

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

MESTRADO: GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BATATA (*SOLANUM
TUBEROSUM*), COM GENE CODIFICADOR DO PEPTÍDEO
ANTIMICROBIANO Pg-AMP1**

MELVIS CELESTE VILANCULOS COSSA

JUIZ DE FORA

2013

MELVIS CELESTE VILANCULOS COSSA

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BATATA (*Solanum tuberosum*),
COM GENE CODIFICADOR DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO Pg-
AMP1**

Orientador: Professor Doutor Marcelo de Oliveira Santos

Juiz de Fora

2013

MELVIS CELESTE VILANCULOS COSSA

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BATATA (*Solanum tuberosum*),
COM GENE CODIFICADOR DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO Pg-
AMP1**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - área de Genética e Biotecnologia – da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Aprovado em

BANCA EXAMINADORA

Professor Doutor Marcelo de Oliveira Santos
Universidade Federal de Juiz de Fora - Orientador

Professora Doutora Eveline Gomes Vasconcelos
Universidade Federal de Juiz de Fora

Professor Doutor Wagner Campos Ottoni
Universidade Federal de Viçosa
Juiz de Fora

2013

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar a **Deus**, que graças a Ele eu existo, aos meus pais **José Cossa** e **Cesaltina Vilanculos**, que me geraram e deram vida, sem esquecer da grande lição que transmitiram e continuam transmitindo até ao dia de hoje: *“aprender lições é uma tarefa sem fim, não há parte da vida que não tenha lições, se estás viva há lições a serem aprendidas e ensinadas, por isso filha, faça da escola uma boa enxada para a vida”*

À minha filha **Lana Kyanga**, razão do meu viver, ao meu marido Tony, aos meus irmãos Mauro e Júnior pelo amor, carinho, amizade e pelos sacrifícios concedidos durante o tempo que lhes faltei. À minha tia Nanda pelo incansável apoio.

AGRADECIMENTOS

O meu profundo apreço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do presente trabalho e a conclusão do curso fosse possível especialmente:

Ao Professor Dr. Marcelo pela orientação científica e profissional, pela dedicação, paciência, amizade e pela forma sábia como me conduziu em todo trabalho;

A UFJF em particular ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade de fazer parte do programa;

Aos Professores Lyderson, José Marcello e Carlos pelo constante encorajamento, incentivo e boa vontade em ajudar.

Ao Dr. Saulo pelas imprescindíveis contribuições e auxílio.

À mestre Letícia pelo exemplo, ajuda e vastos ensinamentos transmitidos.

À Natália, Joyce, Danielle e Vinícius sem os quais eu não teria alcançado esta vitória, pela companhia e ajuda nos imensos trabalhos e dias passados no laboratório e pelas discussões tão engrandecedoras.

Aos colegas do laboratório Renata, Shaiany, Camila, Aryane, Leonardo, e Thalita pela paciência em dividir o espaço tão disputado, pela convivência e ajuda constante.

Aos meus colegas, amigos e companheiros de Batalha nesta jornada longe da família e de casa Frederico Madabula e Rosalina Chavana pelos momentos de alegria e dificuldades compartilhados.

À minha mais que tudo amiga, irmã, companheira, Ercília Zimba por participar de todos meus momentos de tristeza e desânimo, pela força e incentivo em não desistir dos meus objetivos e lutar pelos meus ideais e sonhos.

A todos os amigos, que de perto ou de longe, torceram e acreditaram em minha vitória.

O meu eterno Khamambo!

RESUMO

A batata uma essencial “comida para todos”, é hoje uma das mais importantes culturas alimentares e constitui a quarta cultura mais importante do mundo, sendo também fonte de segurança alimentar. Todavia, muitas doenças causadas por vírus, bactérias e fungos afetam a cultura desta planta, resultando em perdas e diminuição da qualidade e segurança dos produtos agrícolas. O controle de doenças nas plantas baseia-se principalmente de pesticidas químicos que estão atualmente sujeitos a fortes restrições e requisitos regulamentares. Nesse sentido, vários peptídeos antimicrobianos têm sido a base para a concepção de novos análogos sintéticos e têm sido expressos em plantas transgênicas para conferir proteção a doenças. O desenvolvimento de plantas transgênicas, contendo um gene que sintetiza um peptídeo antibacteriano, tem sido uma das formas estudadas para se controlar doenças bacterianas. No presente estudo, plantas de batata (*Solanum tuberosum*), cultivar Asterix, foram transformadas com genes codificadores do peptídeo Pg-AMP1 de *Psidium guajava*, com objetivo de promover resistência a bactérias que afetam a cultura da batata, nomeadamente *Pectobacterium atrosepticum* e *Pectobacterium carotovorum*. Experimentos de transformação genética mediada por *Agrobacterium* permitiram a obtenção de 13 linhagens transgênicas de *Solanum tuberosum* Pg-AMP1, representando eventos independentes de transformação. Paralelamente aos experimentos de transformação genética, foram realizados bioensaios *in vitro* com o peptídeo recombinante purificado Pg-AMP1 contra as cepas bacterianas *P. atrosepticum* e *P. carotovorum* e bioensaio *in vivo* em folhas de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transformada com o peptídeo com as mesmas cepas bacterianas. No que se refere à resistência das folhas contra o ataque das bactérias *P. atrosepticum* e *P. carotovorum*, as linhagens transformadas de tabaco Pg-AMP1 apresentaram sintomas de necrose menos severos comparativamente as não transgênicas. Do mesmo modo o peptídeo Pg-AMP₁ apresentou atividade bactericida contra as cepas bacterianas *P. atrosepticum* e *P. carotovorum*. Assim sendo, estes resultados sugerem a viabilidade do peptídeo Pg-AMP1 na utilização de transformações genéticas de *Solanum tuberosum* visando resistência a bactérias patogênicas que afetam a cultura.

Palavras chave: *Solanum tuberosum*, Transformação genética, Pg-AMP1, Resistência.

ABSTRACT

Potato, known as essential "food for all", is one of the most important food crops in nowadays. It is the fourth most important crop in the world and is also a source for food security. However, many diseases caused by viruses, bacteria and fungi affect plant cultivation, resulting in losses and decrease the quality and safety of agricultural products. The control of plant diseases is mainly based on chemical pesticides that are currently subject to severe restrictions and regulatory requirements. Accordingly, various antimicrobial peptides have being the basis for new synthetic analogs designing and have been expressed in transgenic plants to confer disease protection. The development of transgenic plants containing a gene that synthesizes an antibacterial peptide, has been has been used to bacterial diseases control. In this study, potato plants (*Solanum tuberosum*) Asterix, were transformed with genes encoding the peptide Pg-AMP1 from *Psidium guajava* aiming to produce resistant plants to *Pectobacterium atrosepticum* and *Pectobacterium carotovorum*. Experiments of genetic transformation by *Agrobacterium* - mediated allowed 13 different events of transgenic *Solanum tuberosum* Pg-AMP1, representing different transformation events. In parallel to genetic transformation experiments *in vitro* bioassay with recombinant peptide purified Pg-AMP₁ was performed. Bacterial strains *P. atrosepticum* and *P. carotovorum* were evaluated and *in vivo* in Tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves from transformed plants containing the peptide. In resistance assay against *P. atrosepticum* and *P. carotovorum* in tobacco plants showed less severe symptoms compared to non-transgenic. Likewise the Pg-AMP1 peptide showed bactericidal activity against bacterial strains *P. atrosepticum* and *P. carotovorum*. Thus, these results suggest the feasibility of the peptide Pg-AMP1 the use of genetic transformation of *Solanum tuberosum* for resistance to pathogenic bacteria that affect the crop.

Keywords: *Solanum tuberosum*, genetic transformation, Pg-AMP1, Resistance.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Classificação de peptídeos antimicrobianos com base na composição de resíduos de aminoácidos, tamanho e estruturas conformacionais. 22
- Figura 2 - Mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos. A- Modelo Carpete, B- Modelo Toroidal, C- M. Barrel stave. 23
- Figura 3 - Esquema de transformação genética de plantas. 27
- Figura 4 - Processo de co-cultura líquida via *Agrobacterium* e processo de regeneração e seleção *in vitro* de explantes. 28
- Figura 5 - Construção final do vetor de Transformação pK7GW2D – PgAMP1 38
- Figura 6 - Resultado dos bioensaios *in vitro* da atividade antimicrobiana de Pg-AMP1 contra *Pectobacterium atrosepticum* e *Pectobacterium carotovorum*. 43
- Figura 7 - Efeito da bactéria em folhas de plantas não transgênicas e transgênicas de *N. tabacum*. Foto capturada após 24 horas de inoculação de 10 µl de suspensão bacteriana de *P. carotovorum* (C- planta não transgênica). 45
- Figura 8 - Efeito da bactéria em folhas de plantas não transgênicas e transgênicas de *N. tabacum*. Foto capturada após 40 horas de inoculação de 10µl de suspensão bacteriana de *P. carotovorum* (C- planta não transgênica). 45
- Figura 9 - Curva do progresso da doença das linhagens transgênicas de tabaco Pg-AMP1 e do controle (planta não transformada) após a incubação com o patógeno *P. carotovorum*. 46
- Figura 10 - Diagnóstico de integração do T-DNA em plantas de batata via PCR utilizando oligonucleotídeos para o gene *hptII*. M: marcador de peso molecular 1Kb ladder (Promega®); P1-P8: plantas transformadas, com exceção da P6. 47
- Figura 11 - Processo de regeneração e seleção *in vitro* de explantes de batata após cocultura líquida com *Agrobacterium*. A: Explantes após dois dias de co cultura sólida; B: Brotos emergindo duas semanas após o cultivo *in vitro* em meio seletivo. 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos meios de cultura usados para regeneração de brotos de batata cultivar Asterix, série 1	40
Tabela 2- Composição dos meios de cultura usados para regeneração de brotos de batata cultivar Asterix, série 2.	41
Tabela 3 - Composição dos meios de cultura usados para regeneração de brotos de batata cultivar Asterix, série 3.	41
Tabela 4 - Percentual de regeneração de brotos a partir de entrenós, em meio seletivo com 25 mg/L de Canamicina	48
Tabela 5 - Percentual de regeneração de brotos a partir de entrenós, em meio seletivo com 100 mg/L de Canamicina	49
Tabela 6 - Percentual de regeneração de brotos a partir de entrenós, em meio seletivo com 50 mg/L de Canamicina	49
Tabela 7 - Percentual de regeneração de explantes a partir de mini tubérculo, em meio seletivo com 25 mg/L de Canamicina	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA	Ácido Indol Acético
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
AUDPC	Área sob a curva de progresso da doença
BAP	6 - benzilaminopurina
BSA	Soro de albumina bovina
cDNA	DNA codificador
CTAB	Brometo de Cetil Trimetil Amônio
CFU	Unidade formadora de colônia
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
GA3	Ácido Giberélico
GRP	Proteínas Ricas em Glicina
GFP	Green Fluorescent Protein
Kb	Unidade de milhare(s) de pare(s) de base (s)
kDa	Kilodalton
LB	Meio de Cultura <i>Lysogny broth</i>
mg	Miligrama
µg	Micrograma
ml	Mililitro
µl	Microlitro

mM	Milimolar
μ M	Micromolar
μ m	Micrômetro
MS	Meio de cultura Murashige e Skoog
OD	Densidade ótica
Pg-AMP ₁	<i>Psidium guajava</i> peptídeo antimicrobiano1
PCR	Reação em cadeia da enzima DNA polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel
TDZ	Thidiazuron

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1.	TRANSFORMAÇÃO GENICA E EXPRESSÃO HETEROLOGA	18
2.2.	PEPTIDEOS ANTIMICROBIANOS	19
2.2.1.	CLASSIFICAÇÃO DE PEPTIDEOS ANTIMICROBIANOS	22
2.2.2.	MECANISMO DE AÇÃO DOS PEPTIDEOS ANTIMICROBIANOS	23
2.3.	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS	24
2.3.1.	MÉTODS DE TRANSFORMAÇÃO GENETICA DE PLANTAS	25
2.3.2.	METODO INDIRETO DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS VIA AGROBACTERIUM	26
2.3.3.	MÉTODOS DIRETOS DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS	28
2.4	A CULTURA DA BATATA (<i>Solanum tuberosum</i>)	29
2.4.1.	BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS DA CULTURA DA BATATA	31
3.	OBJETIVOS	35
3.1.	OBJETIVO GERAL	35
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1.	BIOENSAIOS COM PEPTÍDEO PG-AMP1 PURIFICADO CONTRA CEPAS DE BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS	36
4.2.	BIOENSAIOS IN VIVO COM PLANTAS DE FUMO	37
4.3.	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BATATA	37
4.3.1	– CONSTRUÇÃO DO VETOR DE TRANSFORMAÇÃO	37

4.3.2. CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CULTIVARES DE BATATA	39
4.3.3. AGROBACTERIUM E CONDIÇÕES DE CULTURA	39
4.3.4. INFECÇÃO, COCULTIVO, SELEÇÃO E REGENERAÇÃO DE BATATA	40
4.3.5. EXTRAÇÃO DE DNA E REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)	42
5. RESULTADOS	44
5.1. BIOENSAIOS COM CEPAS DE BACTÉRIAS	44
5.2. BIOENSAIOS IN VIVO COM PLANTAS DE FUMO	45
5.3. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS DE BATATA	47
6. DISCUSSÃO	52
6.1. BIOENSAIOS COM CEPAS DE BACTÉRIAS	52
6.2. BIOENSAIOS IN VITRO COM PLANTAS DE FUMO	53
6.3. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS DE BATATA	55
7. CONCLUSÕES	57
8. PERSPECTIVAS	58
9 – BIBLIOGRAFIA	59

1. INTRODUÇÃO

Por muitos anos, o único método disponível para a introdução de características de interesse em plantas foi o melhoramento clássico, envolvendo cruzamentos, seguidos pela seleção de plantas com fenótipo desejável. Porém, esse processo é lento, necessitando vários anos para produzir e liberar comercialmente uma nova variedade (Santarém, 2000).

