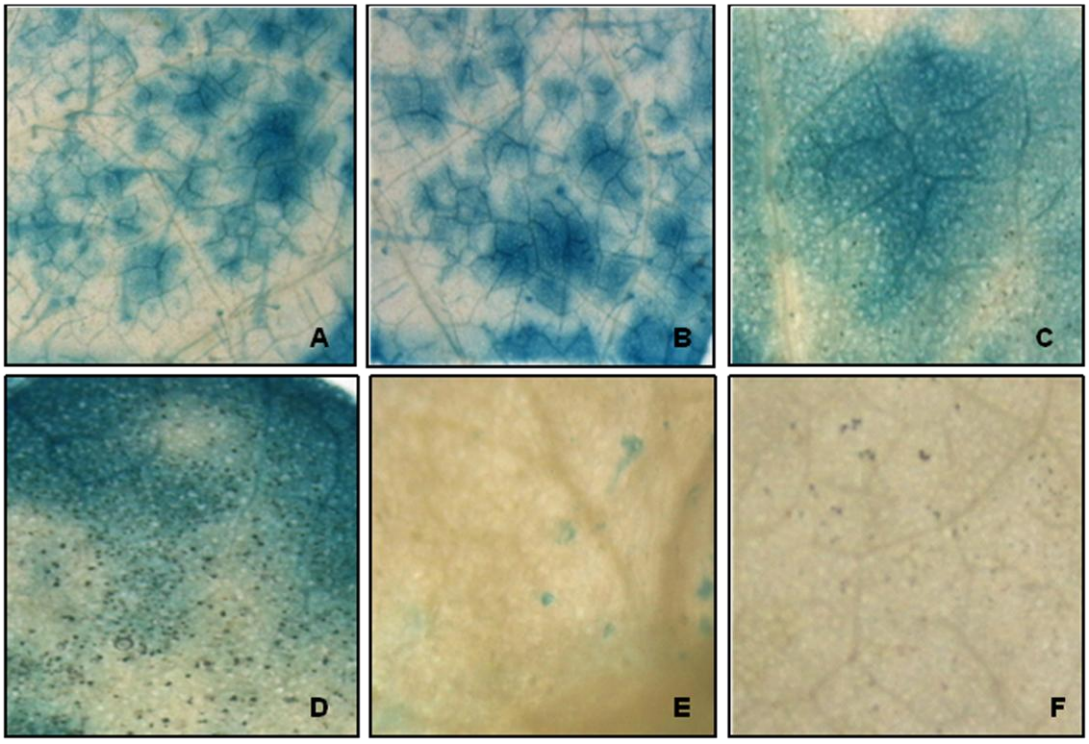


Figura 25: Ensaio de estresse oxidativo em plantas transgênicas de *MpSod:GUS* – discos foliares de *MpSod:GUS* de quatro plantas transgênicas independentes (A – D) foram mantidos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na concentração 5mM durante 20 horas. Após período de incubação, foi feito teste histoquímico para avaliar a expressão do GUS. Em E, disco foliar de planta transgênica não mantida em peróxido e em F, disco foliar de *N. tabacum* selvagem (WT).

6. DISCUSSÃO

Com o início do projeto genoma de *Moniliophthora perniciosa* (2001), fungo causador da doença vassoura-de-bruxa do cacaueiro, tornou-se possível identificar e analisar as funções de diferentes genes, com a finalidade de aumentar a gama de informações sobre esse fitopatógeno e auxiliar na obtenção de ferramentas eficazes e específicas de controle da doença.

No presente trabalho, foi feita a caracterização e análise funcional de duas regiões promotoras *Fen* e *Sod*, que regulam a transcrição dos respectivos genes do fungo *M. perniciosa*. Esses dois genes foram escolhidos, pois além de fornecer informações sobre a forma de resposta do fungo a estresses oxidativos, eles poderiam ter aplicações biotecnológicas.

Durante a análise computacional feita utilizando o programa Stuttgart Neural Network Simulator (http://www-ra.informatik.uni-tuebingen.de/SNNS/) (VIDAL et al., 2006), foram identificadas regiões conservadas em promotores. Dentre elas, as seqüências de 400bp cada, homólogas ao genes *MpFen* e *MpSod* foram isoladas, clonadas e tiveram suas funções analisadas.

