

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

SUPEREXPRESSION DO GENE CODIFICANTE DO PEPTÍDEO AtPep1 EM *A. THALIANA* VISANDO A OBTENÇÃO DE RESISTÊNCIA À ISOLADOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DO GÊNERO *PYTHIUM*.

Ana Paula Trivilin
Bióloga/Unisinós

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração Fitossanidade

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2008

DEDICO

Aos meus queridos pais, Alcides Trivilin e Neiva Terezinha Turchet Trivilin que compartilharam dos meus sonhos e ideais. Que com uma simples palavra, um gesto ou até mesmo com um olhar me fizeram perceber que sou capaz, meu eterno agradecimento pela grandeza com que souberam estar presentes, valorizando cada conquista.

Aos meus irmãos, Daniel, Sandra e Fábio e os meus sobrinhos, Júnior, Leti, Anthony e Júlia, legado de carinho e amor.

Ao Rodrigo, meu muito obrigado, quando mais precisei sua compreensão e amor preencheu meus dias de ausências necessárias, agradeço-lhe pelo seu apoio incondicional, seu carinho, cumplicidade e paciência.

*“Não somos o que deveríamos ser; não somos o que queríamos ser;
mas graças a Deus, não somos o que éramos.”(Martin Luther King)*

AGRADECIMENTOS

À Deus acima de tudo.

Aos pesquisadores da Embrapa Uva e Vinho, em especial Dr. Osmar Níckel e Dra. Regina Beatriz Bernd pelo apoio e incentivo, fundamentais desde o início deste processo.

Ao professor e orientador Marcelo Gravina de Moraes, pelos seus ensinamentos científicos e éticos, pela sua dedicação, incentivo e paciência.

Aos meus colegas e amigos do LFM com quem convivi parte ou todo período de mestrado, André, Adri, Adriano, Diego Elis, Fer, Jefi, Johannes, Leo, Paula, Tati. Em especial à Moni pelos ensinamentos, pelo companheirismo, pela amizade e apoio durante os momentos alegres e difíceis que tivemos em comum ao longo destes dois anos

Ao pessoal do Laboratório de Entomologia, que sempre me acolheram com muito carinho.

Aos professores do departamento de Fitossanidade pelos ensinamentos e trocas de experiências.

Aos funcionários do departamento de Fitossanidade.

À secretária do programa de Pós-graduação em Fitiotecnia, Marisa Carvalho Bello.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, pelo ensino gratuito e de qualidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio financeiro através da bolsa de estudos que viabilizou a realização deste trabalho.

À Universal Leaf Tabacos LTDA, pela disponibilização dos isolados de *Pythium* spp. da coleção do LFM, utilizados neste trabalho.

Ao colega Jéferson Mateus Dariva pela obtenção dos isolados de *Pythium* spp. utilizados neste trabalho.

À minha amiga e companheira Aline Nondillo, pela paciência, carinho e momentos de descontração.

Aos meus amigos de longa data que se fazem sempre presentes em todos os momentos, Ale e Si, Adro e Grazi, Ro e Gi, Sal e Keli, Fabi, Johnny e Cris.

À minha prima Marinácia pela atenção e carinho, revelados nestes últimos dois anos.

Enfim a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

SUPEREXPRESSÃO DO GENE CODIFICANTE DO PEPTÍDEO AtPep1 EM *A. THALIANA* VISANDO A OBTENÇÃO DE RESISTÊNCIA À ISOLADOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DO GÊNERO *PYTHIUM*¹

Autor: Ana Paula Trivilin

Orientador: Marcelo Gravina de Moraes

RESUMO

As plantas estão expostas a uma gama de patógenos que utilizam diversas estratégias para infectar seus hospedeiros. Em resposta, as plantas expressam diferentes mecanismos de defesa, onde ocorre o reconhecimento de moléculas conservadas do patógeno por receptores específicos das plantas, desencadeando as respostas de defesa. A descoberta de sinais endógenos e exógenos que regulam a expressão de genes de defesa em *Arabidopsis thaliana* tem auxiliado a compreensão dos mecanismos de defesa. O desenvolvimento de uma estratégia de superexpressão para avaliação do papel do peptídeo endógeno AtPep1 na resistência a isolados de diferentes espécies do gênero *Pythium* é importante para a compreensão do mecanismo de defesa e a futura utilização do mesmo em cultivares resistentes ao patógeno. Nesse sentido, foram realizados experimentos que consistiram da inoculação de *A. thaliana* com isolados das espécies de *P. graminicola*, *P. inflatum*, *P. deliense* e *P. ultimum*. As plantas foram avaliadas quanto à presença de sintomas da doença. Paralelamente, o gene codificante do peptídeo AtPep1, *PROPEP1*, foi isolado de *A. thaliana*, ligado nos vetores binários pGSA1427 ou pEGAD, e transformados em *Agrobacterium tumefaciens*. Células de *A. tumefaciens* contendo os plasmídeos com e sem *PROPEP1* foram usadas para transformação floral de *A. thaliana*. As plantas transformadas foram selecionadas pela presença do gene que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio e, no caso da planta transformada com o vetor pEGAD, também pela presença da GFP (proteína verde fluorescente). A presença dos genes inseridos foi confirmada por PCR seguido de seqüenciamento. As plantas transformadas foram avaliadas quanto ao acúmulo de mRNA de *PROPEP1* e a resistência aos isolados do gênero *Pythium*. Os resultados indicam que plantas tipo selvagem de *A. thaliana* são suscetíveis aos isolados das diferentes espécies do gênero *Pythium*. As plantas pEGAD-AtPep apresentaram um aumento na expressão relativa de *PROPEP1* de até 4.000 vezes a encontrada nas plantas controle. Este alto acúmulo de *PROPEP1* nas plantas pEGAD-AtPep e pGSA-AtPep revelou ser importante na resistência ao isolado de *P. deliense*. As evidências suportam o papel do peptídeo AtPep1 como um elicitor endógeno que é gerado em resposta aos patógenos e suas PAMPs.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (107p.) Março, 2008.