A Engenharia Genética tem aperfeiçoado técnicas cada vez mais eficientes nos últimos anos, possibilitando a clonagem de genes codificadores de proteínas recombinantes em células hospedeiras procarióticas e eucarióticas (Kovalskaya & Hammond, 2009), propiciando assim uma maior variedade de genes para introdução em outras espécies.

A Engenharia Genética de plantas pode acelerar o processo de melhoramento, como também permite transpor as barreiras de incompatibilidade sexual através da hibridização somática ou da introdução de genes específicos em células vegetais, utilizando os métodos de transformação (Santarém, 2000).

A transformação genética baseia-se na transferência de material genético (DNA) para uma célula vegetal-alvo. Desta forma que o DNA de interesse é incorporado e expresso de forma estável no genoma vegetal. A posterior regeneração *in vitro* dessa célula, inicialmente transformada, irá gerar uma planta transgênica contendo o gene de interesse (Santarém, 2000; Guimarães et al, 2003). Assim, a transformação genética é uma técnica que pode auxiliar em programas de melhoramento genético pela introdução de uma nova característica ou a alteração de uma preexistente, em cultivares ou genótipos elite, sem modificar a estrutura genética global da planta (Guimarães et al, 2003).

Plantas transgênicas são também importantes ferramentas para estudos moleculares de função e expressão de genes, de processos fisiológicos e de desenvolvimento vegetal (Guimarães et al, 2003).

A eficiência do método de transformação vai depender da espécie em estudo, do tecido utilizado como alvo e da metodologia empregada. O fumo (*Nicotiana*

tabacum) é uma espécie muito utilizada como modelo em transformação genética de plantas, devido à facilidade de transformação e avaliação da expressão dos genes inseridos (Santos et al, 2011).

Originária da América do Sul, a batata (*Solanum tuberosum* L.) já era consumida por populações nativas há mais de 10.000 anos (Engel, 1970). É uma planta anual, herbácea, eudicotiledônea e propagada principalmente de forma vegetativa (Sarkar, 2008).

A batata uma essencial “comida para todos”, é hoje uma das mais importantes culturas alimentares e constitui a quarta cultura mais importante do mundo, sendo também fonte de segurança alimentar. Desta forma a batata é um alvo importante para o melhoramento genético, através de abordagens clássicas e biotecnológicas (Rakosy-Tican et al, 2010).

No Brasil, a batata é considerada a principal hortaliça, tanto em área cultivada como em preferência alimentar. A área plantada aproxima-se a 135 mil hectares, com cerca de três milhões de toneladas produzidas em 2010, sendo os estados da Região Sul e Sudeste os principais produtores e o estado de Minas Gerais o maior produtor com 1 milhão de toneladas (AGRIANUAL, 2011).

Todavia, muitas doenças causadas por vírus, bactérias e fungos afetam a cultura de plantas, resultando em perdas e diminuição da qualidade e segurança dos produtos agrícolas. O controle de doenças nas plantas baseia-se principalmente de pesticidas químicos que estão atualmente sujeitos a fortes restrições e requisitos regulamentares (Montesinos, 2007).

Fitopatógenos tem sido responsáveis pela enorme quantidade de perda de culturas, podendo ser minimizada por uma efetiva e eficiente manipulação tecnológica para aumentar a resistência a doenças nas plantas.

A Engenharia Genética surge como alternativa que vem sendo empregada no desenvolvimento de culturas resistentes á doenças (Ganapathi et al, 2007). Esta tecnologia apresenta-se como complementar ao melhoramento clássico de culturas

tradicionais, pois acelera o desenvolvimento de novas variedades de plantas resistentes a doenças, pragas e estresses ambientais (Molla et al; 2012).

Peptídeos antimicrobianos por estarem relacionados a mecanismos de resistência inata apresentam-se como compostos promissores para o desenvolvimento de novos produtos para a proteção das plantas. Vários peptídeos antimicrobianos são a base para a concepção de novos análogos sintéticos e têm sido expressos em plantas transgênicas para conferir proteção a doenças (Montesinos, 2007). O desenvolvimento de plantas transgênicas, contendo um gene exógeno que codifica para um peptídeo antibacteriano, tem sido uma das formas estudadas para se controlar doenças bacterianas (Neto, 2005; Pinto, 2012).

A presente pesquisa tem como objetivo a produção de linhagens transgênicas de batata (*Solanum tuberosum*) com a sequência codificadora do peptídeo antimicrobiano Pg-AMP₁ isolado de goiaba (*Psidium guajava*), visando obter resistência a bactérias fitopatogênicas que atacam a cultivar Asterix, nomeadamente *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum subsp. Carotovorum*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. TRANSFORMAÇÃO GÊNICA E EXPRESSÃO HETERÓLOGA

Bactérias e fungos fitopatogênicos causam perdas significativas nas culturas agrícolas e são a causa primária de doenças pós-colheitas de vegetais e frutos, chegando a registrar perdas em torno de 10 a 30% por ano, apesar do uso de técnicas modernas de armazenamento (Kovalskaya & Hammond, 2009). Existem algumas formas de contornar este problema, que vão desde aplicação de produtos químicos, controle biológico, indução das defesas naturais da planta até a biotecnologia agrícola. Recentemente o uso de peptídeos antimicrobianos, naturalmente produzidos por uma variedade de seres vivos, tem sido utilizados na engenharia genética para a proteção de culturas vegetais (Kovalskaya & Hammond, 2009).

A diminuição da susceptibilidade de infecção ao patógeno como resultado de produção transgênica de agentes antimicrobianos em plantas, já foi reportada em tioninas, defensinas, proteínas de transferência lipídicas (LTPs), entre outras e já foram isoladas de plantas como *Arabidopsis thaliana* e *Solanum tuberosum* (Kovalskaya et al, 2012).

É importante que as proteínas heterólogas, após serem purificadas, sejam testadas contra uma grande variedade de microrganismos fitopatogênicos *in vitro* antes de serem testadas em experimentos com plantas transgênicas. A purificação de peptídeos de fontes vegetais requer grande quantidade de material vegetal além de ser dispendiosa, de consumo excessivo de tempo. Desta maneira extrair peptídeos antimicrobianos de plantas transgênicas para testes *in vitro* é bastante difícil devido a pequena quantidade de tecido vegetal como uma fonte biológica de material (kovalskaya & Hammond, 2009). Desta forma, para caracterizar as propriedades antimicrobianas de peptídeos tem sido feitos testes *in vitro* contra uma vasta gama de fungos e bactérias fitopatogênicas como *Erwinia chrysanthemi*, *Ralstonia solanacearum*, *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Bipolaris maydis*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis maydis*, *Fusarium*

solani, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, entre outras (Kovalskaya & Hammond, 2009). *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Nicotiana benthamiana* e *Nicotiana tabacum* são frequentemente utilizadas para transformação genética visando a expressão e purificação de proteínas antimicrobiais recombinantes, para subseqüente experimentos *in vitro* e para estudos das propriedades antimicrobiais dessas mesmas proteínas *in vivo* (Kovalskaya & Hammond, 2009).

A expressão de proteínas em procariotos tem sido o método mais frequente de produção de proteínas recombinantes, pois satisfaz todos os critérios acima citados, como o fato de ser menos dispendioso, facilidade de expressão proteica devido a sua relativa simplicidade bacteriana, além de permitir a realização de cultivo de altas densidades durante um período de tempo relativamente curto (Kovalskaya et al, 2012). A *Escherichia coli* é um dos principais sistemas utilizados para a produção de peptídeos antimicrobianos recombinantes, sendo responsável pela produção dos mesmos em cerca de 80% (Fan et al, 2010). Todavia, a expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* frequentemente resulta na acúmulo de proteínas alvo em forma de agregados insolúveis, chamados de corpos de inclusão. Corpos de inclusão, geralmente consistem de agregados de proteínas quase puras, mas que devido a um erro no dobramento proteico apresentam-se biologicamente inativas (Kovalskaya et al, 2012).

Uma vez identificada à sequência gênica de interesse, vários métodos de biologia molecular são usados para a clonagem e construção do vetor de expressão do gene em estudo. Após os vetores serem produzidos são usados para expressar o gene de interesse, em geral são inseridos nas células hospedeiras por técnicas de transformação genética, como choque térmico, eletroporação ou biobalística (Tavares, 2009).

2.2. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

As plantas encontram – se continuamente sendo expostas a um grande número de organismos patogênicos. Elas têm desenvolvido ao longo da evolução

diversos mecanismos de defesas incluindo a síntese de componentes com baixo peso molecular, proteínas e peptídeos com atividades antifúngicas e antibacterianas (Pelegri et al, 2008).

Em plantas as barreiras superficiais constituem o primeiro obstáculo para a penetração de patógenos, apresentando mecanismos constitutivos e induzíveis contra ataque de patógenos (Benko-Iseppon et al, 2010). O mecanismo de defesa constitutivo inclui vias de sinalização interna, espessamento da parede celular, apoptose da área infectada e a produção de diferentes compostos antimicrobianos, como compostos fenólicos, metabólitos secundários, peptídeos ricos em glicina (Tavares et al, 2008).

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são considerados componentes essenciais do sistema imune inato, uma vez que geralmente atuam como a primeira linha de defesa contra patógenos. Eles têm sido isolados a partir de uma grande variedade de organismos, mostrando uma ampla variedade de seqüências, propriedades físico-químicas e estruturas (Parachin et al, 2012). Uma das características que torna os AMPs compostos antimicrobianos atrativos para o controle de doenças em plantas é o seu mecanismo de ação contra os microrganismos. Este consiste na interação e perturbação da membrana celular do patógeno através de uma interação mediada por receptores e a posterior inserção no citoplasma do microrganismo (Benko-Iseppon et al, 2010).

O mecanismo de ação dos AMPs consiste na permeabilização das membranas através da formação de poros discretos ou por ruptura da camada dupla da membrana, resultando em vazamento de célula e, conseqüentemente, na morte celular (Montesinos, 2007). No entanto, alguns estudos demonstraram que a permeabilização da membrana não é o único mecanismo de erradicação microbiana. Várias observações sugerem que os peptídeos são translocados para célula alvo e podem inibir a síntese de ácidos nucléicos, proteínas e componentes da parede celular, além de serem capazes de inibir as atividades enzimáticas essenciais (Parachin et al, 2012).

O Pg-AMP1 (*Psidium guajava* Antimicrobial Peptide 1) foi identificado por Pelegrini *et al.* (2008) em sementes de goiaba, pertence ao terceiro grupo de GRPs (Glicine Rich Proteins) por apresentar grandes quantidades de resíduos de glicina, sem formar domínios ricos em glicina (Pelegrini, 2007; Tavares, 2009).

Proteínas Ricas em Glicina (GRPs) constituem um grupo novo de moléculas de defesa das plantas com atividade contra bactérias (Mangeon *et al.*, 2010). Estudos anteriores relataram que os genes de GRPs com função de defesa são, em sua maioria, encontrados em tecidos vasculares, especialmente xilema; no entanto foi também observado em hipocótilos, caule e pecíolos (Pelegrini, 2007; Mangeon *et al.*, 2010). GRPs podem ser caracterizadas pela sua alta porcentagem de resíduos de glicina na sua sequência primária variando de um organismo para outro (Pelegrini *et al.*, 2008).

GRPs podem ser classificadas em três diferentes grupos, de acordo com o conteúdo de glicina. O primeiro grupo contém proteínas que possuem mais de 70% de resíduos de glicina na sua estrutura primária, além de apresentarem domínios conservados denominados motivos de reconhecimento de RNA (RRMs) (Pelegrini *et al.*, 2008; Mangeon *et al.*, 2010). GRPs com poucos resíduos de glicina pertencem ao segundo grupo. O terceiro grupo de GRPs inclui proteínas com aumento do teor global de glicina, sem a presença de domínios ricos de glicina (Pelegrini *et al.*, 2008)

A expressão das GRPs em plantas é modulada por diversos fatores, podendo ser induzidas por fatores biológicos, físicos e químicos. Dentre os moduladores químicos estão os hormônios como auxinas e o ácido abscísico. Os fatores biológicos que interferem na expressão dos GRPs são principalmente causados pela exposição aos fitopatógenos (Tavares, 2009).

O modo de ação das proteínas ricas em glicina ainda não é totalmente conhecido. Poucos trabalhos demonstram que semelhante a outras proteínas antimicrobianas, as GRPs tenha ação contra fungos, bactérias e vírus. Pelegrini *et al.* (2008) demonstrou que o peptídeo Pg-AMP₁, do grupo das GRPs, apresenta atividade contra bactérias Gram negativas patogênicas de humanos.

2.2.1. CLASSIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

A diversidade dos AMPs é tão grande que torna difícil distingui-los exceto com base na sua estrutura secundária. AMPs são geralmente definidos como peptídeos com menos de 100 resíduos de aminoácidos com uma carga global positiva (geralmente +2 a +9), conferida pela presença múltipla de resíduos de lisina e arginina e uma porção substancial ($\geq 30\%$ ou mais) de resíduos hidrofóbicos. De acordo com o banco de dados APD (*The Antimicrobial Peptide Database*) até a presente data, março de 2013, são conhecidos 183 bacteriocinas (AMPs de origem bacteriana), 292 AMPs de origem vegetal e 1652 peptídeos de defesa de origem animal (Wang & Wang, 2009).

Basicamente os peptídeos são classificados com base na composição de resíduos de aminoácidos, tamanho e estruturas conformacionais (Yuping & Gallo, 2009). São classificados em: (a) peptídeos lineares que formam hélices em contacto com a água, (b) peptídeos com estrutura de folha- β estabilizada por pontes dissulfeto e (c) estrutura linear, (d) estrutura de laço (Figura 1).