O promotor *MpFen* foi capaz de regular a expressão do gene repórter *Gus* nas plantas transgênicas de tabaco, onde uma elevada taxa de expressão pôde ser visualizada em folhas senescentes. Resultado similar foi obtido por Schenk et al (2005), em que a atividade do promotor *SEN1* foi analisada em *Arabidopsis*, mostrando alta taxa de expressão do GUS em folhas mais velhas. Células em processo de senescência sofrem muitos danos devido a altas condições de estresse e alto risco de mortalidade. Além disso, a infecção por fitopatógeno pode levar ao acúmulo de ROS e outros compostos químicos nas células como o etileno, os quais podem ter funções na defesa contra a senescência, bem como na promoção desta (SCHENK et al., 2005). Sendo o *Fen*, um gene que codifica para uma DNA polimerase envolvida em reparo de

danos causados ao DNA (LIU et al., 2006), ficou evidente a expressão do gene *Gus* em regiões de elevada taxa de replicação do DNA. Em uma visão detalhada da folha senescente, foi observada a expressão do gene *Gus* em tricomas, prolongamentos da parede externa das células epidérmicas, que apresentam elevada taxa de divisão celular (Figura 10B). Embora seja um promotor do fungo, sua ativação em tecidos vegetais senescentes (folhas mais velhas) e em replicação (tricomas) mostra que os mecanismos de reparo entre os fungos e plantas são semelhantes, já que os fatores de transcrição de tabaco foram capazes de se ligar ativando o promotor *MpFen*. Isso abre perspectivas de se estudar promotores de fungos em sistemas mais simples de se transformar, como plantas.

O alinhamento da seqüência *MpFen* com a de outros fungos, como *S. cerevisiae*, revelou a presença do *cis*-elemento de resposta a danos causados no DNA, o *Damage Responsive Element* (DRE) e, sob elevados níveis de intensidade de luz ultravioleta (UV), a expressão do GUS em plântulas transgênicas foi mais intensa. Visto que a radiação UV é principalmente absorvida pelas células epidérmicas de plantas, resultando em heterogeneidade tanto nos órgãos quanto nos processos biológicos (KIMURA et al., 2000), o resultado aqui obtido, observado através de ensaio histoquímico após 3 horas de indução, indicou que o elemento contido na seqüência promotora *MpFen* foi capaz de ativar a expressão do gene repórter sob condições de elevados danos no DNA, aumentando assim o nível de transcrição do gene repórter *Gus.*

Sabendo-se que o DNA danificado pode resultar em disfunções celulares, como instabilidade genética, mutagênese ou morte celular, Da Costa et al. (2008) mostraram que células com deficiência em reparo de excisão de bases ou nucleotídeos tornaram-se hipersensíveis à luz UV e puderam induzir altos níveis de apoptose (morte celular programada), visto que a indução de apoptose tem sido associada também à persistência de lesões em DNA não reparado. Sendo *Fen*, um gene que codifica para uma enzima altamente eficiente, que desempenha importante papel na replicação do DNA (unindo os fragmentos de Okazaki) e no reparo de excisão de bases (removendo os segmentos danificados) em organismos eucariotos (BIBIKOVA et al., 1998),

ficou evidente a funcionalidade do promotor do fungo em plantas, o que reforça que os mecanismos envolvidos possuem vias conservadas.

Em *MpFen* e *MpSod*, foi possível identificar elementos de resposta a estresses oxidativos (Figuras 15 e 23, respectivamente). Os ensaios de indução de estresse oxidativo feitos nas plantas transgênicas *MpSod*:*GUS* demonstraram elevada expressão do gene repórter *Gus* em relação às plantas controle. Os mesmos elementos conservados em *MpSod* foram identificados em três genes antioxidantes de arroz que apresentam região *core* conservada em sua seqüência promotora, e induziram três vezes mais a expressão do gene repórter na presença do agente oxidante (TSUKAMOTO et al., 2007). O motif de GTACT também foi localizado na seqüência *MpSod*. Este motif em musgos está envolvido na repressão transcricional de resposta a cobre, visto por Nagae et al. (2008) que mostrou a funcionalidade de elementos de organismos bastante simples em plantas superiores, que são organismos mais complexos. Da mesma maneira, o elemento de resposta a estresses oxidativos YRE de *Candida* (ROGNON et al., 2006) foi identificado na seqüência MpFen, e o ensaio com peróxido de hidrogênio em plântulas *MpFen:GUS,* demonstrando elevada expressão do gene *Gus,* confirmou a ativação do promotor sob condições de estresse.

A flap endonuclease 1 (FEN) é uma nuclease pertencente à classe II da família nuclease RAD2, de estrutura multifuncional envolvida em muitas rotas metabólicas dos ácidos nucléicos (LIU et al., 2006). Os primeiros estudos sugeriram que FEN reconhece a ponta 5' e então procede na clivagem do sítio, além de possuir atividade GEN (*gap endonuclease*) (LIU et al., 2006). Por outro lado, a superóxido dismutase (SOD) é uma enzima catalisadora da dismutação de $O^{2.-}$ e HO_2^+ a H_2O_2, sendo considerada importante agente antioxidante, envolvida nas defesas contra danos causados ao DNA pelas espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo levar à morte celular (AZEVEDO, 2007), sendo a SOD vital para a sobrevivência das células (KEN *et al.,* 2005).