OVEREXPRESSION OF THE GENE THAT CODES FOR THE PEPTIDE *AtPep1* IN *A. THALIANA* IN ORDER TO OBTAIN RESISTANCE TO ISOLATES OF DIFFERENT SPECIES OF THE GENUS *PYTHIUM*¹

Author: Ana Paula Trivilin
Adviser: Marcelo Gravina de Moraes

ABSTRACT

Plants are exposed to a range of pathogens that use several strategies to infect their host. In response, the plants express different mechanisms of defense, in which the recognition of conserved pathogen molecules by plant specific receptors triggers the defence responses. The discovery of exogenous and endogenous signals that regulate the expression of defense genes in *Arabidopsis thaliana* has helped the understanding of the mechanisms of defense. The development of a strategy of overexpression for evaluating the role of endogenous peptide *AtPep1* in resistance to isolates of different species of the genus *Pythium* is important for understanding the mechanism of defense and its future use in resistant cultivars to the pathogen. Therefore, experiments that were performed consisted in the inoculation of *A. thaliana* with isolates of the of *P. graminicola*, *P. inflatum*, *P. deliense*, and *P. ultimum* species. The plants were evaluated for the presence of disease symptoms. In addition to that, the gene coding the peptide *AtPep1*, *PROPEP1* was isolated from *A. thaliana*, ligated in the binary vectors pGSA1427 or pEGAD, and transformed in *Agrobacterium tumefaciens*. Cells of *A. tumefaciens* containing the plasmids with or without *PROPEP1* were used to floral transformation of *A. thaliana*. The transformed plants were selected for the presence of the gene that confers tolerance to the herbicide ammonium glufosinate and, in the case of plants transformed with the vector pEGAD, they were also selected for the presence of GFP (green fluorescent protein). The presence of the inserted gene was confirmed by PCR followed by sequencing. The transformed plants were evaluated on the accumulation of mRNA from *PROPEP1* and resistance to isolates of the genus *Pythium*. The results indicate that *A. thaliana* wild type plants are susceptible to isolates from various species of the genus *Pythium*. The pEGAD-*AtPep* plants showed an increase in the expression of *PROPEP1* of up to 4.000 times more than that was found in control plants. Such high accumulation of *PROPEP1* in pEGAD-*AtPep* and pGSA-*AtPep* plants was shown to be important in resistance to the isolate of *P. deliense*. The evidences support the role of the peptide *AtPep1* as an endogenous elicitor that is generated in response to pathogens and their PAMPs.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (107p.) Março, 2008.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 <i>Pythium</i> sp.....	4
2.1.1 Doenças causadas por <i>Pythium</i>	6
2.1.2 Controle.....	9
2.2 Mecanismos de resistência.....	11
2.2.1 Interação patógeno-hospedeiro.....	11
2.2.2 Expressão de genes de resistência a patógenos necrotróficos.....	15
2.2.3 <i>AtPep1</i> , um peptídeo endógeno que amplifica sinais de defesa.....	16
2.3 Genômica funcional.....	19
2.4 Transformação genética de <i>A. thaliana</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i>	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Material vegetal.....	24
3.2 Isolados de <i>Pythium</i> spp e produção de zoósporos.....	25
3.3 Teste de patogenicidade.....	26
3.4 Teste de resistência.....	26
3.5 Seleção <i>in silico</i> de genes relacionados a resistência.....	28
3.6 Vetores.....	29
3.7 Extração de RNA total e isolamento de mRNA.....	31
3.8 Síntese de cDNA.....	32
3.9 Digestão do cDNA de <i>PROPEP1</i>	33
3.10 Digestão dos vetores pGSA1427 e pEGAD.....	33
3.11 Inserção do cDNA de <i>PROPEP1</i> nos vetores de transformação em planta.....	35
3.12 Transformação genética de <i>A. tumefaciens</i>	35
3.13 Identificação de colônias de <i>A. tumefaciens</i> contendo plasmídeos recombinantes.....	36
3.14 Extração de plasmídeos recombinantes.....	37
3.15 Reação de sequenciamento.....	38
3.16 Transformação floral de <i>A. thaliana</i>	39
3.17 Análises fenotípicas.....	40
3.17.1 Seleção de plantas transformadas de <i>A. thaliana</i>	40
3.17.2 Microscopia de epifluorescência.....	41
3.18 Análises genotípicas para detecção dos genes introduzidos nas plantas transformadas.....	42
3.19 Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	43