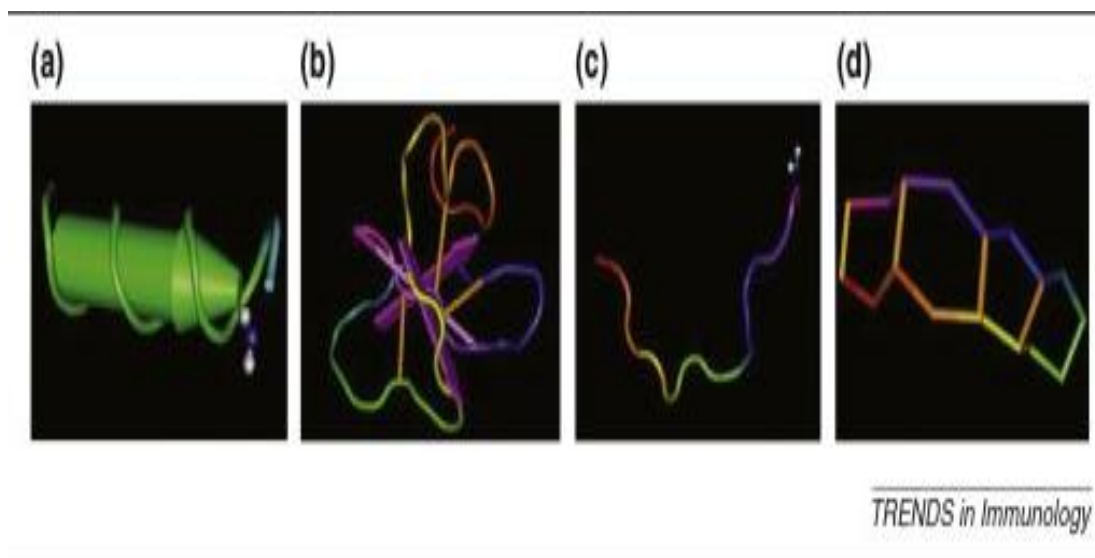


Figura 1 - Classificação de peptídeos antimicrobianos com base na composição de resíduos de aminoácidos, tamanho e estruturas conformacionais, de acordo com Lai & Gallo 2009. Fonte Yuping & Gallo, 2009.

2.2.2. MECANISMO DE AÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Os mecanismos de ação destas proteínas antimicrobianas são variados, podendo as mesmas atuar na degradação de polímeros, na formação de canais e poros de membrana, na destruição de ribossomos celulares, na inibição de síntese de DNA e na inibição do ciclo celular (Pelegri, 2007).

Os mecanismos de ação dos AMPs mais aceitos são aqueles que preconizam a alteração da permeabilidade das membranas biológicas (Almeida, 2007). O mecanismo molecular de permeio e rompimento da membrana dos AMPs depende de vasto número de parâmetros como sequência de aminoácidos, lipídios na membrana e concentração de peptídeos (Figura 2).

Vários estudos têm mostrado que todos AMPs interagem com as membranas e tendem a dividir os peptídeos em duas classes de mecanismos:

- a) Destruidores de membrana (barrel stave, toroidal, carpete e modelo de agregados micelares);

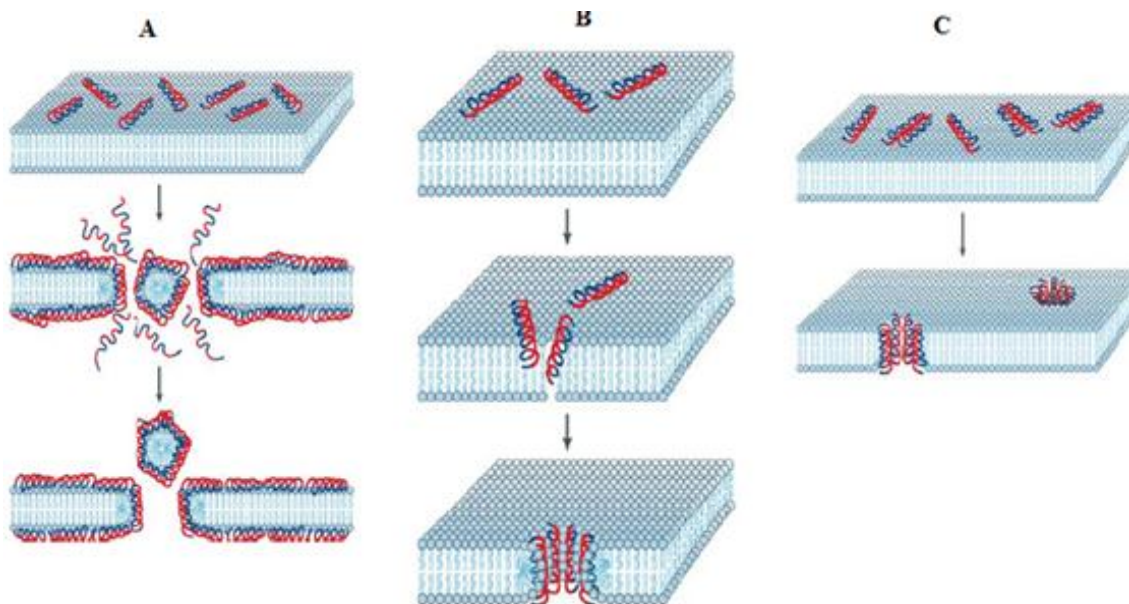


Figura 2 - Mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos. A- Modelo Carpete, B- Modelo Toroidal, C- M. Barrel stave . Fonte: (Brodgen, 2005)

- b) Não destruidores de membranas (alvos intracelulares)- neste mecanismo as moléculas dos AMPs podem passar ou dissociarem-se a partir da membrana, ligar-se a alvos intracelulares como DNA e RNA ou ainda inibir outros alvos intracelulares.

De acordo com Benko-Iseppon (2010), grandes taxas de expressão de alguns peptídeos de origem exógena em plantas transgênicas promoveu aumento na tolerância das plantas aos patógenos. Patógenos mutantes sensíveis aos peptídeos apresentam virulência significativamente menor nos tecidos em que os peptídeos antimicrobianos foram expressos (Benko-Iseppon et al, 2010).

2.3. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS

A transformação genética é o processo de introdução controlada de ácidos nucléicos exógenos em um genoma receptor, sem comprometer a viabilidade das células (Guimarães et al, 2003). Com os avanços da tecnologia de DNA recombinante, é possível transferir para plantas genes isolados de outras plantas, ou mesmo de animais e microrganismos, permitindo a criação de novas variedades que podem ser usadas em programas de melhoramento convencional (Bard et al, 2008).

Atualmente, diversos genes foram introduzidos estavelmente em plantas, conferindo resistência a herbicidas, fungos, bactérias, vírus e insetos, além da resistência a estresses ambientais (Guimarães et al, 2003; Bard et al, 2008; Arif et al, 2009). Ganapathi et al (2007) observaram a resistência ao fungo *Aspergillus niger* em plantas de batata transformadas com MSI-99 um peptídeo sintético análogo ao peptídeo antimicrobiano Magainina. O peptídeo antimicrobiano alfAFP, pertencente a grupo das defensinas, extraído de *Medicago sativa* mostrou significativa resistência ao fungo *Verticillium dahliae* em plantas transgênicas de batata em testes realizados em casa de vegetação. Neste experimento houve a correlação entre o nível de expressão do peptídeo e o aumento no nível de resistência da doença, chegando a igualar ou superar a resistência em comparação com testes efetuados com fungicidas (Gao et al, 2000). Na batata poucos estudos têm sido relatados sobre a integração e expressão de peptídeos antimicrobianos. Khan et al (2006)

observou a resistência de plantas de batata transformadas com gene de defensinas isolada de *Wasabia japônica* L. contra o fungo *Botrytis cinérea*. Kovalskaya et al (2012), observou a resistência em plantas de tabaco e batata transformadas simultaneamente com SN1 (defensina) e PTH1 (peptídeo antimicrobiano rico em cisteína) contra a bactéria *Clavibacter michiganensis subsp. Sepedonicus* e o fungo *Colletotrichum coccoides*

A eficiência do método de transformação depende da espécie em estudo e do tecido usado como alvo da transformação e, de maneira geral, os parâmetros devem ser otimizados para cada técnica (Santarém, 2000; Bard et al, 2008).

2.3.1. MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS

Os métodos de transformação genética de plantas estão associados a técnicas *in vitro* de cultura de tecidos, isto é, a regeneração de plantas inteiras a partir de células transformadas. Em muitas espécies vegetais, essa etapa é limitante na obtenção de plantas transgênicas em razão das dificuldades intrínsecas ao processo de regeneração (Guimarães et al, 2003).

Para que o processo de transformação seja efetivo, o DNA deve ser introduzido em células ou tecido vegetal totipotente, isto é, aptos a se regenerar em plantas completas. Um dos fatores limitantes na transformação genética é a baixa eficiência das técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro* (Santarém, 2000). Aliado a isso, em muitas situações, a esterilidade total ou parcial das plantas transgênicas obtidas pode consistir em uma barreira para a finalização desse processo. Portanto, para iniciar os trabalhos de transformação, os aspectos relacionados à regeneração de plantas, através da cultura de tecidos, devem ser completamente elucidados (Santarém, 2000).

As técnicas de transformação genética são divididas em duas categorias: o método indireto, usando como vetor intermediário a bactéria *Agrobacterium*, e os métodos diretos, os quais dispensam vetores intermediários (Guimarães et al, 2003; Santos et al, 2011), utilizando processos físicos ou químicos que causam

modificações nas paredes e membranas celulares, facilitando a introdução de DNA exógeno (Santarém, 2000; Santos et al, 2011) (Figura 3).

2.3.2. MÉTODO INDIRETO DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS VIA *AGROBACTERIUM*

O sistema de transferência de DNA *Agrobacterium*-planta é largamente utilizado para a obtenção de plantas transgênicas, já que se trata de um sistema simples, eficiente e relativamente barato (Guimarães et al, 2003).

A utilização de *Agrobacterium* baseia-se na sua capacidade de transferir, para o genoma da célula-alvo vegetal, uma região específica denominada T-DNA (transferred DNA), contida no plasmídeo Ti (tumor inducing) (Santarém, 2000; Guimarães et al, 2003; Pitzschke & Hirt, 2010).

O T-DNA é delimitado por seqüências repetidas de 25 pb (pares de base) (extremidades esquerda e direita), as quais são reconhecidas por endonucleases específicas codificadas partindo de genes presentes em outra região do plasmídeo Ti, denominada região de virulência (ou Região *vir*) (Santarém, 2000; Andrade et al, 2003). A expressão dos genes da região *vir* é induzida por compostos fenólicos e monossacarídeos liberados pelas células da planta em resposta a um ferimento (Guimarães et al, 2003; Pitzschke & Hirt, 2010).

Em experimentos de transformação genética, as linhagens de *Agrobacterium* utilizadas apresentam um T-DNA “desarmado”, onde os genes originais são eliminados e substituídos pelos gene(s) que se deseja introduzir na planta. O pré-requisito para a utilização desse método é a susceptibilidade da espécie vegetal à infecção por *Agrobacterium*, a qual envolve várias etapas (Andrade et al, 2003).

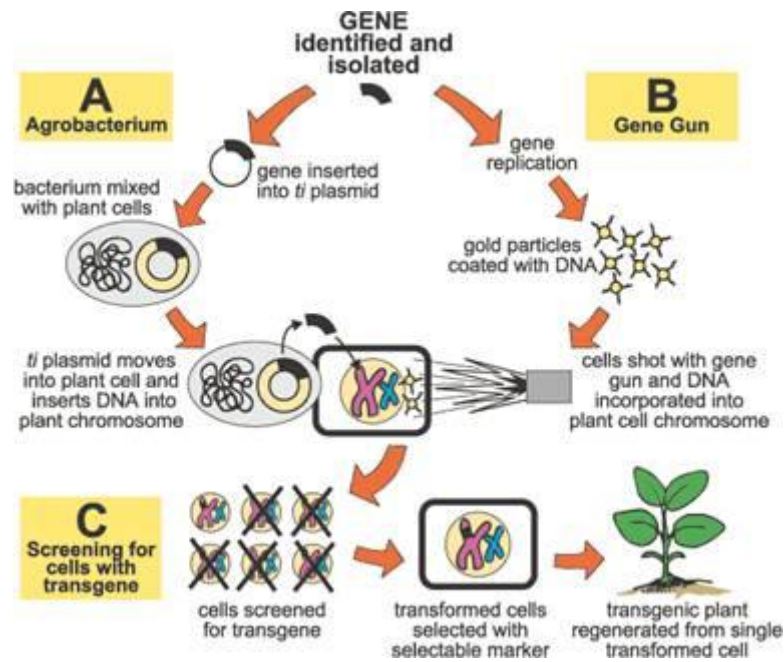


Figura 3 - Esquema dos principais métodos de transformação genética de plantas.

Inicialmente, as bactérias no solo são atraídas por quimiotactismo em resposta a algum ferimento na planta. Uma vez em contato, as bactérias se fixam à célula vegetal (Guimarães et al, 2003; Pitzschke & Hirt, 2010). A seguir, ocorre o processo de transferência do T-DNA e, finalmente, a integração do T-DNA no genoma da célula vegetal (Guimarães et al, 2003) .

Para a obtenção de uma planta transgênica, todas essas etapas são conduzidas em condições *in vitro*, sendo que o material vegetal a ser transformado, denominado explantes (fragmentos de folhas, entrenós, estaminóides, raízes, entre outros) é mantido em contato com a suspensão de uma linhagem desarmada de *Agrobacterium*, contendo em um vetor os genes de interesse a serem introduzidos (Figura 4).