Em plantas, a rápida geração e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, desencadeadas pela explosão oxidativa após a percepção dos sinais do fitopatógeno, atuam com diferentes funções de defesa. Dentre as várias funções das ROS na defesa vegetal, podemos citar o efeito tóxico direto de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ao fitopatógeno, agindo como um agente

antifúngico. De fato, a infecção causada por fitopatógeno leva ao acúmulo de ROS nas células. Foi demonstrado em cacau (CEITA et al., 2007) que o *M. perniciosa* induz um grande acúmulo de ROS, e que, consequentemente ele se defende desse aumento de ROS via a expressão de genes de detoxificação (*SOD*) e também via mecanismos de reparo de DNA (*FEN*), uma vez que ele coloniza um ambiente inóspito. Isso foi comprovado em tabaco, pois os experimentos de indução a estresses revelaram altos níveis de expressão do gene repórter *Gus* quando da indução por agentes químicos e físicos, simulando as respostas das plantas à infecção por fitopatógenos. Na sinalização para respostas de defesa da planta a fitopatógenos, o H_2O_2 é o candidato mais atrativo dentre as ROS, por causa da sua vida relativamente longa e alta permeabilidade através das membranas. Desse modo, após o reconhecimento do fitopatógeno, seguido da explosão oxidativa e seus intermediários reativos, ocorre indução de genes de defesa e morte celular programada (apoptose), onde o H_2O_2 age como um sinal para indução de genes de proteção celular nas células vizinhas para restringir o desenvolvimento da lesão (RESENDE et al., 2003).

A fim de entender as respostas de defesas de genes de arroz a estresses bióticos e abióticos, Sasaki et al. (2007) usaram genes de peroxidases induzidas por fungos e estudaram detalhadamente as características precisas dos promotores, incluindo análises histoquímicas do gene repórter *Gus* em plantas transgênicas. Os resultados obtidos por eles sugeriram que os promotores em estudo foram ativados quando tratados com metil-jasmonato (MeJA). Em nosso estudo, promotores de genes do fungo *M. perniciosa* foram isolados e analisados em plantas transgênicas de tabaco. Os resultados aqui obtidos permitiram verificar que os promotores do fitopatógeno também foram capazes de ativar a transcrição do gene repórter *Gus,* principalmente quando tratados com agentes indutores de mutagênese e estresses oxidativos. Mais uma vez, embora seja um promotor de uma SOD de fungo, as respostas obtidas pela expressão do *GUS* mostram que os mecanismos de resposta a elevados níveis de H_2O_2 são conservados entre plantas e fungos, uma vez que os danos são comuns.

A análise de expressão basal e induzida do gene *Gus* sob orientação dos promotores aqui estudados indicou a importância dessas duas regiões em

sistemas de defesa a vários estresses. A expressão do gene repórter pôde ser observada em plantas *MpFen*:*GUS* em raízes, procâmbio e protoderme de caules, meristema e folhas (Figura 10). Em brotos *MpSod*:*GUS*, elevada taxa de expressão de *GUS* foi visualizada, e teve sua expressão aumentada sob condições de estresses abióticos, ou seja, quando discos foliares das plantas foram mantidos em presença de H_2O_2, visto que *Sod* é um gene que codifica para uma enzima que detoxifica espécies reativas de oxigênio.

Promotores constitutivos, por exemplo, *CaMV35S* (vírus mosaico da couve-flor) e *nos* (nopalina sintase) são frequentemente usados para ativar a expressão de transgenes em plantas e, sob controle de tais promotores, o gene é expresso na maior parte dos tecidos, durante a maioria das fases de crescimento e desenvolvimento das plantas. Isso tem um custo energético grande para a planta, além de efeitos indesejáveis tanto para a planta como para o consumidor, caso se trate de um alimento (MALNOY et al., 2003). Pensando nisso, uma estratégia para a engenharia de resistência é a construção de plantas transgênicas que carregam genes que codificam para proteínas altamente ativas, na qual a expressão esteja sob controle de promotor induzível por um patógeno.

Genes oriundos de patógeno e de plantas também têm sido usados na resistência de plantas à invasão de fitopatógenos e essas estratégias implicam na expressão de genes com produtos tóxicos para patógenos específicos, bem como no aumento do mecanismo de defesa natural da planta (MALNOY et al., 2006). Estudo feito por Malnoy et al. (2003) com o promotor *str246C*, induzível por patógeno em peras, mostrou que este promotor, pertencente à família de genes ativados durante as primeiras fases de interações compatíveis (doenças) e incompatíveis (HR, resistência), não é regulado apenas por patógenos e elicitores, mas também por agentes abióticos. De acordo com os resultados aqui obtidos, embora os promotores *MpFen* e *MpSod* pertençam a um fitopatógeno, indiretamente eles podem ser considerados induzíveis por fitopatógeno.

Em função disso, a modificação genética fundindo-se um gene de defesa a um desses promotores induzíveis torna-se uma ferramenta poderosa para o controle de fitopatógenos, oferecendo uma alternativa de controle no custo e nos agentes abióticos prejudiciais envolvidos na interação

planta:patógeno, de maneira que a expressão gênica pode ser restringida apenas às células ou regiões afetadas com a infecção, e não ocorrendo nas demais partes da planta. Sabe-se que *M. perniciosa* infecta os tecidos meristemáticos das plantas de *T. cacao* (EVANS, 1980). Nesse sentido, a expressão dos genes de defesa fundidos aos promotores *MpFen* e *MpSod*, pode se tornar uma importante ferramenta na proteção da planta durante o processo de infecção.