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 Isolamento e clonagem do cDNA de <i>PROPEP1</i>	45
4.2 Seleção das colônias de <i>A. tumefaciens</i> contendo o cDNA de <i>PROPEP1</i>	45
4.3 Seleção das plantas transformadas de <i>A. thaliana</i>	48
4.4. Quantificação da expressão de <i>PROPEP1</i> em plantas transformadas e inoculadas com <i>Pythium</i> spp.....	52
4.5 Relação entre a expressão de <i>PROPEP1</i> e genes relacionados a respostas de defesa em plantas transformadas.....	55
4.6 Localização subcelular de GFP:: <i>PROPEP1</i>	58
4.7 Patogenicidade de diferentes isolados de <i>Pythium</i> spp. a <i>A. thaliana</i>	61
4.8 Patogenicidade de diferentes isolados de <i>Pythium</i> spp. a <i>A. thaliana</i> transformadas com os vetores pEGAD e pEGAD-AtPep.....	66
4.9 Patogenicidade de diferentes isolados de <i>Pythium</i> spp em <i>A. thaliana</i> transformadas com os vetores pGSA e pGSA-AtPep.....	72
5.0 CONCLUSÕES.....	75
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Oligoiniciadores específicos usados para PCR e RT-qPCR.....	29
2. Análise da eficiência da transformação floral de <i>A. thaliana</i>	51
3. Percentual de sobrevivência da progênie T2 de plantas pEGAD e pEGAD-AtPep.....	67
4. Comprimento de raiz (cm) da progênie T2 de plantas pEGAD e pEGAD-AtPep.....	71
5. Percentual de sobrevivência da progênie T2 de plantas pGSA e pGSA-AtPep.....	73

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Modelo proposto para a via de amplificação da sinalização de PAMPs e peptídeos <i>AtPep</i> em <i>A. thaliana</i>	18
2. Estruturas relevantes do vetor binário pGSA1427.....	29
3. Estruturas relevantes do vetor de fusão cDNA:EGFP construído a partir do vetor binário pEGAD.....	30
4. Eletroforese em gel de agarose com fragmentos amplificados de <i>PROPEP1</i>	47
5. Efeito do herbicida glufosinato de amônio (Finale) na seleção de plantas T1 de <i>A. thaliana</i>	49
6. Expressão relativa do gene codificante do peptídeo <i>AtPep1</i>	54
7. Expressão relativa do gene PDF1.2.....	56
8. Localização subcelular de GFP em plantas T2 de <i>A. thaliana</i> , transformadas com o vetor pEGAD e pEGAD- <i>AtPep</i>	60
9. Estruturas observadas em raízes de plântulas de <i>A. thaliana</i> inoculadas com isolados de diferentes espécies do gênero <i>Pythium</i>	62
10. Incidência de plantas de <i>A. thaliana</i> com amarelecimento.....	63
11. Incidência de plantas mortas de <i>A. thaliana</i>	65
12. Percentual de sobrevivência da progênie T2 de plantas pEGAD e pEGAD- <i>AtPep</i>	68
13. Comprimento radicular da progênie T2 de plantas pEGAD e pEGAD- <i>AtPep</i>	70
14. Comprimento radicular (cm) da progênie T2 de plantas pEGAD e pEGAD- <i>AtPep</i>	72
15. Percentual de sobrevivência da progênie T2 de plantas pGSA (evento pGSA-17) e pGSA- <i>AtPep</i> (eventos pGSAtPep-01 e pGSAtPep-02).....	74

RELAÇÃO DE APÊNDICE

	Página
1. Seqüência de nucleotídeos do vetor pGSA 1427.....	86
2. Seqüência de nucleotídeos do vetor pEGAD.....	89
3. Seqüência de nucleotídeos do gene codificante do peptídeo <i>AtPep1</i> e dos plasmídeos pEGAD e pGSA, obtidos pelo seqüenciamento.....	93
4. Resumo dos dados obtidos da expressão relativa de <i>PROPEP1</i>	94
5. Resumo dos dados obtidos da expressão relativa de PDF1.2.....	95

1 INTRODUÇÃO

As plantas estão continuamente expostas a um grande número de patógenos. A classe dos oomicetos os gêneros *Phytophthora* e *Pythium* inclui alguns dos mais agressivos gêneros de patógenos. Os patógenos do gênero *Pythium*, além de apresentarem uma ampla gama de hospedeiros, possuem uma vasta diversidade de fatores que afetam a infecção, como temperatura, pH, conteúdo de água no solo e presença de outros microorganismos. Além disso, diferentes espécies do gênero *Pythium* variam quanto à severidade da doença causada em diferentes hospedeiros. Espécies patogênicas deste gênero causam tombamento em plântulas e podridões radiculares, sendo responsáveis por grandes reduções na produtividade nas culturas de alface, pepino, tomate, fumo, milho, entre outras.