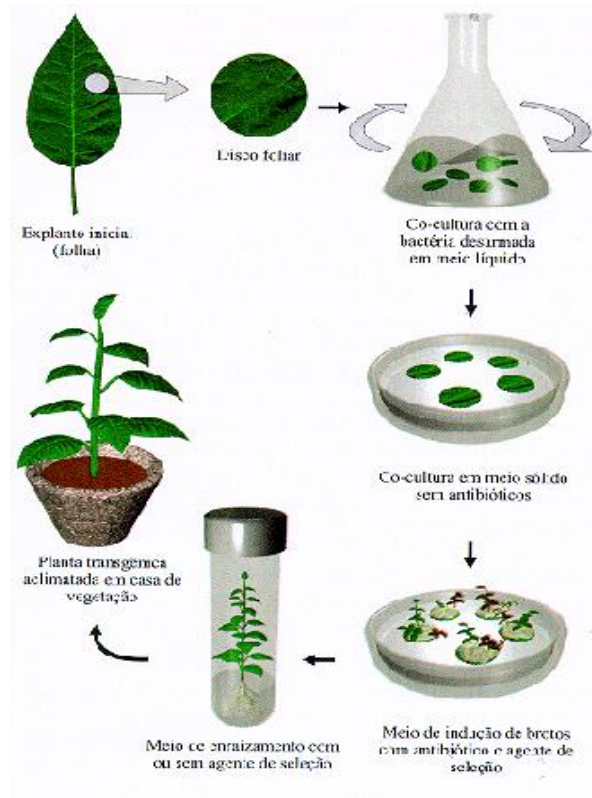


Figura 4 - Processo de co-cultura líquida via *Agrobacterium* e processo de regeneração e seleção *in vitro* de explantes (Brasileiro e Carneiro, 1998)

Após várias etapas de cultura *in vitro*, as plantas transgênicas obtidas são transferidas para casa de vegetação, onde vários ensaios moleculares e bioquímicos deverão ser realizados (Santarém, 2000).

2.3.3. MÉTODOS DIRETOS DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS

Os métodos diretos de transformação baseiam-se na transferência de DNA para as células-alvo por meios físicos ou químicos. O mais utilizado atualmente é o do bombardeamento de partículas, que consiste na aceleração do DNA aderido a partículas de ouro ou tungstênio para dentro da célula (Santos et al, 2011) .

Uma onda de choque causada pela liberação de uma alta pressão do gás hélio faz com que as partículas penetrem a parede e a membrana celular, de forma

não letal à célula. A seguir, o DNA é dissociado das partículas e integrado aleatoriamente no genoma nuclear (Santarém, 2000).

Esse método de transformação tem a vantagem de ser utilizável de forma independente da espécie vegetal a ser transformada, ao contrário do que acontece com a transformação mediada por *Agrobacterium*, já que não há a necessidade da susceptibilidade da espécie vegetal (Santarém, 2000; Guimarães 2003; Santos et al, 2011).

Outra vantagem é que a técnica de bombardeamento permite a obtenção de plantas transgênicas com base em qualquer tecido vegetal, dependendo somente de sua capacidade de regeneração *in vitro* (Santos et al, 2011).

No entanto o uso do tungstênio apresenta a desvantagem das partículas sofrerem degradação catalítica ao longo do tempo, sendo tóxicas ao longo do tempo, além de estarem sujeitas a oxidação o que afeta a adesão do DNA ou leva a degradação do DNA aderido. Já as partículas de ouro tendem a se aglomerar irreversivelmente em soluções aquosas reduzindo a eficiência do processo de introdução do DNA (Santarém, 2000).

Assim sendo, a relação entre o tipo de micro projétil usado para o bombardeamento e a expressão temporária ou estável do gene introduzido deve ser avaliada para cada espécie e tecido estudado.

2.4. A CULTURA DA BATATA (*Solanum tuberosum*)

A batata (*Solanum tuberosum* L.) pertencente à família das Solanáceas é originária da América do Sul, especificamente do Peru e da Bolívia. É uma cultura considerada sensível quanto ao clima, exigindo dias quentes (18 - 25° C) e principalmente noites frias (10 - 14°C), (EMBRAPA, 2011).

Atualmente o Brasil possui 139 mil hectares de área plantada de batata, compreendendo as regiões Nordeste (CE, PB, PE, SE, BA), Sudeste (MG, ES, RJ, SP), Sul (PR, SC, RS) e Centro Oeste (MS, GO, DF) com produção de 3 milhões de toneladas, sendo que 2 milhões de toneladas são para consumo *in natura*. A região

Sudeste possui a maior área cultivada, com cerca de 69.146 hectares e uma produção de 1.816.905 toneladas. Entre os principais estados produtores do Brasil estão Minas Gerais (1.130.264t), São Paulo (679.197t), Paraná (646.674t) e Rio Grande do Sul (357.355t) (AGRIANUAL, 2010).

Todavia, um dos fatores que contribuem para a baixa produtividade é a utilização de batata-semente de baixa qualidade fitossanitária que introduzem várias doenças de origem fúngica, virótica e bacteriana que afetam a cultura. Entre as principais doenças bacterianas, estão a canela preta e a podridão mole, causadas por diferentes espécies de *Pectobacterium*: *Pectobacterium carotovorum subsp. atrosepticum* (Pca) = (sin. *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* - Eca); *P. carotovorum subsp. carotovorum* (Pcc) = (sin. *E. carotovora subsp. carotovora* - Ecc); *P. chrysanthemi* (Pch) = (sin. *E. chrysanthemi* - Ech) e *P. carotovorum subsp. carotovorum* atípica (Benelli et al, 2004; Adriaenssens et al, 2012).

A principal característica das Pectobactérias é a produção de enzimas pectolíticas em grande quantidade, ocasionando rápida deterioração dos tubérculos ou tecidos da haste da planta, sendo praticamente impossível determinar qual a bactéria que está presente apenas através de sintomas. Várias regiões, tropicais e subtropicais, apresentam distribuição generalizada desses patógenos e as perdas devido a estas doenças têm sido estimadas entre 10 e 40 % nos campos de produção, podendo durante o armazenamento atingir a 100% (Tumelero, 2003).

As principais cultivares comerciais, atualmente plantadas no Brasil são de origem européia e da América do Norte, adaptadas às condições de clima temperado. Quando cultivadas em condições de clima tropicais ou subtropicais, podem promover certas alterações na fisiologia da planta que influenciam sua adaptação e produtividade (Souza, 2003).

Segundo estimativas feitas por Fiotreze (2003), o plantio da cultivar Asterix, de origem holandesa, vem crescendo na região Sul do Brasil devido à boa aceitação no mercado e nas indústrias de processamento (tipo palito, chips e palha), é uma cultivar de porte alto com três a cinco hastes, boa cobertura do solo, com tubérculo em formato oval-alongado, olhos superficiais, polpa amarelada, película rosada e

áspera. No entanto a cultivar Asterix é susceptível à requeima (*Phytophthora infestans*), viroses e a sarna-prateada (*Helminthosporium solani*), com resistência moderada à pinta-preta (*Alternaria solani*) e sob estresse hídrico apresenta desuniformidade no formato dos tubérculos.

Asterix apresenta alto potencial produtivo com elevada percentagem de tubérculos grandes, ciclo médio com brotação tardia, alto teor de matéria seca sendo bastante utilizada industrialmente na fabricação de “French Fries” (pré-fritas congeladas). Sua origem é Holandesa sendo resultante do cruzamento entre as cultivares Cardinal x SVPVE 70-9 (Epagri, 2002).

2.4.1. BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS DA CULTURA DA BATATA

A canela preta e a podridão mole são consideradas doenças de grande importância para a cultura da batata. As bactérias envolvidas com essas doenças eram pertencentes ao grupo II de *Erwinia* pectolíticas “soft rot” hoje são classificadas como *Pectobacterium* de acordo com a proposta de Hauben et al (1999), seguindo a sugestão de Waldee (1945) que sugeriu agrupar as espécies de *Erwinia* pectolíticas em um novo gênero (Tumelero, 2003).

Recentemente a antiga proposta foi analisada, considerando-se o grande número de indivíduos do gênero *Erwinia* e os vários sintomas provocados pelas diferentes espécies nos mais variados hospedeiros (Tumelero, 2003). Assim sendo, as espécies de *Erwinias* do grupo II foram renomeadas da seguinte forma: *Erwinia carotovora* Dye (1969) - *Pectobacterium carotovorum*; *Erwinia chrysanthemi* Burkholder (1953) - *Pectobacterium chrysanthemi*; *Erwinia cyripedii* - *Pectobacterium cyripedii* e *Erwinia cacticida* – *Pectobacterium cacticidum* sendo essas as responsáveis por causarem uma rápida maceração dos tecidos de plantas (Tumelero, 2003).

A canela preta é uma doença cujo agente é transmitido por tubérculos de batata e em regiões temperadas é atribuída especificamente à *Pectobacterium atrosepticum* (Ribas, 2007). A canela preta ocorre normalmente na haste da planta, a partir de tubérculos-semente infectados e se caracteriza por lesões que variam de

coloração marrom a preta. A murcha das folhas e a seca das hastes podem ocorrer na fase inicial da doença.

O patógeno da planta *Dickeya* sp (formalmente conhecida como *Erwinia chrysanthemi* ou *Pectobacterium chrysanthemi*) é uma bactéria gram-negativa, anaeróbica facultativa da família da Enterobacteriaceae, que tem como característica a produção de enzimas pectinolíticas durante o processo de infecção. Juntamente com outras bactérias elas são a maior causa do amolecimento do tubérculo durante o armazenamento e da doença da canela preta no campo.

A podridão mole dos tubérculos é caracterizada pela maceração dos tecidos parenquimatosos, levando ao encharcamento, devido à destruição da lamela média que une as células, ocasionando assim a perda de água, resultando na não emergência da planta (Tumelero, 2003).

Os melhores meios para controlar a doença incluem plantio de tubérculos-semente sadios, redução de injúrias nos tubérculos durante a colheita e condições adequadas de estocagem. Essas técnicas de manejo têm sido insuficientes para o controle da doença, uma vez que a bactéria pode penetrar por aberturas naturais nos tubérculos (Tumelero, 2003).

Outros meios podem ser empregados para minimizar a contaminação bacteriana como, por exemplo, o emprego de cultivares resistentes (Benelli et al, 2004). Até ao momento nenhum controle químico foi descrito ou mesmo disponível para a *Dickeya* e lotes de batata infetados já foram perdidos ou descartados, resultando em significantes perdas econômicas (Adriaenssens et al, 2012).

A murcha-bacteriana ou murchadeira, causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum*, é uma das doenças mais destrutivas da batata no Brasil e em outros países de clima tropical e subtropical. É responsável por perdas elevadas na produção de batata de consumo e pela condenação de campos de certificação de batata-semente. A doença pode ocorrer em todas as regiões produtoras de batata do País, principalmente nos cultivos sujeitos a altas temperaturas e umidade (Lopes et al, 2004). *R. solanacearum* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica, bastonetiforme, habitante de solo, que apresenta um ou mais flagelos polares. É

uma espécie complexa, apresenta grande variabilidade, diferenciando em distribuição geográfica, propriedades fisiológicas, patogenicidade e gama de hospedeiros. Está presente no solo e é bastante distribuída em regiões tropicais e de temperaturas mais altas. Este patógeno infecta naturalmente as raízes de seus hospedeiros entrando por feridas ou por onde as raízes secundárias emergem. A *R. solanacearum* invade os vasos xilemáticos e se espalha rapidamente para as partes aéreas da planta pelo sistema vascular. A disfunção vascular induzida pela colonização extensiva causa sintomas de murcha e posterior morte da planta (Santana, 2009).

A murcha bacteriana caracteriza-se pela perda de turgescência dos tecidos foliares e das partes mais suculentas dos ramos da planta. A entrada do patógeno ocorre, geralmente, através de microferimentos, como pontos nos quais emergem as raízes secundárias e células parcialmente esfoliadas da camada externa do parênquima (Neto, 2005). Uma vez nos vasos xilemáticos, a bactéria se multiplica, espalhando – se rapidamente para as partes aéreas da planta pelo sistema vascular (Santana, 2009).

As cepas de *R. solanacearum* que causam doenças em batata são pertencentes as raças 1 e 3, estando presente em áreas tradicionais de plantio no Brasil. A raça 3 é mais frequente nos estados do Sul e Sudeste onde as temperaturas são mais amenas, ocasionando perdas consideráveis na produção de batata (Neto, 2005). Nas cepas mais virulentas elas produzem grandes quantidades de exopolissacarídeos (EPS), que contribuem para que as células bacterianas se mantenham agregadas, podendo causar obstrução parcial ou total do xilema impedindo que a água atinja a parte aérea da planta (Santana, 2009) e ou prevenir o patógeno de ser reconhecido e imobilizado pelos componentes de resistência da planta como lectinas (Neto, 2005).

Na cultura da batata a presença da bactéria *R. solanacearum* é considerada uma das maiores limitações ao seu cultivo em regiões de clima tropical, subtropical e zonas mais quentes de clima temperado em todo mundo. As infecções latentes causadas por esta bactéria são de particular importância na cultura da batata, e os

tubérculos sementes infectados constituem a fonte de inoculo mais importante para a disseminação do patógeno.

O controle da murcha bacteriana é bastante dificultado, pois *R. solanacearum* que pode sobreviver saprofiticamente por longos períodos em diferentes tipos de solos. A capacidade de sobrevivência pode ser explicada pela capacidade do patógeno de utilizar uma variedade de compostos orgânicos como fonte de energia ou ainda pela habilidade de entrar em uma fase dormente (Santana, 2009).