À parte das possíveis aplicações biotecnológicas, os resultados aqui obtidos ajudam a entender as características funcionais desses dois promotores de *M. perniciosa*, envolvidos em resposta a estresses oxidativos e a danos causados ao DNA. Vale ressaltar que até o momento nenhum trabalho deste tipo foi realizado com esse fitopatógeno. Ambos promotores podem ser usados como ferramentas para produzir plantas transgênicas tolerantes a estresses que acarretem em danos oxidativos e/ou acúmulo de H_2O_2, bem como podem ser úteis para a expressão controlada de genes de interesse em *Moniliophthora perniciosa*, principalmente em estudos funcionais utilizando-se RNAi, onde promotores da própria espécie são importantes para a indução do dsRNA.

A complementação da função do promotor *MpFen* em levedura mutante também abriu novas perspectivas de estudos funcionais de promotores do *M. perniciosa* (Figura 19), uma vez que é bem mais simples transformar leveduras do que *M. perniciosa*. Como perspectivas, análises de expressão de RNA das plantas via RT-PCR a fim de avaliar o controle da regulação transcricional, bem como estudos de deleção de regiões desses promotores ajudarão a compreender melhor a estrutura dos mesmos e para mapear os *cis*-elementos.

7. CONCLUSÕES

- Os promotores *Fen* e *Sod* do fungo *Moniliophthora perniciosa* foram funcionais nas plantas de *Nicotiana tabacum* e no fungo *Saccharomyces cerevisiae*, validando, assim, o programa computacional baseado em redes neurais, elaborado no Labbi;

- As seqüências *MpFen* e *MpSod* contêm *cis*-elementos capazes de ativar a expressão gênica (*GUS*) em tecidos meristemáticos, folhas, raízes e caule de plantas de tabaco transgênicas, e de maneira significativa, nos tecidos sob induções de estresses oxidativos e lesões no DNA, conforme pôde ser visto nos ensaios biológicos realizados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELHAY, E.; PEREIRA, M. Promotores complexos **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, 2003.

AIME, M.C.; PHILIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, Theobroma cacao) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v. 97, nº.5, p. 1012-1022, 2005.

ALLEN, R. D., WEBB, R.P., SCHAKE, S.A. Use of transgenic plants to study antioxidants defenses. **Elsevier Science Inc**, v. 23, nº.3, p. 473-479, 1997.

ALVES-RODRIGUES, I., GALÃO, R.P., MEYERHANS, A., DÍEZ, J. *Saccharomyces cerevisiae*: A useful model host to study fundamental biology of viral replication. **Elsevier**, v. 120, p. 49-56, 2006.

AZEVEDO, M.-M., CARVALHO, A., PASCOAL, C., RODRIGUES, F., e CÁSSIO, F. Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi. **Elsevier**, n. 377, p. 233-243, 2007.

BASTOS, C.N. Patogenicidade e características do isolado de *Crinipellis perniciosa* procedente de Uruçuca, Bahia. **Fitopatologia Brasileira,** v. 15, p. 344-346, 1990.

BIBIKOVA, M., WU, B., CHI, E., KIM, K., TRAUTMAN, J.K., e CARROLL, D. Characterization of FEN-1 from *Xenopus laevis*: cDNA cloning and role in DNA metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 51, 1998.

BORNEMAN, A.R., CHAMBERS, P.J., PRETORIUS, I.S. Yeast system biology: modeling the winemaker's art. **Elsevier Review**, v. 25, nº. 8, 2007.

BOWLER, C., SLOOTER, L., VANDENBRANDEN, S., DE RYCKE, R., BOTTERMAN, J., SYBESMA, C., VAN MONTAGUE, M., INZÉ, D. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediate by oxygen radicals in transgenic plants. **EMBO Journal**, v. 10, p. 1723-1732, 1991.

BRANZEI, D.; FOIANI, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2008.

BRARUCHA, N.; KUMAR, A. Yeast genomics and drug target identification. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 10, p. 618-634, 2007.

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

BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: SPI / Embrapa – CNPH, v. 2, p. 679-735, 1999.

BRASILEIRO, A.C.M.; LACORTE, C. *Agrobacterium*: um sistema natural de transferência de genes para plantas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, 2003.

BUSOV, V.B., BRUNNER, A.M., MEILAN, R., FILICHKIN, S., GANIO, L., GANDHI, S., STRAUSS, S.H. Genetic transformation: a powerful tool for dissection of adaptive traits in trees. **New Phytologist**, v. 167, p. 9-18, 2005.

CALLE, H., COOK, A.A., FERNANDO, S.Y. Histology of witches broom caused in cacao by *Crinipellis perniciosa*. **Phytopathology** v. 72, p. 1479–1481,1982.