Patógenos necrotróficos, como no caso de *Pythium*, secretam enzimas que degradam a parede celular das plantas. Nesse tipo de interação, a existência de plantas resistentes é dificultada pela não especificidade e agressividade dessas toxinas. Ao contrário do que ocorre com a resistência contra patógenos biotróficos, os componentes-chave envolvidos no mecanismo de resistência contra patógenos necrotróficos são ainda pouco conhecidos.

A resistência das plantas contra a infecção de patógenos está relacionada com a expressão coordenada de respostas de defesa ativadas após a infecção. A

ativação dessas respostas em parte depende da eficiência do hospedeiro em reconhecer a presença do patógeno, através de mecanismos de percepção e transdução de sinais.

Nos últimos anos, estudos de mecanismos de defesa, especialmente em *A. thaliana*, têm auxiliado a compreensão de sinais endógenos e exógenos que regulam a expressão de genes de defesa em plantas. Receptores celulares com regiões repetidas ricas em leucina (LRR) desempenham um papel importante, pois monitoram a presença de moléculas associadas ao patógeno (Pathogen-associated molecular patterns - PAMPs) e iniciam uma rápida expressão de genes de defesa. As PAMPs também ativam a expressão de genes que codificam uma família de peptídeos endógenos (*AtPep*) e seu receptor (PEPR1) que amplificam a sinalização de defesa iniciada pelas PAMPs. O desenvolvimento de uma estratégia de superexpressão para avaliação do papel do peptídeo endógeno *AtPep1* na resistência a isolados de diferentes espécies do gênero *Pythium* é importante para a compreensão do mecanismo e a futura utilização do mesmo em cultivares resistentes ao patógeno.

Devido à carência de conhecimentos sobre os mecanismos de resistência a patógenos do gênero *Pythium* e de cultivares resistentes, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta de *A. thaliana* à infecção por isolados de distintas espécies do gênero *Pythium*, bem como verificar a importância do peptídeo *AtPep1* na resistência a *Pythium* spp.

1.1 Objetivos

Amplificar a via de sinalização de genes de defesa superexpressando o gene codificante do peptídeo *AtPep1*, *PROPEP1*, o qual ativa a transcrição de

defensinas, para obtenção de resistência às espécies de *P. graminicola*, *P. deliense*, *P. inflatum*, *P. ultimum* e *P. dissotocum*.

Avaliar a resposta de *Arabidopsis thaliana* à infecção por isolados de distintas espécies do gênero *Pythium*.

Selecionar por análise *in silico* genes envolvidos com a resistência à *Pythium* sp.

Transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* com gene codificante do peptídeo AtPep1, *PROPEP1* candidatos à resistência a *Pythium* sp.

Comparar plantas transformadas e não transformadas de *A.thaliana* quanto à resistência a *Pythium* sp.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Pythium* sp.

As espécies do gênero *Pythium* pertencem à família Pythiaceae, ordem Pythiales, classe Oomycetes (van West *et al.*, 2003). Este gênero foi estabelecido por Pringsheim em 1858 (Hendrix & Campbell, 1973) e atualmente é composto por mais de 200 de espécies que podem ser encontradas em todo o mundo (Kong *et al.*, 2004). Os omicetos são considerados patógenos de plantas que causam danos severos a várias culturas de importância agrônômica, acarretando perdas econômicas significativas em todo mundo. Entre os omicetos são encontrados patógenos biotróficos como o míldio (ex: *Bremia lactucae*, *Hyaloperonospora parasitica*, *Plasmopara viticola*) e a ferrugem branca (*Albugo* spp.), hemibiotróficos (ex: *Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae*) e os necrotróficos (*Phytophthora cinnamomi*, *Pythium* spp.).