À medida que se constata o aquecimento global, e como esse patógeno está bem adaptado ao solo e causa doenças em locais de altas temperaturas, é provável que esta bactéria venha a se tornar um patógeno ainda mais destrutivo em áreas de cultivo de Solanáceas, inclusive em batata no Brasil (Santana, 2009). As possibilidades de sucesso no controle desta bacteriose dependem de vários fatores, tais como variante do patógeno no local, modos de transmissão e de sobrevivência, tratos culturais, condição ambiental e grau de resistência da cultivar (Neto, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um protocolo de transformação genética de batata (*Solanum tuberosum*) cv Asterix via *Agrobacterium* com peptídeo antimicrobiano visando resistência de bactérias fitopatogênicas;

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar bioensaios com peptídeo Pg-AMP₁ purificado contra as cepas bacterianas *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*.
- b) Realizar bioensaios com plantas de Tabaco (*Nicotiana tuberosum*) transformadas com o peptídeo Pg-AMP₁ *in vivo* contra as cepas *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum subsp. Carotovorum*.
- c) Transformação genética via *Agrobacterium* para obtenção de plantas transgênicas de batata (*Solanum tuberosum*) com a seqüência codificadora do peptídeo antimicrobiano Pg-AMP₁.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. BIOENSAIOS COM PEPTÍDEO Pg-AMP₁ PURIFICADO CONTRA CEPAS DE BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS

A atividade antimicrobiana do Pg-AMP₁ recombinante purificado por cromatografia de afinidade foi testada contra uma cepa de bactéria *Pectobacterium carotovorum subsp carotovorum* e *Pectobacterium atrosepticum*. Os bioensaios foram realizados em microplacas de 96 poços de polipropileno usando 100 µL de meio LB inoculado com o microrganismo e 100 µL do peptídeo Pg-AMP₁ recombinante, em diferentes concentrações, diluída em solução salina (0,85%). Para determinar a concentração inibitória mínima (MIC) o peptídeo foi testado com as concentrações finais 20, 30 e 40 µg/ml por 18 h a 27°C. Foram usados dois controles negativos, um contendo o inóculo tratado com tampão de purificação diluído em água e outro controle negativo com solução salina (0,85%). O controle positivo testado foi o cloranfenicol nas concentrações finais 1.250, 125, 12.5, 1.25 µg/ml diluído em salina (0,85%). Cada experimento foi realizado em triplicata. As bactérias foram crescidas em meio LB a 27° C no agitador orbital por 18 h a 200 rpm ate atingir a OD₆₀₀. 0.5 - 0.8. O volume final em cada poço foi de 200 µl, sendo 100 µl do meio LB e 100 µl da solução antimicrobiana do tratamento, controles positivo e negativo. Após a montagem a placa as bactérias ficaram em incubação estática de 18 à 24 h. Posteriormente foi feita a leitura do número de células crescidas por fotometria através do fotômetro Varioskan. As cepas bacterianas *Pectobacterium carotovorum subsp. Carotovorum* (IBSBF 877) e *Pectobacterium atrosepticum* (IBSBF 232) foram gentilmente cedidas pela Coleção de Cultura de Fitobactérias do Instituto Biológico - IBSBF, Laboratório de Bacteriologia Vegetal.

4.2. BIOENSAIOS *IN VIVO* COM PLANTAS DE FUMO

Dez microlitros de suspensão bacteriana de *Pectobacterium carotovorum* e *Pectobacterium atrosepticum* (10^7 esporos/ml) foram injetados em 8 folhas de tabaco transformadas com Pg-AMP₁ (Pinto, 2012), entre as segundas e terceiras nervuras/veias, com uma seringa sem agulha, de acordo com o método de Zhang et al 2004. As Folhas inoculadas foram colocadas entre duas folhas de papel de filtro em uma placa de Petri a 25° C no escuro. As áreas de necroses que aparecerem em volta do local do inóculo e o índice da doença foram medidas após 24, 32 e 40 h após inóculo para a bactéria *Pectobacterium caratovorom*, em folhas de cada linhagem transgênica e não transgênica. As folhas foram fotografadas após 24, 32 e 40 horas e as imagens foram processadas no software Image Pro Plus® para a obtenção da área circular referente ao halo de infecção da bactéria, sendo usada uma calibração para medida espacial com auxílio de régua graduada. As folhas usadas para o bioensaio são proviêntens de plantas transgênicas de *N. Tabacum* com Pg-AMP1 resultantes do processo de transformação genética via *agrobacterium* realizadas por Pinto (2012). O bioensaio para *P. atrosepticum* não foi realizado por indisponibilidade de quantidade de folhas necessária para a realização do experimento.

4.3. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BATATA

4.3.1 – CONSTRUÇÃO DO VETOR DE TRANSFORMAÇÃO

O gene que codifica o peptídeo Pg-AMP₁ foi sintetizado de acordo com a sequência de aminoácidos do peptídeo isolado de sementes de goiaba (*Psidium guajava*) (Tavares, 2009). A estratégia de subclonagem do vetor de expressão foi desenhada de maneira que o produto final da expressão tivesse uma cauda de histidina (His)₆ na extremidade N-terminal, visando facilitar a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. A sequência codificadora do gene Pg-AMP₁ contém 165 pares de bases e foi sintetizada pela empresa Epotech Biolabs no vetor pBSSK. A sequência do Pg-AMP₁ his tag foi subclonada no vetor pK7WG2D (VIB ®) através do sistema gateway (Invitrogen ®). Primeiramente

utilizando-se a enzima BP clonase (que promove uma recombinação homóloga) onde a seqüência de interesse (Pg-AMP₁) foi inserida no vetor pDONR221 (Invitrogen, Carlsbad). A partir dessa etapa ele passou a ser denominado pENTRYPg-AMP₁. O vetor pENTRYPg-AMP₁ foi então transferido para a linhagem bacteriana *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) por eletroporação, a fim de se recuperar uma maior quantidade de plasmídeos. Os plasmídeos recuperados foram então subclonados utilizando a enzima LR clonase (enzima que também promove recombinação homóloga), porém dessa vez a troca é feita ente os vetores pENTRYPg-AMP₁ e o vetor de expressão em plantas pK7GW2D, obtendo-se assim o vetor de expressão em plantas pK7WG2D-Pg-AMP₁-GFP. Este vetor carrega os genes de seleção *nptII* (neomycin phosphotransferase II, promove resistência ao antibiótico canamicina), o gene repórter *GFP* (green fluorescence protein) que codifica a proteína para visualização de fluorescência verde, além do gene codificador do peptídeo. O vetor de transformação acima foi construído no Laboratório de Genética da UFJF (Pinto, 2012), (Figura 5).

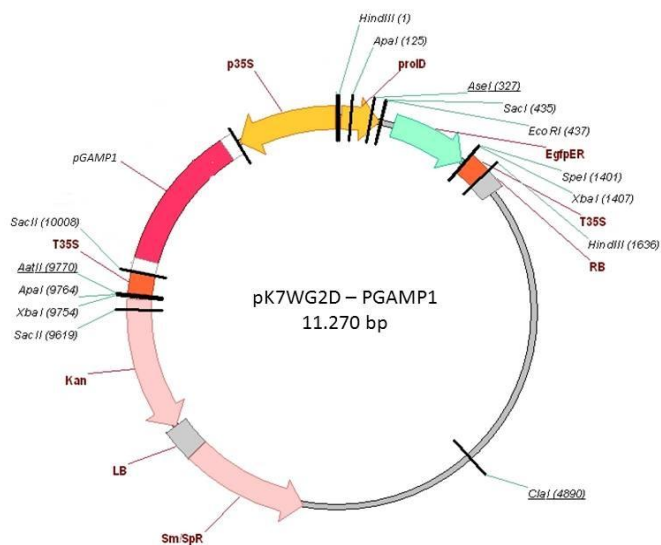


Figura 5 - Mapa final do vetor de transformação genética via *Agrobacterium* pK7GW2D – Pg-AMP₁.

4.3.2. CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CULTIVARES DE BATATA

Os explantes de plantas de batata cultivar Asterix cultivadas *in vitro* e subcultivadas a cada 30 dias, em meio básico composto de sais minerais de MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas, 2% de sacarose e 7 g/L de ágar (Phytotechlab ®), (pH 5.8). As culturas foram mantidas sob fotoperíodo de 16h, densidade de fluxo de fótons de $180 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^1$ e uma temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$. Para a produção dos microtubérculos as plantas foram mantidas em tubo de ensaio por até três meses sob o regime de luz descrito acima.

4.3.3. AGROBACTERIUM E CONDIÇÕES DE CULTURA

Foi utilizada a estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 para introdução do plasmídeo contendo o vetor de expressão pK7WG2D-Pg-AMP₁ por eletroporação com o gene de seleção *npt II* (neomicina fosfotransferase II) e o gene repórter GFP (Green Fluorescence Protein) que codifica a proteína para visualização de fluorescência verde, além da sequência do gene codificador do peptídeo Pg-AMP₁ sob controle do promotor 35S. O meio de cultura utilizado para o crescimento bacteriano foi LB (Luria Broth) (triptona 1 g/L, extrato de levedura 0,5 g/L, NaCl, 1 g/L) contendo os antibióticos Rinfampicina (10 mg/L), Gentamicina (50 mg/L) e Spectinomicina (75 mg/L). As culturas bacterianas para os experimentos foram inoculadas em tubos de poliestireno de 50 ml, com 4 ml de meio LB com os respectivos antibióticos. As culturas foram incubadas a 27°C em agitador orbital (150 rpm) durante 16 a 18h. Após o crescimento a solução dessas culturas foi centrifugada a 5.000 rpm a 4°C por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 10 a 20 ml de meio MS de modo a obter densidade ótica final de 0,2.

4.3.4. INFECÇÃO, COCULTIVO, SELEÇÃO E REGENERAÇÃO DE BATATA

Os explantes caulinares, entrenós e microtubérculos (fatiados), foram imersos em 10-20 ml de suspensão bacteriana durante 30 min. Em seguida os explantes

foram transferidos para placas de Petri, contendo papel de filtro estéril para eliminar o excesso de bactéria e incubados durante 48 h no escuro em meio para o cocultivo sólido. Após o período de cocultivo os explantes foram lavados duas vezes em 40 ml água destilada autoclavada, seguida de uma terceira lavagem em 40 ml de água destilada autoclavada contendo os antibióticos Timentim 200 mg/L e Meropenem 20 mg/L. Depois os explantes foram transferidos para meio de seleção durante 15 dias onde foram novamente transferidos a cada 15 dias para meio novo de seleção. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições considerando se cinco placas de Petri com 10 explantes cada.

Para o desenvolvimento de protocolo de regeneração foi realizados três séries distintas com diferentes composições de meio de cultura de regeneração e seleção descritas nas tabelas abaixo, selecionados em artigos descritos na literatura (Beaujean et al, 1998; Sarker & Mustafa, 2002; Molla et al, 2011; Molla et al, 2012).

Tabela 1 - Composição dos meios de cultura usados para regeneração de brotos a partir de entrenós de batata cultivar Asterix, série 1.

Série 1	Explante: entrenó
Meio A - ANA (0.1 mg/L) + Zeatina (0.1 mg/L)	
Meio B - TDZ (2 mg/L)	
Meio C - Zeatina (3 mg/L)	
Meio D - TDZ (0.3 mg/L) + AIA (0.01 mg/L) + GA3 (0.2mg/L)	
Meio E - TDZ (0.2 mg/L)	

Os explantes nesta série foram mantidos em meio de seleção contendo 100 mg/L de Canamicina, onde foram transferidos a cada 15 dias para um meio novo.

Tabela 2- Composição dos meios de cultura usados para regeneração de brotos a partir de entrenós de batata cultivar Asterix, série 2.

Série 2	Explante: entrenó
Meio F - GA3 (0.2mg/L) + AIA (0.1 mg/L) + Zeatina (0,1mg/L)	Os ex pla nte s ne
Meio G - GA3 (0.2 mg/L) + AIA (0.1 mg/L) + TDZ (0.1 mg/L)	
Meio H - GA3 (0.2 mg/L) + ANA (0.1 mg/L) + Zeatina (0.1 mg/L)	

sta série foram mantidos em meio de seleção contendo 50 mg/L de Canamicina. A cada 15 dias os explantes foram subcultivados para um meio novo.

Tabela 3 - Composição dos meios de cultura usados para regeneração de brotos a partir de entrenós e minitubérculos de batata cultivar Asterix, série 3.

Série 3	Explante: mini tubérculo/entrenó
Meio I - GA3 (0.2 mg/L) + AIA (0.1 mg/L) + TDZ (0.3 mg/L)	

Os explantes nesta série foram mantidos em meio de seleção contendo 25 mg/L de Canamicina durante 30 dias, onde foram subcultivados a cada 15 dias para meio novo. Após aproximadamente 60 dias os explantes que apresentaram brotos em início de regeneração foram transferidos para o meio novos de mesma composição, mas sem o agente de seleção por 15 dias adicionais. Após esse período as plantas regeneradas foram transferidas para meio MS sem reguladores de crescimento para enraizarem.

4.3.5. EXTRAÇÃO DE DNA E REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)

Tecido vegetal fresco (300 a 500 mg), foram macerados em um tubo de micro centrífuga (microtubo de 1,5 ml), com ajuda de um pilão para tubo de microcentrifuga e adicionado 1 mL de Tampão de extração e 400 µL de Clorofórmio: álcool isoamílico. Esse macerado foi incubado a 55° C com agitação por 10 min e em seguida centrifugado a 12.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo de microtubo. Adicionou-se ao sobrenadante 1,2 volume de isopropanol e centrifugou-se em micro centrífuga a 12.000 rpm por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado com 1 mL de etanol a 70% e centrifugou-se novamente em micro centrífuga a 12.000 rpm por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e secou-se o precipitado, deixando o tubo invertido em câmara de fluxo laminar. O precipitado foi ressuscitado em 50 µL de água autoclavada. Os brotos induzidos na presença de canamicina foram transferidos para meio de enraizamento por 30 dias. A avaliação da inserção do fragmento de interesse nas plantas que se mantiveram vivas após esse período foi feita pela reação da polimerase em cadeia (PCR). A PCR foi realizada em termociclador Eppendorf modelo Mastercycler® utilizando-se os primers KANR 784 (5'-TACGCTTGATCCGGCTACC-3') e KANF 313 (5'-TGAACGATCTGCTTGACTC-3') que anelam-se dentro da região do gene *nptII* (neomicina fosfotransferase) que confere resistência a canamicina. Para a reação de PCR das plantas transformadas com o gene *Pg-AMP1* foi usado um ciclo de 95 °C por 10 minutos; 34 ciclos (1 min a 95 °C; 1 min a 58 °C; 1 min 72 °C) e um ciclo de extensão final de 5 minutos a 72 °C para o gene *nptII*. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% e corados com *syber green* a fim de se obter um fragmento de 471 bp. O gel do material analisado foi capturado e armazenado em sistema de foto documentação digital.

5. RESULTADOS

5.1. BIOENSAIOS CONTRA CEPAS DE BACTÉRIAS

O peptídeo recombinado purificado foi testado em bioensaios *in vitro* contra bactérias *Pectobacterium atrosepticum* e *Pectobacterium carotovorum*. As duas cepas de bactérias foram inibidas com 40 µg/ml do Pg-AMP₁ recombinante (Figura 6). Dessa forma o Pg-AMP₁ apresentou grande potencial contras estas cepas de bactérias, mostrando de forma clara que ele apresenta atividade bactericida.