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

CITOVSKY, V., KOZLOVSKY, S.V., LACROIX, B., ZALTSMAN, A., DAFNY-YELIN, M., VYAS, S., TOVKACH, A., TZIFIRA, T. Biologic system of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. **Cellular Microbiology**, v. 9, nº.1, p. 9-20, 2007.

DANGL, J.L. e JONES, J.D.G. Plant pathogens and integrated defense response to infection**. Nature**, v. 411, p. 826-833, 2001.

DELÚ FILHO, N.; CASCARDO, J.C.M.; FONTES, E.P.B. **Clonagem Molecular e Isolamento de Genes de Plantas**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPH, v. 2, 1999.

ESCOBAR, M.A., DANDEKAR, A.M. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. **Elsevier**, v. 8, nº. 8, 2003.

EVANS, H. C. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*) in Ecuador. I. The fungus. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 89, n. 2, p. 185-192, 1978.

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

FRIAS, G.A., PURDY, L.H., SCHMIDT, R.A. An inoculation method for evaluating resistance of cocoa to *Crinipellis perniciosa.* **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n.8, p. 787-791, 1995.

GELVIN, S.B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, nº.1, p. 16-37, 2003a.

GELVIN, S.B. Improving plant genetic engineering by manipulating the host. **Elsevier**, V. 21, Nº. 3, 2003b.

GIETZ, R.D., WOODS, R.A. Transformations of yeast by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Methods in Enzymology**, v. 350, p. 87-96, 2002.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science,** v. 274, nº.546, p. 563–547, 1996.

GRIFFITH, A. J. L., et al. **An Introduction to Genetic Analysis**. W. H. Freeman, 2004. 800p.

GRIFFITH, G.W. Witche's brooms and frosty pods. **Biologist**, v. 51, p. 71-75, 2004.

GRIFFITH, G.W., BRAVO-VELASQUEZ, E., WILSON, F.J., LEWIS, D.M., HEDGER, J.N. Autecology and evolution of the witches' broom pathogen (*Crinipellis perniciosa*) of cocoa. In: Blakeman, J.P., Williamson, B., eds. **The Ecology of Plant Pathogens**, CAB International, Wallingford, U.K., p. 245-265, 1994.

GUELFI, A. Resposta das enzimas antioxidantes em linhagens do fungo *Aspergillus* sp. na presença do metal pesado cádmio. 2001. 60p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2001.

HAKEM, R. DNA-damage repair: the good, the bad and the ugly. **The EMBO Journal**, v. 27, p. 589-605, 2008.

HEINTZMAN, N.D. e REN, B. The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome. **Cell. Mol. Sci**, v. 64, p. 386-400, 2007.

HOFMANN, G., McINTYRE, M., NIELSEN, J. Fungal genomics beyond Saccharomyces cerevisiae? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 226–231, 2003.

HARRINGTON, J.J. e LIEBER, M.R. **EMBO Journal**, v. 13, p. 1235-1246, 1994.

HARVEY, J.J.W., LINCOLN, J. E., GILCHRIST, D.G. Programed cell death suppression in transformed plant tissue by tomato cDNAs identified from an *Agrobacterium rhizogenes*- based functional screen. **Mol Genet Genomics**, 2008.

JANSEN, G., WU, C., SCHADE, B., THOMAS, D.Y., WHITEWAY, M. Drag & Drop cloning in yeast. **Elsevier**, v. 344, p. 43-51, 2005.

JOHNSON, R.E., GOPALA, K.K., PRAKASH, L., PRAKASH, S. Requirement of the yeast RTHH1 5' to 3' exonuclease for the stability of simple repetitive DNA. **Science**, v. 269, p. 238-240, 1995.

KEN, C., HSIUNG, T., HUANG, Z., JUANG, R., LIN, C. Characterization of Fe/Mn-Superoxide Dismutase from Diatom *Thallassiosira weissflogii*: Cloning, Expression, and Property. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, 2005

KIM, Y-H., KIM, C.Y., SONG, W-K., PARK, D-S., KWON, S-Y., LEE, H-S., BANG, J-W., KWAK, S-S. Overexpression of sweetpotato *swpa4* peroxidase results in increased hydrogen peroxide production and enhances stress tolerance in tobacco. **Planta**, v. 227, p. 867-881, 2008.

KIMURA, S., UEDA, T., HATANAKA, M., TAKENOUCHI, M., HASHIMOTO, J. Plant homologue of flpa endonuclease-1: molecular cloning, characterization, and evidence of expression in meristematic tissues. **Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 415-427, 2000.

LANDER, E. S., LINTON, L. M., BIRREN, B., NUSBAUM, C., ZODY, M. C., BALDWIN, J., DEVON, K., DEWAR, K, DOYLE, M., FITZHUGH, W., FUNKE, R., GAGE, D., HARRIS, K., HEADFORD, A., HOWLAND, J., KANN, L., LEHOCZKY, J., LeVINE, R., McKERNAN, K., MELDRIM, J., MESIROV, J. P., MIRANDA, C., MORRIS, W., NAYLOR, J., RAYMOND, C., ROSETTI, M., SANTOS, R., SHERIDAN, A., SOUGNEZ, C., STANGE-THOMANN, N., STOJANOVIC, N., SUBRAMANIAN, A., WYMAN, D., ROGERS, J., SULSTON, J., AINSCOUNGH, R., BECK, S., BENTLEY, D., BURTON, N., CHENG, J. F., OLSEN, A., LUCAS, S., ELKIN, C., UBERBACHER, E., FRZIER, M., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature,** v. 409, p. 860-921, 2001.