Embora os omicetos apresentem características morfológicas de fungos, como crescimento filamentosos, produzindo micélio em seu estado vegetativo, e formem esporos para reprodução sexual e assexual (Latijnhouwers *et al.*, 2003) eles não são classificados como tais. Características como a presença de celulose na parede celular, hifas cenocíticas e a produção de esporos assexuais flagelados, fizeram com que fossem classificados em um novo reino, Straminipila ou Chromista. Desta forma, eles não estão mais relacionados com fungos

verdadeiros, mas sim com as algas marrons. Esta classificação é estabelecida usando técnicas moleculares que são baseadas nas seqüências de rRNA (Kumar & Rzhetsky, 1996; Van de Peer & De Wachter; 1997; Paquin *et al.*, 1997). Contudo, a taxonomia do gênero *Pythium* foi principalmente baseada nas descrições morfológicas como tamanho e forma do oogônio, anterídeo e esporângio, seguindo chaves dicotômicas descritas por Middleton (1943), Plaats-Niterink (1981), Waterhouse (1967).

Espécies do gênero *Pythium* podem ser encontradas na água e no solo e causam uma diversidade de doenças em plantas, principalmente nas raízes. As infecções causadas por *Pythium* são geralmente limitadas a extremidades meristemáticas, epiderme, córtex das raízes e frutos (Vijayan *et al.*, 1998), mas o patógeno pode penetrar o tecido da planta e atingir o seu sistema vascular, causando infecções mais severas.

Pythium spp. apresentam crescimento saprofítico e, quando as condições ambientais não são favoráveis para o crescimento ou, quando o hospedeiro não está presente, sobrevivem no solo através de estruturas de resistência denominadas oósporos, as quais apresentam paredes espessas e podem se manter viável por mais de 12 anos (Hendrix & Campbell, 1973). Adicionalmente são dispersos via zoósporos com dois flagelos, sendo sua dispersão favorecida em ambientes úmidos ou em solos mal drenados (van West *et al.*, 2003). Estruturas como os zoósporos, oósporos e fragmentos de hifa, podem ser consideradas fontes potenciais de inóculo, atuando no processo de infecção dos hospedeiros. O zoósporo é considerado o inóculo inicial (primário) e uma das principais estruturas de disseminação do patógeno na cultura hidropônica (Stanghellini *et al.*, 1996; Owen-going *et al.*, 2003).

A capacidade de cada espécie de causar infecção depende de diversos fatores como a densidade do inóculo, conteúdo de água no solo, temperatura, pH, intensidade da luz e presença de outros microrganismos (Plaats-Niterink, 1981). O sucesso da infecção depende da produção de esporos e de sua dispersão, além da capacidade de sobrevivência dos zoósporos no sítio de deposição no tecido hospedeiro (Tyler, 2002).

O ciclo de vida completo de *Pythium* consiste de um ciclo assexual e um ciclo sexual. O ciclo assexual é caracterizado pela formação de esporângios nas extremidades das hifas. Os esporângios, por sua vez, são responsáveis pela formação de vesículas, nas quais ocorre a diferenciação dos zoósporos, que nadam na água em busca do tecido do hospedeiro (sementes, raízes, caules ou folhas) onde eles se fixam e encistam. O cisto germina pelo desenvolvimento de um tubo germinativo que pode penetrar o hospedeiro diretamente ou via formação do apressório, que liga-se às raízes e forma a hifa de infecção para penetração no tecido hospedeiro. No ciclo sexual ocorre a fertilização do oogônio (gametângio feminino) pelo anterídio (gametângio masculino), resultando na formação do oósporo. Em um hospedeiro suscetível, sob condições ambientais propícias, o oósporo germina formando então o esporângio, retomando ao ciclo assexual (van West *et al.*, 2003).

2.1.1 Doenças causadas por *Pythium*

Espécies fitopatogênicas do gênero *Pythium* são comuns na rizosfera e em outros tecidos da planta que estão em contato ou próximos ao solo (Kucharek & Mitchell, 2000). Elas apresentam uma ampla gama de hospedeiros e podem causar podridões em frutos, raízes e caules e o tombamento pré ou pós-

emergência de sementes e plântulas, sendo que os tecidos jovens e tenros são preferencialmente infectados (Plaats-Niterink, 1981).

A incidência de podridões radiculares causadas por espécies do gênero *Pythium* é favorecida pela alta umidade presente em sistemas protegidos de produção de mudas de diversas culturas, como o fumo, o tomate e a alface, e apresenta dificuldades no controle da doença (Lopes *et al.*, 2005). O tombamento de plântulas causado por *Pythium* spp. é muito comum e importante para o cultivo hidropônico de plantas, em particular nos estádios iniciais de desenvolvimento das plantas (van West *et al.*, 2003). Quando sementes de plantas suscetíveis são plantadas em solos com a presença do patógeno e são infectadas, elas falham na germinação e acabam desintegrando (Lopes *et al.*, 2005). Estes mesmo autores observaram que plântulas jovens podem ser infectadas antes da emergência em qualquer parte da planta, ocorrendo a rápida colonização e, dessa forma, as células invadidas colapsam levando a morte da plântula.