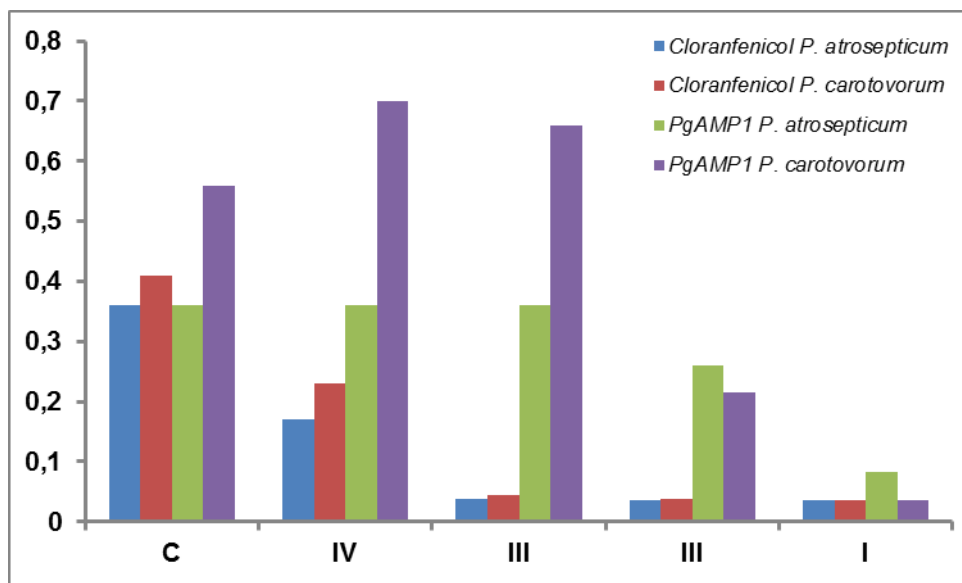


Figura 6 - Atividade antimicrobiana de Pg-AMP₁ em bioensaios contra *Pectobacterium atrosepticum* e *Pectobacterium carotovorum* expressa em função da densidade óptica. IV, III, II e I são respectivamente: 1,25 mg/ml de cloranfenicol e 10 mg/ml de Pg-AMP₁; 12,5 mg/ml de cloranfenicol e 20 mg/ml de Pg-AMP₁; 125 mg/ml de cloranfenicol, 30 mg/ml de Pg-AMP₁; 1.250 mg/ml de cloranfenicol e 40 mg/ml de Pg-AMP₁.

5.2. BIOENSAIOS IN VIVO COM PLANTAS DE FUMO

A análise da resistência das plantas transgênicas de tabaco ao fitopatógeno *Pectobacterium carotovorum* demonstrou que a resistência varia de acordo com a linhagem transgênica analisada e com o tempo de exposição ao estresse. A progressão dos sintomas provocados pela *Pectobacterium carotovorum* nas três linhagens transgênicas e na planta não transgênica, 24 h, 32 e 40 horas após a inóculo, está ilustrado na Figura 7 e 8. Pode-se observar, após o período de 24 h, o início da formação de lesões necróticas na folha da planta não transgênica e também em algumas linhagens transgênicas, com exceção de planta P11 e P12. Após 40 h de inóculo, foram intensificadas as diferenças nas respostas de resistência entre as linhagens transgênicas, com o aumento dos sintomas de necrose na região do inóculo da bactéria, conforme evidenciado na planta não transgênica e nas linhagens P04, P10 e P12. No entanto, as linhagens da P11 e P12 apresentaram sintomas menos severos de estresse provocado pela presença da bactéria (Figura 7 e 8). Esses resultados podem estar correlacionados com os níveis de expressão do gene *Pg-AMP1* nas diferentes linhagens transgênicas.

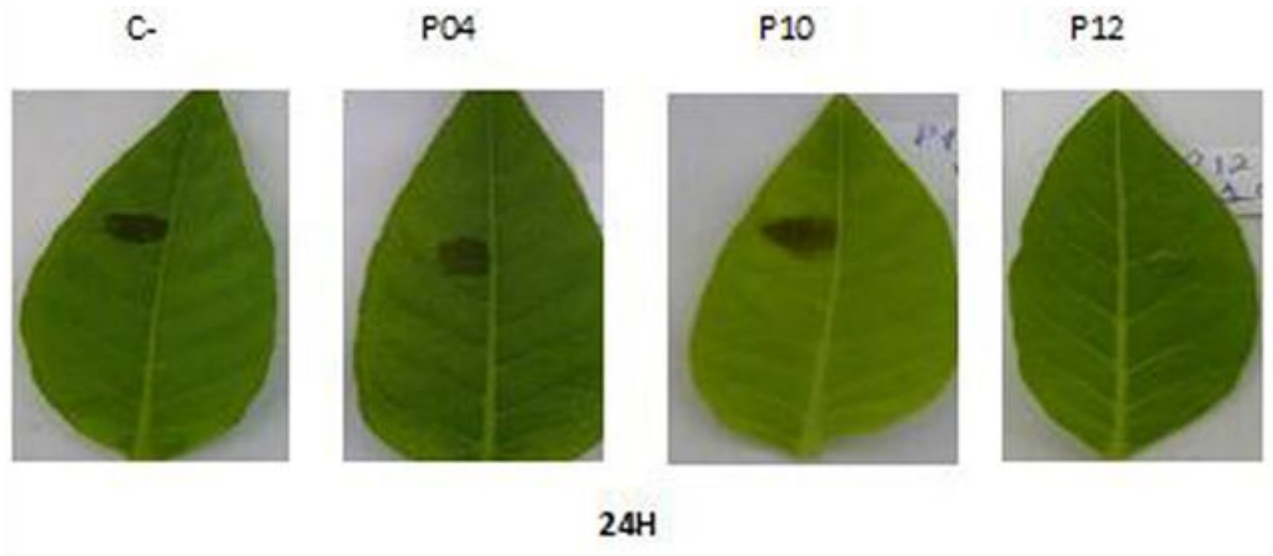


Figura 7 - Efeito da bactéria em folhas de plantas não transgênicas e transgênicas de *N. tabacum*. Foto capturada após 24 h de inoculação de 10 μ l de suspensão bacteriana de *P. carotovorum* (C- planta não transgênica).

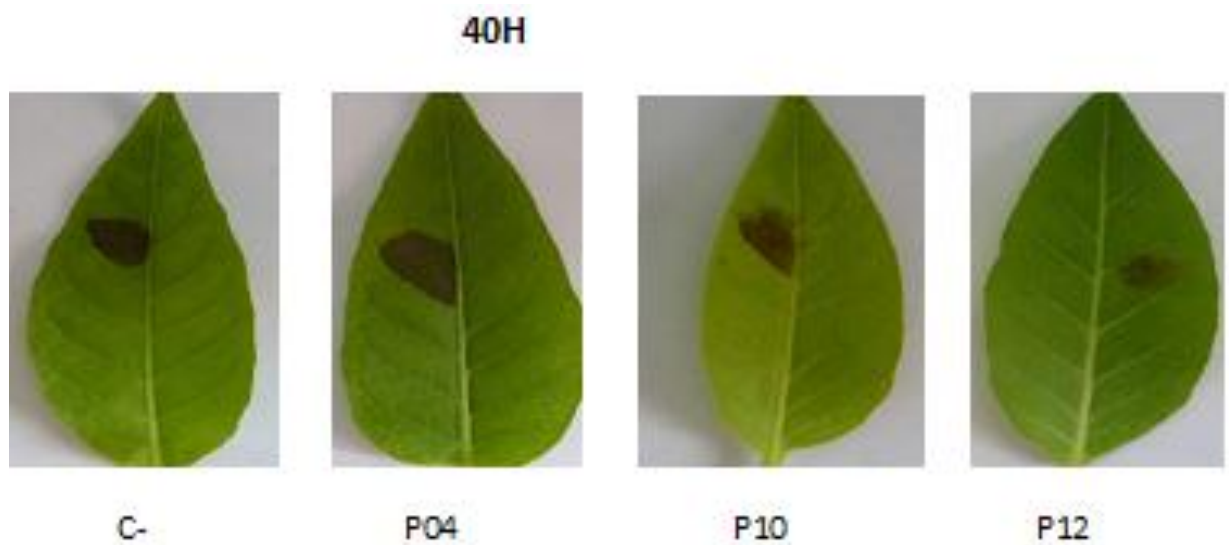


Figura 8 - Efeito da bactéria em folhas de plantas não transgênicas e transgênicas de *N. tabacum*. Foto capturada após 40 horas de inoculação de 10 μ l de suspensão bacteriana de *P. carotovorum* (C- planta não transgênica).

A curva de progresso da doença exibiu um atraso apenas nas linhagens transgênicas P11 e P12 em comparação com o genótipo não transgênico (Figura 8). Já as linhagens P1, P04 e P10 não apresentaram diferenças significativas comparadas com o controle (plantas não transgênicas) e os sintomas foram mais severos para as linhagens P1 e P04, após decorridas as 24 horas do que para as outras linhagens (Figura 9).

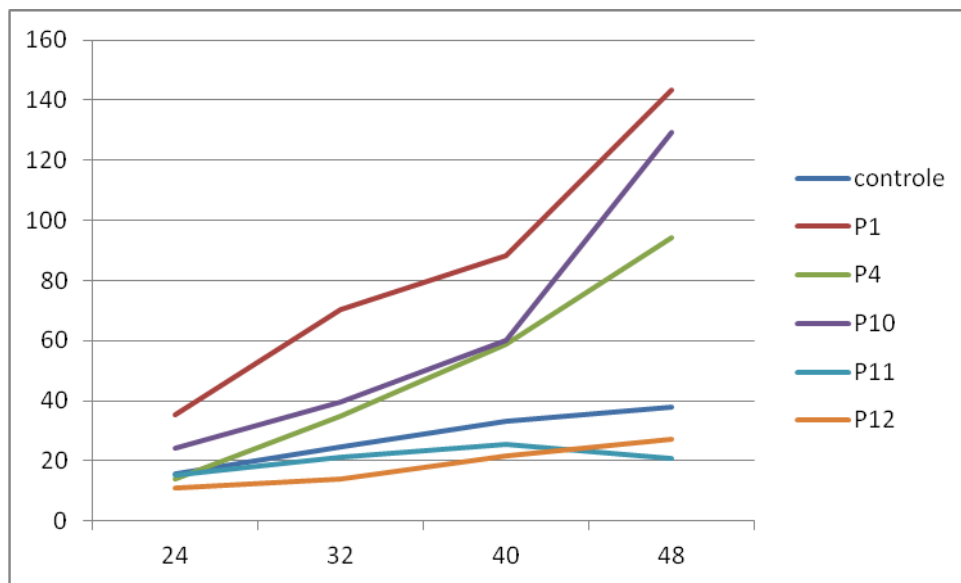


Figura 9 - Curva do progresso da doença das linhagens transgênicas de tabaco Pg-AMP1 e do controle (planta não transformada) após a incubação com o patógeno *P. carotovorum* infectada via inoculação com seringa e agulha.

5.3. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS DE BATATA

A transformação dos explantes de *Solanum tuberosum* com o vetor pK7WG2D-Pg-AMP1-GFP permitiu a obtenção de 13 linhagens transgênicas, representando eventos de transformação distintos. Para os ensaios foram utilizadas oito plantas transformadas, pois as demais não possuíam número suficiente de folhas no período de realização dos experimentos. O início da brotação *in vitro* dos explantes submetidos ao meio de indução de multiplicação se deu a partir de duas semanas após a realização da cocultura para o explante microtubérculo. Todas as

plantas regeneradas em meio seletivo apresentavam fenótipo normal. A natureza transgênica das plantas foi inicialmente determinada por meio de reações de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para amplificação do gene *nptII*. Para cada gel, uma banda de aproximadamente 471 bp correspondente ao tamanho esperado dos fragmentos amplificados foram obtidas em 7 das 8 linhagens transgênicas de *Solanum tuberosum* utilizadas (Figura 10).

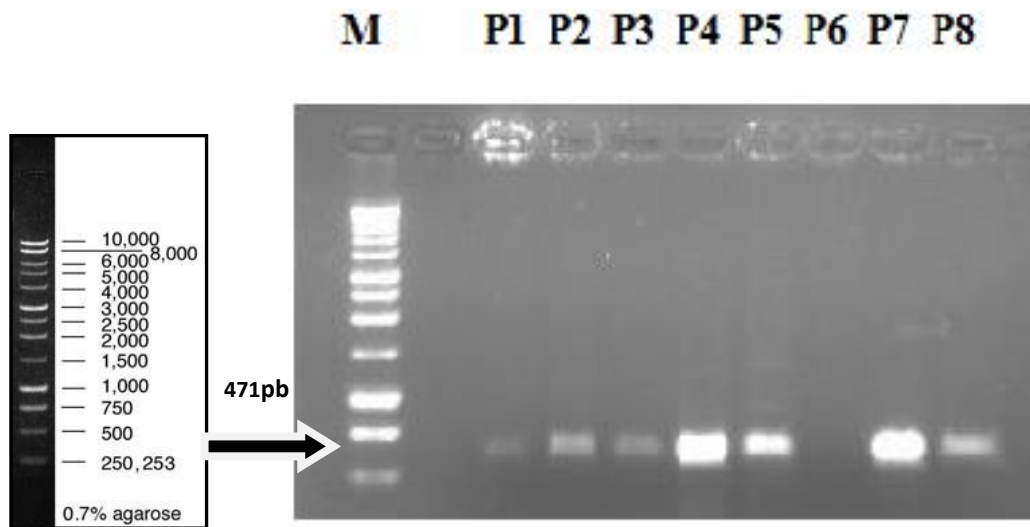


Figura 60 - Diagnóstico de integração do T-DNA em plantas de batata via PCR utilizando oligonucleotídeos para o gene *nptII*. M: marcador de peso molecular 1Kb ladder (Promega®); P1-P8: plantas transformadas, com exceção da P6.