LANDRY, C.R., TOWNSEND, J.P., HARTL, D.L., CAVALIERI, D. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 575-591, 2006.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica.** 2ª ed. São Paulo: SARVIER, 1995.

LINDAHL, T., GALLY, J.A., EDELMAN, G.M. **Proc. Natl. Acad. Sci.** U.S.A. v. 62, p. 597-603, 1969.

LIU, R., QIU, J., FINGER, L.D., ZHENG, L., SHEN, B. The DNA–protein interaction modes of FEN-1 with gap substrates and their implication in preventing duplication mutations. **Nucleic Acids Research**, v. 34, nº. 6, p. 1772-1784, 2006.

MALNOY, M., REYNOIRD, J.P., BOREJSZA-WYSOCKA, E.E., ALDWINCKLE, H.S. Activation of the pathogen-inducible *Gst1* promoter of potato after elicitation by *Venturia inaequalis* and *Erwinia amylovora* in transgenic apple (*Malus* x *domestica*). **Transgenc research**, v. 15, p. 83-93, 2006.

MALNOY, M., VENISSE, J-S., REYNOIRD, J.P., CHEVREAU, E. Activation of three pathogen-inducible promoters of tobacco in transgenic pear (*Pyrus communis* L.) after abiotic and biotic elicitation. **Planta**, v. 216, p. 802-814, 2003.

MAYER, A.M., STAPLES, R.C., GIL-ad, N.L. Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. **Phytochemistry**, v. 58, p. 33-41, 2001.

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

MOSSERI, A.; HIRSH, E.; BRONSTEIN, Z. Analysis of Gene Expression Data. In: **Lecture 7,** 2005.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plant**, v. 15, p. 473-497, 1962.

MURRAY, J.M., TAVASSOLI, M., AL-HARITHY, R., SHELDRICK, K.S., LEHMANN, A.R., CARR, A.M., WATTS, F.S. Structural and functional conservation of the human homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* rad2 gene, which is required for chromosome segregation and recovery from DNA damage. **Mol. Cell. Biol.**, v. 14, p. 4878-4888, 1994.

NAGAE, M., NAKATA, M., TAKAHASHI, Y. Identification of negative *cis*-acting elements in response to copper in the chloroplastic iron superoxide dismutase gene of the moss *Barbula unguiculata.* **Plant Physiology Review**, 2008.

NOCTOR, G., VELJOVIC-JOVANOVIC, S., FOYER, C.H. Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling. **Phil.Trans. R. Soc. Lond. B**, v. 355, p. 1465-1475, 2000.

OKKEMA, P.G.; KRAUSE, M. Transcriptional regulation. **Wormbook**, 2005.

OSMOS, E., MARTINEZ-SOLANO, J.R., PIQUERAS, A., HELLIN, E. Early steps in the oxidative busty induced by cadmium in cultured tobacco cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, nº. 381, p. 291-301, 2003.

RESENDE, M.L.V., SALGADO, S.M.L. e CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira,** v. 28, p. 123-130, 2003.

RUYMGAART, A.P., HEATHER, S.J., OEHLERS JR., L.P., RAINS, J.D., WALTER, R.B. Characterization and purification of flap endonuclease-1 (xiFEN-1) from Xiphophorus maculates. **Zebrafish**, v. 1, nº.3, 2004.

ROGNON, B., KOZOVSKA, Z., COSTE, A.T., PARDINI, G., SANGLARD, D. Identification of promoter elements responsible for the regulation of MDR1 from Candida albicans, a major facilitator transporter involved in azole resistance. Microbilogy, v. 152, p. 3701-3722, 2006.

RUBINI, M.R., SILVA-RIBEIRO, R.T., POMELLA, A.W., MAKI, C.S., ARAÚJO, W.L., SANTOS, D.R., AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa,* causal agent of witches' broom disease. **Int. J. Biol. Sci.,** p. 24-33, 2005.

SAMBROOCK, J. FRISCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. N. Y., 1989.

SAWAHEL, W.A. Transgenic plants: performance, release and containment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.10, p. 139-144, 1992.

SASAKI K, IWAI T, HIRAGA S, KURODA K, SEO S, MITSUHARA I, MIYASAKA A, IWANO M, ITO H, MATSUI H, OHASHI Y. Ten rice peroxidases redundantly respond to multiple stresses including infection with rice blast fungus. **Plant Cell Physiol**, v. 45, p. 1442–1452, 2004.

SASAKI, K., YUICHI, O., HIRAGA, S., GOTOH, Y., SEO, S., MITSUHARA, I., ITO, H., MATSUI, H., OHASHI, Y. Characterization of two rice peroxidase promoters that respond to blast fungus-infection. **Mol Genet Genomics**, v. 278, p. 709–722, 2007.