Em plântulas emergidas, a infecção ocorre geralmente nas raízes e no caule, próximo à linha do solo. Raízes infectadas apresentam podridões moles e úmidas, geralmente na região do colo, devido à liberação de enzimas pectolíticas e celulolíticas, que promovem a colonização do tecido vegetal pelo patógeno através da desintegração do tecido do hospedeiro. As áreas colonizadas tornam-se intumescidas e hialinas, a parte basal do caule das plântulas torna-se mole e muito mais fino que as partes não infectadas acima dele, as plântulas caem sobre o solo, caracterizando o tombamento (Kucharek & Mitchell, 2000; Lopes *et al.*, 2005). No caso de podridões em plantas adultas, a infecção é restrita a tecidos periféricos ou imaturos (Kamoun *et al.*, 1999).

Outro sintoma observado por Kucharek & Mitchell (2000) em plantas que se desenvolveram mesmo na presença do patógeno é o amarelecimento das

folhas, que inicia nas folhas mais jovens, chegando à totalidade da planta. Plantas que sobrevivem, apresentam diminuição na produtividade de grãos e frutos (Hendrix & Campbell, 1973).

A infecção das raízes por *Pythium* ocorre através da entrada do patógeno na planta, que pode acontecer via aberturas naturais como hidatódios, estômatos ou lenticelas, pela penetração através de ferimentos ocasionados por práticas agrícolas, por insetos e nematóides e/ou pela penetração direta na superfície do hospedeiro através das estruturas do oomiceto. Este último processo é iniciado através da quimiotaxia, ocorrendo um movimento direcionado dos zoósporos em direção às raízes, graças à liberação de exsudados pela planta, como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e ácidos graxos (Tyler, 2002), favorecendo a atração química entre os zoósporos e as raízes das plantas. Eles podem mover em resposta a gradientes destes compostos. Mudanças eletrostáticas podem também ser um importante estímulo sensorial para que os zoósporos nadem (Van West *et al.*, 2002).

Em seguida, ocorre o encistamento dos zoósporos na superfície do hospedeiro, sua adesão por meio da liberação de material adesivo produzido pelo patógeno, a produção do tubo germinativo e o desenvolvimento da colônia. Geralmente, as pontas das raízes, os locais de emergência dos pêlos radiculares, as zonas de alongação das raízes e raízes jovens, são os locais preferenciais para a adesão dos zoósporos e a penetração através das estruturas do oomiceto, o que pode ser facilitado pela liberação de enzimas pelo patógeno como as pectinases e outras enzimas como hemicelulases, celulases e proteinases (Plaats-Niterink, 1981; Gold & Stanghellini, 1985; Sutton *et al.*, 2006).

2.1.2 Controle

O tombamento causado por *Pythium* spp. requer diferentes estratégias de controle. Os cultivos devem ser realizados em solos bem drenados e com boa circulação de ar entre as plantas. Como os zoósporos de *Pythium* spp. movem-se rapidamente em água livre, os mesmos podem ser detectados 30 minutos após um local ser alagado (Kucharek & Mitchel, 2000; Kamoun *et al.*, 1999).

Diversas medidas de controle cultural da doença são indicadas para sistemas hidropônicos como irradiação com luz ultravioleta, filtração, ozonização, sedimentação e tratamento térmico (Stanghellini & Rasmussen, 1994;). Estes métodos reduzem a microflora do patógenos, por outro lado, podem também inibir o crescimento de outros microorganismos benéficos, tornando sua eficiência questionável (Paulitz, 2000; Ehret *et al.*, 2001).

Na produção em sistemas protegidos, as doenças causadas por *Pythium* spp. podem ser controladas pelo uso de solo esterilizado via solarização, pelo controle sanitário das mudas a serem transplantadas e pela desinfestação de bandejas e ferramentas de trabalho com compostos à base de cloro e surfactantes (Kamoun *et al.*, 1999). Porém, somente boas práticas culturais não garantem um controle efetivo da doença, sendo necessário, em muitos casos, o uso de estratégias alternativas. No campo, a rotação de cultura é uma ferramenta importante para manejo de algumas doenças de solo. Duas estações consecutivas de cultivo de plantas não hospedeiras reduzem a incidência de doenças causada por *Ralstonia* de 81% para apenas 22-49% (Lemaga *et al.*, 2001), citado por Messiha *et al.* (2007). Porém, uma vez que *Pythium* spp. possuem uma ampla gama de hospedeiros, a rotação de cultura pode não prover um nível de controle adequado. Além disso, por razões econômicas, geralmente

os agricultores são forçados a manter o foco em apenas uma única ou poucas culturas (Termorshuizen *et al.*, 2006).

Geralmente, os estágios iniciais de desenvolvimento são mais suscetíveis à infecção por *Pythium* spp. em plantas hospedeiras (Paulitz & Bélenger, 2001). Deste modo, as sementes devem ser semeadas quando as condições favorecem o rápido crescimento das plantas.