O vetor de expressão pK7WG2D-Pg-AMP1 introduzido na *Agrobacterium* estirpe GV3101, foi usado para o processo de transformação genética de entrenós e micro tubérculos de batata. Os explantes passaram pelo processo de cocultura líquida e após dois dias em cocultura sólida foram transferidos para meio de seleção contendo Canamicina. Todos os explantes da série 1 e 2 não regeneram no meio seletivo, contrariamente ao explantes da série 3 onde apresentou em sua maioria formação de brotos apenas nos microtubérculos (Figura 11). Os resultados apresentados na tabela abaixo mostram que os diferentes explantes responderam de forma diferente aos diferentes tratamentos submetidos, e pode-se observar que a

percentagem de regeneração parece ter sido influenciada pelo tipo de explante, pois mesmo em baixas doses de canamicina não foi observado regeneração.

Tabela 4 - Percentual de regeneração de explantes entrenó, em meio seletivo com 25mg/L de Canamicina.

Tipo de Explante	Cultivar	Número de Explantes	Número de Brotos	Percentual de Regeneração
Entrenó	Asterix	60	0	0
Micro tubérculo	Asterix	104	85	81

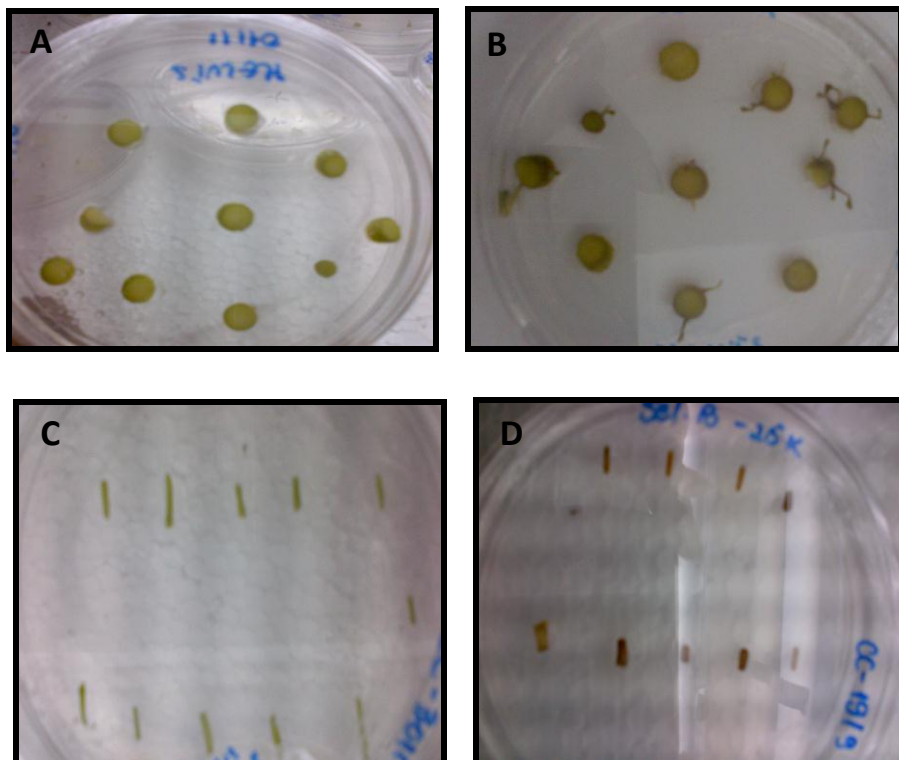


Figura 7- Processo de regeneração e seleção *in vitro* de explantes de batata após cocultura líquida com *Agrobacterium*. A: explantes (cortes finos (1 mm) de microtubérculos) após dois dias em cocultura sólida; B: Brotos emergindo do explante microtubérculo duas semanas após o cultivo *in vitro* em meio seletivo; C: :explantes (entrenós) após dois dias em cocultura sólida; D: explante (entrenós) duas semanas após o cultivo *in vitro* em meio seletivo.

Quanto aos diferentes tipos de meio, dentre os resultados obtidos não foi observado regeneração de brotos a partir da cocultura com entrenós, diferentemente do explante microtubérculo, que mostrou elevado percentual de regeneração com o ensaio realizado no processo de transformação em que foram usados como explante.

Tabela 5 - Percentual de regeneração de explantes entrenó, em meio seletivo com 100 mg/L de Canamicina.

Série1	Nº Total de explantes	Nº Brotos	% Regeneração
Meio A	50	0	0
Meio B	150	0	0
Meio C	75	0	0
Meio D	189	0	0
Meio E	172	0	0

Tabela 6 - Percentual de regeneração de explantes entrenó, em meio seletivo com 50 mg/L de Canamicina

Serie 2	Nº Total de explantes	Nº Brotos	% Regeneração
Meio F	80	0	0
Meio G	96	0	0
Meio H	160	0	0

Tabela 7 - Percentual de regeneração de explantes microtubérculo, em meio seletivo com 25 mg/L de Canamicina

Serie 3	Nº Total de explante	Nº Brotos	% Regeneração
Meio I	104	85	81

6. DISCUSSÃO

6.1. BIOENSAIOS COM CEPAS DE BACTÉRIAS

A resistência genética a doenças bacterianas e fúngicas tem sido difícil de ser introduzida em cultivares de plantas devido à escassez de genes R (resistência) naturais e devido aos longos períodos envolvidos na seleção de plantas. Estratégias tem sido exploradas para gerar a resistência por meio de engenharia genética, que incluem abordagens afetando diferentes passos da interação patógeno-hospedeiro, tais como a estimulação de respostas de defesa da planta, inibição de fatores de infecção de bactérias ou fúngicas e de expressão de antimicrobianos de origem vegetal e não vegetal. No presente trabalho, o peptídeo recombinante Pg-AMP₁ purificado foi testado em placas de 96 poços de polipropileno em diferentes concentrações contra o microrganismo fito patogênico da cultura da batata, *Pectobacterium atrosepticum* e *Pectobacterium carotovorum* objetivando comprovar a atividade antimicrobiana descrita por Pelegriani et al. (2008) em fitopatógenos. Tais resultados estão de acordo com os encontrados anteriormente onde o Pg-AMP₁ mostrou atividade contra bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (PELEGRINI et al., 2008), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 11229 e ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 35218 e contra linhagens Gram-positivas do gênero *Staphylococcus*, *S. aureus* ATCC 2592-3 e ATCC 2921-3, *S. epidermidis* ATCC 1222-8 e *S. aureus* MEC-A ATCC 3359-1 causadoras de infecção hospitalar (TAVARES et al., 2012). No presente estudo, ficou clara a ação bactericida contra bactérias Gram-negativas patogênicas de plantas com o Pg-AMP₁ recombinante purificado. Poucos estudos foram feitos com o peptídeo Pg-AMP₁ contra bactérias patogênicas de plantas, os primeiro relatos são de Pinto (2012) que mostrou atividade bactericida contra *Xanthomonas fragariae*, porém diferentemente de Pelegriani et al (2008) e Tavares (2009), Pinto (2012) utilizou o extrato bruto extraído de folhas de tabaco transformados com Pg-AMP₁. Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram os resultados anteriores, uma vez que as pectobactérias testadas são fitobactérias gram-negativas. Vários estudos têm sido realizados com objetivo de demonstrar atividade antimicrobiana de várias proteínas. Rivero et al (2012), observaram a resistência das

bactérias *Pectobacterium carotovorum* em plantas de batata transformadas com Lisoenzimas (Ly) e AP24 uma proteína de defesa de tabaco que partilha homologia de sequência com a proteína taumatina, caracterizada como antifúngica. Kovalskaya & Hammond (2009) mostraram atividade antimicrobiana de proteína Snakin 1 (SN1) e a defensina PTH1 contra *C. michiganensis subsp. sepedonicus*, *P. syringae pv. syringae*, *P. syringae pv. tabaci*, todas elas gram-negativas. Deve-se salientar que é importante observar que a produção de proteínas recombinantes nos tecidos da planta é um processo dispendioso e demorado, normalmente produzindo quantidades reduzidas de proteínas transgênicas que pode não ser suficiente para ensaios biológicos. A este respeito, o presente trabalho demonstra a utilização de uma técnica menos dispendiosa e o sistema de expressão em *E. coli* para a geração de proteínas antimicrobianas ricas em glicinas, que são adequados para caracterização biológica *in vitro*. Assim sendo proteínas com as melhores características antimicrobianas demonstradas inicialmente em ensaios *in vitro* sobre uma ampla gama de microrganismos podem ser selecionados para posterior avaliação *in vivo*.

6.2. BIOENSAIOS IN VITRO COM PLANTAS DE FUMO

Doenças bacterianas são uma das principais causas de redução da produção em lavouras e não existem produtos eficientes para o controle da maioria dessas doenças. Proteínas ricas em glicina descritas na literatura demonstraram diversas funções em plantas. Pelegrini et al (2009) relata a ação de proteínas ricas em glicina como reguladores pós-transcricionais sob condições de estresse e conseqüentemente no controle da expressão genes em diversas espécies de plantas (Pelegrini, 2008). O experimento de inoculação das folhas de tabaco com a *Pectobacterium carotovorum* mostrou uma redução na severidade da doença nas plantas transgênicas, comparadas com as controle (não transgênicas), sendo que o grau no avanço da lesão variou entre as linhagens, mostrando resultados similares para as linhagens P04 e P10 comparativamente à planta não transgênica. Este fato pode ser devido à alta agressividade da *P. carotovorum subsp. carotovorum*, capaz de fazer os tecidos infectados entrarem em colapso em poucas horas (Barra et al,

2009). Estes resultados podem ser explicados através dos resultados de Pinto (2012), que analisou a expressão do gene no extrato bruto de plantas de tabaco transformadas com Pg-AMP₁ e observou que as linhagens P04 e P10 não apresentaram a presença da proteína através da técnica de Western Blot. No entanto, a linhagem P04 apresentou inibição do crescimento de *Xanthomonas*, sugerindo que a proteína pode não ter sido expressa em quantidades suficientes. No caso da linhagem P10 a planta não mostrou ação contra o microrganismo testado e não revelou a presença da proteína através da técnica de Western Blot. Este fato mostra que provavelmente o gene foi inserido no genoma da planta, mas não foi capaz de ser transcrito, pois também não apresentou inibição do crescimento de *Xanthomonas*. No caso das linhagens P1 e P11, Pinto (2012) observou a presença da proteína na técnica de Western Blot e as duas linhagens foram capazes de inibir o crescimento da bactéria *Xanthomonas*. No entanto, no nosso ensaio a linhagem P1 apresentou sintomas severos em comparação com a linhagem não transgênica, este fato pode ser devido à diferença de níveis de expressão da proteína nas folhas da linhagem P1, originando assim menor resistência a *Pectobacterium* quando comparada a *Xanthomonas*. Segundo Pelegrini et al. (2008), a forma provável de ação do Pg-AMP₁ se dá pela ligação do peptídeo à superfície da membrana celular do patógeno, levando à formação de poros. A tecnologia de transformação de plantas consiste basicamente na integração eficiente de DNA exógeno no genoma da planta e a regeneração de plantas transgênicas. As principais limitações das atuais tecnologias são integração aleatória de transgenes no genoma do hospedeiro e da capacidade de regeneração dependendo do genótipo e do baixo número de células transformadas (Rakosytican et al, 2010). Vários fatores podem estar relacionados à expressão variável ou a ausência de expressão dos transgenes, incluindo efeitos relacionados ao número de cópias e à integração aleatória do transgene em sítios não específicos no genoma da planta, além o DNA exógeno pode sofrer rearranjos antes mesmo da integração e alterar a expressão gênica devido aos efeitos de hipermetilação do DNA.

6.3. TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS DE BATATA

As citocininas e auxinas são os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos. O tipo e a concentração influenciam na regeneração *in vitro*, onde normalmente a melhor faixa fica entre 0,5 e 5,0 mg/L para ambos fitoreguladores. Segundo Molla et al (2011) freqüentemente se induz a formação de calos em explantes cultivados em meio contendo auxina, ou com uma alta relação citocinina/auxina. Em Asterix foi observado uma variação grande no percentual de regeneração com diferentes reguladores de crescimento. Por esta razão, vários protocolos têm sido testados para transformação genética de batata, onde várias citocininas têm sido testadas em particular a Zeatina e o TDZ (tidiazurom), pelo fato de elas reduzirem a fase de calos e acelerarem a formação de brotos. Para selecionar possíveis explantes transformados a partir de várias explantes, todos os explantes foram transferidos para Meio MS contendo Canamicina. A sensibilidade dos explantes foi testada contra três concentrações de canamicina 25, 50 e 100 mg / L. Nas séries I e II foram usadas as concentrações 100 e 50 mg/L de canamicina e não foi observada a regeneração de explantes em nenhum dos meios testados. Estes resultados podem ser devido a não tolerância dos explantes a elevadas concentrações de canamicina por elevados períodos de tempo. Khatum et al (2012) em seu estudo de transformação genética de batata das cultivares Cardinal e Heera observaram que a canamicina apresentou função inibitória a longo prazo sobre o crescimento das plantas. Além disso, a presença de canamicina prejudica consideravelmente o crescimento dos explantes e como resultado, muitos possíveis transformantes podem ter sido perdidos ao longo do processo seletivo em meio com canamicina. Os resultados apresentados na presente pesquisa mostram que os diferentes explantes responderam de forma diferente aos diferentes tratamentos submetidos, e pode-se observar que a porcentagem de regeneração foi fortemente influenciada pelo tipo de explante. Assim, o uso de microtubérculo como explante mostrou-se eficaz no processo de transformação da batata na cultivar Asterix, contrariamente ao explante entrenó que não apresentou eficiência. Resultados similares foram obtidos por Esfahani et al (2010) na transformação de batata, cultivar Savalan com genes de fungos parasitas, quitinases e β -1,3-glucanase, que conferem resistência a *Rhizoctonia solani* AG-3. Utilizando como explante o

microtubérculo foram obtidas 8 plantas transgênicas de eventos diferentes (Esfahani et al, 2010). Resultados semelhantes foram encontrados por Shin et al (2011) , que obtiveram 53% e 40% de regeneração de batata nas cultivares Japoong e Namjak no processo de transformação com microtubérculo. No entanto, foi observado que as cultivares respondiam de maneira diferente no processo regeneração quanto ao uso de explante entrenó e microtubérculo. Shin et al (2011) observaram que ao usar o explante entrenó obteve 63% de regeneração e contra nenhum explante microtubérculo na cultivar Sumi. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o explante microtubérculo seja mais eficaz no processo de regeneração *in vitro* no processo de transformação genética de batateira da cultivar Asterix.