SCHENK, P.M., KASAN, K., RUSU, A.G., MANNERS, J.M., MACLEAN, D.J. The *SEN1* gene of *Arabidopsis* is regulated by signals that link plant defence responses and senescence. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 997-1005, 2005.

SLATER A.; SCOTT, N.; FOWLER, M. **Plant Biotechnology: The genetic manipulation of plants**. OXFORD University Press, 2003.

TOONE, W.M.; JONES, N. AP-1 transcription factors in yeast. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 9, p. 55–61, 1999.

TSUKAMOTO, S., MORITA, S., HIRANO, E., YOKOI, H., MASUMURA, T., TANAKA, K. A novel cis-element that is responsive to oxidative stress regulates three antioxidant defense genes in rice. **Plant Physiology**, v. 137, p. 317-327, 2005.

TZFIRA, T., CITOVSKY, V. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. **Elsevier Review**, v. 12, nº.3, 2002.

VAN CAMP, INZÉ, D., VAN MONTAGUE, M. The regulation and function of tobacco superoxide dismutases. **Elsevier Science Inc**, v. 23, nº.3, p. 515-520, 1997.

VIDAL, R. O. **Identificação computacional de genes independente de espécie em genomas eucariotos**. 2006. 69p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-Ba, 2006.

VIDAL, R.O.; CASCARDO, J.C.M.; FRIAS, D. Finding gene promoters in the genome of the fungus *Crinipellis perniciosa* using feed-forward neural networks. In: **IEEE Signal Processing Society Workshop**, page(s): 423 – 432, 2004.

WATANABE, M., TAMURA, K., MAGBANUA, J.P., TAKANO, K., KITAMOTO, K., KITAGAKI, H., AKAO, T., SHIMOI, H. Elevated expression of genes under the control of stress response element (STRE) and Msn2p in an ethanol tolerance sake yeast kyokai nº. 11. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 104, nº. 3, p. 163-170, 2007.

ZAHA, A., *et al*. **Biologia Molecular Básica**. 3ª ed. Porto alegre: Editora Mercado Aberto, 2003.

ZHANG, H., ZHANG, D., CHEN, J., YANG, Y., HUANG, Z., HUANG, D., WANG, X-C., HU, R. Tomato stress-responsive factor TSRF1 interacts with ethylene responsive element GCC box and regulates pathogen resistance to *Ralstonia solanacearum*. **Plant Molecular Biology**, v. 55, p. 825-834, 2004.

ZHARKOV, D.O. Base excision DNA repair. **Cell. Mol. Life Sci.** Review, 2008.

ANEXOS

Anexo 1.

Tabela 1: Seqüência TATA-box de genes localizadas no banco de dados de promotores eucarióticos.

Fonte: VIDAL et al., 2004

Specie	Seq ID	TATA-box	length
Zea Mays	EP07003	TATATAAATA	10
Drosophila melanogaster	EP23022	TATAAATA	8
Homo sapiens	EP11070	TATATAAAA	9
Bos taurus	EP07103	TATAAA	6
Xenopus laevis	EP14029	TATATAAA	8
Arabidopsis thaliana	EP24016	TATAAA	6
Consensus	Consensus	TATA T/A AAA T/A A	10

Anexo 2.

Preparo e transformação por choque térmico de células competentes de *E. coli* (estirpe TOP10 - Invitrogen)

Células competentes de *E. coli* para transformação por choque térmico foram preparadas de acordo com Sambrook et al. (1989), sob condições assépticas. Para tanto, as células foram inoculadas em 2mL de meio LB broth líquido (Triptona 1%, NaCl 1% e extrato de levedura 0,5%) e incubadas a 37°C, 180rpm, durante 16 horas. A cultura foi então transferida para 100mL de meio LB broth líquido e incubada sob as mesmas condições por aproximadamente 4 horas, até atingir absorbância a 600ηm ($A_{600\ \eta m}$) entre 0,5 e 0,7. Em seguida, as células foram mantidas no gelo por 10 minutos e coletadas por centrifugação por 10 minutos a 5.000 x g, a 4°C e ressuspensas em 20mL de $MgCl_2$ (100mM) gelado e centrifugadas sob as mesmas condições descritas. As células foram ressuspensas em 50mL de $CaCl_2$ 100mM gelado, incubadas no gelo durante 20 minutos e coletadas por centrifugação por 5 minutos a 5.000 x g, a 4°C. As células foram então recuperadas em 10mL de $CaCl_2$ 100mM gelado e 1,5mL de glicerol 50% estéril e gelado. Alíquotas de 200μL foram distribuídas em microtubos (eppendorfs) de 1,5mL, congeladas em nitrogênio líquido (N_2 líquido) e armazenadas a -80°C.