Em sistemas hidropônicos o tratamento químico é pouco indicado por apresentar efeitos negativos como fitotoxicidade às plantas, redução de peso da parte aérea e de raízes, além da contaminação ambiental (Paulitz & Bélenger 2001; Utkhede *et al.*, 2000). Apesar de tratamentos químicos de sementes serem utilizados há várias décadas, fungicidas que contenham mefenoxam, por exemplo, podem causar um efeito negativo sobre o cultivo. Este fungicida, assim como muitos outros, apresenta um espectro de ação pouco amplo, com isso, a população do patógeno desenvolve resistência rapidamente, passando o fungicida a ser pouco efetivo (Kamoun *et al.*, 1999). Além disso, o uso de fungicidas de solo tem sido restringido no mundo devido à alta toxicidade tanto às plantas como ao homem e ao meio ambiente. Com isso, métodos alternativos para o controle de doenças de solo são necessários (Termorshuizen *et al.*, 2006).

O controle de *Pythium* spp. com o uso de microrganismos antagonistas ou micoparasitas tem sido amplamente estudado. Os microrganismos utilizados no controle biológico incluem algumas espécies de *Pseudomonas* spp. (Gravel *et al.*, 2005), *Trichoderma* spp. (Lu *et al.*, 2004) e *Lysobacter* sp. (Folman *et al.*, 2003). A busca por alternativas para substituir o uso de agroquímicos no controle e manejo de doenças veiculadas, tanto pelo solo como pelo sistema hidropônico, vem sendo abordada em diversos trabalhos (Lifshitz *et al.*, 1988; Berry *et al.*, 1993; Rankin & Paulitz 1994; Naseby *et al.*, 2000; Lenhardt, 2000 entre outros). Estes

estudos vêm abordando o uso do controle biológico como alternativa, introduzindo para isto, microrganismos antagonistas no controle de fitopatógenos, porém, seu uso é ainda limitado na agricultura devido à sua inconsistência na atuação. Muitos fatores limitam a sua eficiência, dentre eles, a colonização insuficiente no sítio de infecção, a dificuldade de manutenção da população (necessário para sustentar a atividade de biocontrole) e a produção inadequada de metabólitos antimicrobianos.

Com base no exposto, surge a necessidade do desenvolvimento de alternativas mais eficientes de controle e menos agressivas ao meio ambiente. O desenvolvimento de cultivares que possuam resistência genética durável é a maneira mais eficaz, econômica e segura de controle de doenças causadas por oomicetos (Kamoun *et al.*, 1999). Atualmente as pesquisas têm dirigido esforços na identificação e na incorporação da resistência genética em cultivares comerciais (Gudmestad, *et al.*, 2007). No entanto, até o momento cultivares completamente resistentes não estão comercialmente acessíveis (Zimnoch-Guzowska *et al.*, 2005).

2.2 Mecanismos de resistência

2.2.1 Interação patógeno-hospedeiro

Em seu ambiente natural as plantas estão continuamente sob estresse biótico causado por diferentes espécies, incluindo bactérias, fungos, vírus e insetos. Patógenos de plantas podem ser divididos em duas grandes categorias: os biotróficos e os necrotróficos. Os biotróficos são patógenos que penetram ou estabelecem um contato com as células do hospedeiro, crescem e se reproduzem, nutrindo-se do tecido vivo do hospedeiro. Por outro lado, os patógenos necrotróficos dependem do tecido morto do hospedeiro para sua

nutrição, crescimento e reprodução. Eles secretam enzimas e toxinas que degradam e matam as células do hospedeiro, tornando os nutrientes viáveis para o seu consumo (Glazebrook, 2005).

Para se defender dos patógenos com estas diferentes estratégias de infecção, as plantas tem desenvolvido complexos mecanismos de defesa. Estes incluem fortalecimento de barreiras mecânicas, explosão oxidativa, produção de compostos antimicrobianos e indução de resposta de hipersensibilidade (HR), onde o tecido do sítio da infecção morre, restringindo o crescimento do patógeno e prevenindo a sua propagação (Hammond-Kosack & Parker, 2003). O entendimento dos mecanismos que levam à ativação das respostas de defesa das plantas tem crescido substancialmente nos últimos anos. Esta evolução do conhecimento tem sido facilitada pela clonagem e pela caracterização dos fatores de resistência a doenças das plantas que reconheçam o correspondente fator de avirulência do patógeno desencadeando a HR (Dangl & Jones, 2001).

As plantas codificam centenas de proteínas R que desempenham um papel essencial na defesa contra patógenos biotróficos (Glazebrook, 2005). Elas permitem um rápido reconhecimento do patógeno, desencadeando a resposta de hipersensibilidade, a qual inclui a geração de uma explosão oxidativa e a morte celular programada (PCD). Além disso, um mecanismo geral contra patógenos biotróficos é proposto por Métraux *et al.*, (1990), o qual inclui a síntese de ácido salicílico (SA) como um importante indutor de genes codificantes de proteínas relacionadas à patogênese (PR), que possuem atividade antimicrobiana (Van Loon & Van Strien, 1999). Diversos trabalhos têm sido realizados com mutantes deficientes no acúmulo de SA (como *sid2*) ou insensível a SA (como *npr1*) e tem sido observado um aumento da suscetibilidade a patógenos biotróficos (Gaffney

et al., 1993; Cao *et al.*, 1994; Delaney *et al.*, 1994; Delaney *et al.*, 1995; Lawton *et al.*, 1995; Glazebrook *et al.*, 1996; Nawrath & Métraux, 1999).