7. CONCLUSÕES

- O peptídeo recombinante purificado apresentou atividade contra bactérias gram-negativas *Pectobacterium atrosepticum* e *Pectobacterium carotovorum*;
- O peptídeo Pg-AMP₁ expresso em folhas de fumo apresentou ação contra a bactéria *Pectobacterium carotovorum*;
- O explante microtubérculo mostrou eficiente no processo de transformação genética de batateira da cultivar Asterix.

8. PERSPECTIVAS

A continuidade do trabalho com plantas de batata transformadas com o peptídeo antimicrobiano Pg-AMP₁ pode objetivar as seguintes etapas:

- Avaliar a expressão do peptídeo nas linhagens transgênicas de batata obtidas;
- Realizar o processo de aclimação das plantas transgênicas;
- Realizar bioensaio *in vivo* nas plantas e tubérculos de batata com as bactérias patogênicas de plantas *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Ralstonia solanacearum* e *Dickeya sp.*

9 – BIBLIOGRAFIA

- ADRIAENSSENS, E. M.; VAERENBERGH, J. V.; VANDENHEUVEL, D.; DUNON, V.; CEYSSENS, P. T.; PROFT, M.; KROPINSKI, A. M.; NOBEM, J. P.; MAES, M.; LAVIGNE, R. 2012. T4-Related Bacteriophage LIMEstone Isolates for the Controlo f Soft Rot on Potato caused by “ *Dickeya solani*”. **PLoS ONE, Volume 7**, Issue 3.
- ALMEIDA, H. O. 2007. **Identificação de Peptídeos Antimicrobianos de Folhas de Berinjela para o Controle de Patógenos de Plantas**. Dissertação de Mestrado. UFV
- ANDRADE, G. M.; SARTORETTO, L. M.; BRASILEIRO, A. C. M. 2003. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium spp.* **Fitopatologia Brasileira 28**: 465 – 476.
- ARIF, H.; THOMAS, P. E.; CROSSLIM, J. M.; BROWN, C. R. 2009 *Agrobacterium* – Mediated transformation of potato using PLRV –REP and PVY CP genes and assesment of replicase mediated resistant against natural infection of PLRV. **Pak. J. Bot 41 (3)**: 1477 – 1488.
- BARD, E.; MABROUK, Y.; RAKHA, F.; AND GHAZY, A. H. 2008. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Potato and Analysis of Genomic Instability by RAPD. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 4 (1)**: 16-25.
- BEAUJEAN, A.; SANGWAN, R. S.; LECARDONNEL. A; SANGWAN – NORREEL, B. S. 1998. *Agrobacterium* – mediated transformation of three economically importante potato cultivars using sliced interned explants: an efficient protocol of transformation. **Journal of Experimental Botany, Volume 49, N°326**: 1589 – 1595.

- BENKO-ISEPPON, A. M; GALDINO. S. L.; JUNIOR, T. C.; KIDO, E. A.; TOSSI, A.; BELARMINO, T. C.; CROVELLA, S. 2010. Overview on Plant Antimicrobial Peptides. **Current Protein and Peptide Science**, **11**, 181-188.
- BENELLI, A. I. H; , DERDIN, N. D; FORCELINI, C. A; DUARTE, V. 2004. Reação de Cultivares de Batata à Podridão Mole Causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e por *P. chrysanthemi*. **Fitopatologia Brasileira** **29**: 155- 159.
- BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. 1998. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa. 309 p.
- BROGDEN, KA. 2005 Antimicrobial peptide spore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* ;3:238–50.
- DEY, M.; BAKSHI, S.; GALIBA. G.; SAHOO, L.; PANDA, S.K. 2012. Development of a genotype independent and transformation amenable regeneration system from shoot apex in Rice (*Oryza sativa*) using TDZ. **Biotech** **2**: 233 – 240.
- ENGEL, F.1970. Exploration of the Chilca Canyon.Reserch Report Current **Anthrop.** **V 11**. 55-58.
- EPAGRI. 2002. Sistema de produção para batata-consumo e batata-semente em Santa Catarina. Florianópolis (SC.). **Sistema de produção**, 123p
- ESFAHANI, K.; MOTALLEB, M.; ZAMANI, M. R.; SOHI, H. H.; JOURABCHI, E. 2010. Transformation of potato (*Solanum tuberosum* cv. Sanalan) by chitinase and β – 1,3, gluconase genes of myco – parasitic fungi toward improving resistance to *Rhizochonia solani* AG – 3. **Iranian Journal of Biotechnology, Volume 8, Nº2**
- FAN, F.; WU, Y.; LIU, J. 2010. Expression and purification of two different antimicrobial peptides, PR-39 and Protegrin-1 in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification** **73**: 147–151.
- FIGUEIREDO, C. 2003. A batata no Estado do Rio Grande do Sul. In: O cultivo de batata na região sul do Brasil. Brasília: **Embrapa informações tecnológicas**. 44-52.

- GANAPATHI, T. R.; GHOSH, S. B.; LAXMI, N. H. S.; BAPAT, V. A. 2007. Expression of an antimicrobial peptide (MSI-) confers enhanced resistance to *Aspergillus niger* in transgenic potato. **Indian Journal Biotechnology**, Vol 6, pp 63-66.
- GAO, A. G.; HAKIMI, S. M.; MITTANCK, C. A.; WU, Y.; WOERNER, B. M.; STARK, D. M.; SHAN, D. M.; LIANG, J.; ROMMENS, C. M. T. 2000. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide.
- GUIMARÃES, C. S.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A. C. M. 2003. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, Volume 13, Nº 1: 167 - 178
- KHAN, R.S.; NISHIHARA, M.; YAMAMURA, S.; NAKAMURA, I.; MII, M. 2006. Transgenic potatoes expressing wasabi defensin peptide confer partial resistance to Gray mold (*Botrytis cinerea*). **Plant Biotechnology** 23: 179 – 183.
- KHATUN, A.; HASAN, M. M.; BACHCHU, M. A. A.; MONIRUZZAMAN, M.; NASIRUDDIN, K. M. 2012. Agrobacterium-mediated Genetic Transformation of Potato (*Solanum tuberosum* L.) var. Cardinal and Heera. **The Agriculturists** 10 (1): 81-86.
- KOVALSKAYA, N.; ROSEMARIE, Y. Z.; HAMMOND, W. 2012. Antibacterial and Antifungal Activity of a Snakin-Defensin Hybrid Protein Expressed in Tobacco and Potato Plants. **The Open Plant Science Journal** 5: 29-42.
- KOVALSKAYA, N. & HAMMOND, R. W. 2009. Expression and functional characterization of the plant antimicrobial snakin-1 and defensin recombinant proteins. **Protein Expression and Purification** 63: 12–17.
- LOPES, C. A.; DUARTE, V.; CARVALHO, J. B. 2010. Erwinia em batata: Novos nomes, novos e velhos problemas. **Revista Batata Show - Ano 10, Nº 27**
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biology Chemistry** 193 265-275.

- MANGEON, A.; JUNQUEIRA, R. M.; MARTINS, G. S. 2010. Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. **Plant Signaling & Behavior** **5:2**, 99-104.
- MOLLA, M. M. H.; NASIRUDDIN, K. M.; HAQUE, M. AL-AMIN. M. S.; MANIRUZZAMAN. 2012. STANDARDIZATION OF PROTOCOL FOR AGROBACTERIUM -MEDIATED TRANSFORMATION IN POTATO (*Solanum tuberosum* L.). **Bangladesh J. Agril. Res** **37** 185-194.
- MOLLA, M. M. H.; NASIRUDDIN, K. M.; AL- AMIN, M.; KHANAM, D.; SALAM, M. A. 2011. Effect OF GROWTH REGULATORS ON DIRECT REGENERATION OF POTATO. **IPCBEE, Volume 12**
- MONTENSINOS, Emilio. 2007. Antimicrobial peptides and plant disease control. **FEMS Microbiol Lett** **270** 1–11.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiology Plant.** **15**:473–497.
- NETO, A. F. L. 2005. **Avaliação da resistência de clones e cultivares de batata à murcha bacteriana**. Tese de Doutorado, UB, Brasília – DF
- PARACHIN, N. S.; MULDER, K. C.; VIANA, A. A. B.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. 2012. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. **Peptides** **38**, 446-456.
- PELEGRINI, P. B.; MURAD, A. M.; SILVA, L. P.; SANTOS, R. C. P.; COSTA, F. T.; TAGLIARI, P. D.; JUNIOR, C. B.; NORONHA, E. F.; MILLER, R. N. G.; FRANCO, O. L. 2008. Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against Gram-negative bacteria. **Peptides** **29**: 1271 – 1279.
- PELEGRINI, P. B. 2007. **Peptídeos vegetais: Novas ferramentas no controle de patógenos humanos e de plantas**. Tese de Doutorado. UCB, Brasília – DF
- PINTO, N. A. 2012. **Transformação Genética de Fumo visando controle de *Fusarium oxysporum* via Oxalato Descarboxilase e resistência a**

- Xanthomonas fragariae* via peptídeo antimicrobiano PgAMP₁.** Tese de Mestrado. UFJF. 118pp
- PITZSCHKE, A. E.; HIRT, H. 2010. New insights into an old story: Agrobacterium induced tumor formation in plants by plant transformation. **The EMBO Journal**, **Volume 29, Nº6**: 1021-1032.
- RAKOSY-TICAN, E.; AURORI, A.; DIJKSTRA, C.; MAIOR, M. C. 2010. Generating marker free transgenic potato cultivars with an hairpin construct of PVY coat protein. **Romanian biotechnological letters VOL. 15**, NO. 1, Supplement
- RIBAS, A. D. 2007. **Detecção de *Pectobacterium carotovorum subsp. Brasiliensis* em Plantas de Batata através de PCR com oligonucleotídeos iniciadores a partir de sequências de genes *pnl* E *rdg*.** Dissertação de Mestrado. UFRS, Porto Alegre – RS
- RIVERO, M.; FURMAN, N.; MENCACCI, N.; PICCA, P.; TOUM, L.; LENTZ, E.; BRAVO-ALMONACID, F.; MENTABERRY, A. 2012. Stacking of antimicrobial genes in potato transgenic plants confers increased resistance to bacterial and fungal pathogens. **Journal of Biotechnology 157**: 334– 343
- SANTANA, B. G. 2009. **Diversidade de isolados brasileiros de *Ralstonia solanacearum* da biovar 2.** Tese de mestrado, UCB, Brasília – DF
- SANTARÉM, E. R. 2000. Métodos Eficientes para Transformação de Plantas. **Revista de Ciência e Tecnologia 15**. 81-90.
- SANTOS, R. B.; VIANA, V. F.; TREVISOLI, S. H. V.; LEITE, D. C.; DI MAURO, A. O. 2011. Otimização de protocolo de transformação genética via biobalística. **Ciência e Tecnologia: FATEC – JB, Jaboticabal, Volume 3**
- SARKAR, D. 2008. The signal transduction pathways controlling in planta tuberization in potato: an emerging synthesis. **Plant Cell 27**. 1-8.
- SARKER, R. H.; MUSTAFA, B. M. 2002. Regeneration and Agrobacterium mediated Genetic Transformation of two indigenous Potato Varieties of Bangladesh. **Plant Tissue Cult 12 (1)**: 69 – 77.
- SHIN, D. Y.; SEONG, E. S.; NA, J. K.; YOO, J. H.; KANG, W. H.; GHIMIRE, B. K.; LIM, J. D.; YU, C. Y. 2011. Condition for regeneration and transformation glutathione S- transferase (GH-5) gene. **African Journal of Biotechnology, Volume 10 (67)**: 15235 – 15141.

- SOUZA, Z. S. 2003. Ecofisiologia. In: PEREIRA, A. S.; DANIELS, J. (Ed). O cultivo da batata na região sul do Brasil. **Embrapa Informação Tecnologia**, 80-104.
- TAVARES, L.S.; RETTORE, V.J.; FREITAS, R.M.; PORTO, W.F.; DUQUE, A.P.N.; SINGULANI, J.L.; SILVA, O.N.; DETONI, M.L.; VASCONCELOS, E.G.; DIAS, S.C.; FRANCO, O.L.; SANTOS, M.O. 2012. Antimicrobial Activity of Recombinant Pg-Amp₁, a Glycine-Rich Peptide from Guava Seeds. **Peptides**, **37**: 294-300.
- TAVARES, L. S. 2009. **Atividade antimicrobiana do Pg-AMP1 recombinante, um peptídeo rico e glicina, isolado de Goiaba (*Psidium guajava* L.)**. Tese de mestrado. UFJF, Juiz de Fora.
- TUMELERO, A. I. 2003. **Identificação e Quantificação de Pectobacterium SP. Em tubérculo-semente de cultivares de batata**. Tese de mestrado. UPF
- YUPING, L. & GALLO, R. L. 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends in Immunology**, **30**: 131-141
- ZHANG, H.; ZHANG, D.; CHEN, J.; YANG, Y.; HUANG, Z.; HUANG, D.; WANG, X-C.; HUANG, R. 2004. Tomato stress-responsive factor TRSF1 interacts with ethylene responsive element GCC box and regulates pathogen resistance to *Ralstonia solanacearum*. **Plant Molecular Biology** **55** : 825-834.
- WANG, G.L.X.; WANG, Z. 2009. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic Acids Research** **37**: 933-37. (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>).