A transformação das células competentes de TOP10 (Invitrogen) foi realizada adicionando aproximadamente 30ηg de DNA plasmidial em uma alíquota de células e mantendo-a no gelo durante 30 minutos. Em seguida foi aplicado o choque térmico a 42°C, por 1 minuto, e adicionado à suspensão 1mL de LB broth. A suspensão foi incubada a 37°C por uma hora e centrifugada por 30 segundos para a ressuspensão em 100μL de meio LB, sendo em seguida plaqueadas em placa de Petri contendo meio LB sólido, acrescido do antibiótico específico (de acordo com o vetor utilizado na transformação), para seleção das colônias transformantes. A placa foi incubada a 37°C, de 12 a 16 horas. O diagnóstico das colônias transformantes foi feito por meio de PCR e após a confirmação, uma colônia foi escolhida para estoque de glicerol 50%, em ultra freezer (-80°C).

Anexo 3.

Preparo e eletroporação de células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* (estirpe LBA 4404)

As células eletrocompetentes de *A. tumefaciens* foram preparadas de acordo com o protocolo do eletroporador Gene Pulser (Bio-Rad), com modificações. Para isso, as células foram inoculadas em 150mL de meio Rhizo (extrato de levedura 5%, caseína 0,5%, manitol 8%, $(NH_4)_2SO_4$ 2%, NaCl 5%, pH 6,6) acrescido de estreptomicina (100mg.L^{-1}) e incubadas a 28°C, a 220rpm, até atingir absorbância a 600ηm ($A_{600\eta m}$) entre 0,5 e 0,7. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 3000 x g, durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram concentradas em 5mL de glicerol 10%, estéril e gelado e uma nova centrifugação foi realizada de acordo com as condições citadas. Feito isto, as células foram ressuspendidas em 500μL de glicerol 10% e submetidas à centrifugação por 5 minutos a 3000 x g, a 4°C, sendo a seguir cuidadosamente ressuspendidas em 500μL de sorbitol 1M, estéril e gelado. Alíquotas de 20μL foram distribuídas em tubos de 0,5mL, congeladas em N_2 líquido e estocadas a -80°C.

A transformação de *A. tumefaciens* foi realizada por eletroporação, seguindo protocolo do eletroporador Gene Pulser (Bio-Rad). Inicialmente, 50ηg de DNA plasmidial foram adicionados às células previamente degeladas e transferidas para cuveta de 0,2cm, incubada por um minuto no gelo. Procedeu-se com a eletroporação utilizando o programa de nº. 4 (2.500V, 4 a 5msec), (específico para *Agrobacterium*) do eletroporador, retornando a cuveta ao gelo após o pulso. Um mililitro de meio Rhizo sem antibiótico foi adicionado à mistura e esta foi transferida para microtubo de 1,5mL, sendo incubado a 28°C, por 2 horas. Após o tempo de incubação, as células foram recuperadas por centrifugação por 30 segundos a 13.000rpm e concentradas em 10μL de meio Rhizo. A cultura foi então plaqueada em placa de Petri contendo meio Rhizo acrescido de estreptomicina (100mg.L^{-1}) e do antibiótico de seleção de acordo com o vetor utilizado. O diagnóstico da transformação foi feito mediante PCR diretamente da colônia; confirmadas as colônias transformantes, foi feito estoque em freezer -80°C, com glicerol 50%.

Anexo 4.

Extração de DNA plasmidial de *E. coli* e *A. tumefaciens*

DNA plasmidial de colônias isoladas foi extraído empregando-se Kit Flexiprep (Amersham Biosciences) a fim de confirmar a transformação das células. As colônias de *E. coli* foram inoculadas em 2mL de meio LB broth acrescido do antibiótico específico, crescidas a 37°C, sob agitação, por 16 horas e as células foram recuperadas por centrifugação a 13.000 x g, por 30 segundos (para *A. tumefaciens*, as colônias foram crescidas em meio Rhizo contendo estreptomicina 100mg.L-^{1}, além do antibiótico de seleção do vetor, e incubadas a 28°C, sob agitação por 16 horas).

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 200μL da solução I (glicose 50mM, Tris-HCl 25mM, pH 8,0 e EDTA 10mM, pH 8,0) foram utilizados para ressuspender as células. Para a lise alcalina das células, 200μL da solução II (NaOH 0,2N e SDS 1%) foram adicionados, invertendo os tubos por algumas vezes, e posteriormente, 200μL da solução III (CH_3COOK 3M) foram adicionados às células. A mistura foi então centrifugada a 13.000rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para outro microtubo e foi adicionado 0,7 x volume de isopropanol (álcool isopropílico), deixando incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Após isto, o DNA plasmidial foi recuperado por centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos e ao *pellet* foi adicionado Sephaglas FP. A mistura foi novamente centrifugada a 13.000rpm por 15 segundos e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi lavado com 200μL de wash buffer e centrifugado a 13.000 x g por 15 segundos. Trezentos microlitros de etanol 70% foram adicionados e após centrifugação sob a mesma condição anteriormente citada, o DNA foi seco à temperatura ambiente por 10 minutos e eluído em 50μL de água milli-Q autoclavada.