No caso de patógenos biotróficos é fácil imaginar que a resistência mediada pelos genes R e a sinalização por SA poderão resultar em resistência, pois a resposta HR poderá privar o patógeno de sua fonte de alimento. No entanto no caso dos necrotróficos, a morte celular programada no hospedeiro poderá facilitar a colonização do patógeno, já que este se alimenta de tecidos mortos (Glazebrook, 2005). Dessa forma, as proteínas R que mediam a resposta de hipersensibilidade e a resistência basal são normalmente ineficientes contra patógenos necrotróficos.

Adicionalmente ao SA, algumas outras moléculas sinalizadoras como o ácido jasmônico (JA) e o etileno (Et), sozinhas ou em associação, tem sido relatadas por regularem aspectos distintos das respostas de defesa das plantas (Kunkel & Brooks, 2002). Evidências genéticas para implicação de JA/Et na resposta a fungos patogênicos também tem sido determinada. Por exemplo, mutantes de *A. thaliana* deficientes na produção de JA (triplo mutante *fad3 fad7 fad8*) ou na percepção deste hormônio (*coi1*, *jin1*, ou *jar1/jin4*) resultaram em uma alta suscetibilidade a diferentes patógenos necrotróficos (Staswick *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 1998, 2001; Vijayan *et al.*, 1998; Kunkel & Brooks, 2002; Lorenzo *et al.*, 2004).

A infecção das plantas por patógenos necrotróficos geralmente resulta na acumulação de JA, o qual ativa genes PR distintos daqueles induzidos por SA (Schenk *et al.*, 2000; De Vos *et al.*, 2005). Estes genes como PDF1.2 e b-CHI codificam proteínas com atividade antifúngica (Solano *et al.*, 1998; Lorenzo *et al.*, 2003). Segundo Thomma *et al.* (1998) mutações que interrompam a sinalização por JA nas plantas resultam no aumento da suscetibilidade a patógenos

necrotróficos, como em *B. cinerea*. Várias observações sugerem que respostas dependentes de jasmonato e etileno atuam contra patógenos necrotróficos (Kunkel & Brooks, 2002; Lorenzo & Solano, 2005;). No caso do gene PDF1.2, existem evidências que a indução deste gene sob infecção de *Alternaria brassicicola* em *Arabidopsis* depende da ação concomitante das duas vias (Penninckx *et al.*, 1996).

Muitos dos patógenos que infectam as raízes são necrotróficos, pois eles matam o tecido hospedeiro com suas toxinas, peptídeos elicitadores, ou enzimas, desencadeando a lise e a morte celular e assim provêm condições favoráveis para o crescimento do patógeno (Okubara & Paulitz, 2005). Alguns destes patógenos têm uma ampla gama de hospedeiros, e a morte celular é freqüentemente induzida por toxinas e ou por enzimas que possuem um substrato específico. Outros necrotróficos produzem toxinas que são efetivas a várias espécies de plantas. Para esta classe de patógenos, a resistência de plantas pode ser alcançada através da perda ou alteração das toxinas alvo ou através da detoxificação.

A patogenicidade compreende todos os processos celulares e moleculares que são necessários para o estabelecimento do patógeno e manutenção do sucesso da infecção (van West *et al.*, 2003). Poucos fatores potencialmente envolvidos na patogenicidade de oomicetos foram identificados até o momento. Estes consistem principalmente de enzimas que degradam a parede celular vegetal como endocelulases, 1,3- β -glucanases, β -glucosidases, cutinases, galactanases e endopoligalacturonases, as quais atuam na penetração no tecido do hospedeiro e na patogênese (van West *et al.*, 2003). Gotesson *et al.* (2002) relataram que as poligalacturanases, enzimas que degradam pectina, são

secretadas durante o crescimento parasítico e saprofítico e é envolvida na invasão dos tecidos de plantas por oomicetos patogênicos.

As plantas podem também secretar enzimas que são capazes de degradar a parede celular do patógeno invasor, como algumas proteínas PR e sua expressão geralmente é induzida sob infecção (Stintzi *et al.*, 1993). No entanto, Rose *et al.* (2002) constataram que oomicetos fitopatogênicos secretam proteínas que podem inibir as proteínas PR, como endo-1,3- β -glucanases secretada pelas plantas.

2.2.2 Expressão de genes de resistência a patógenos necrotróficos

As plantas se defendem da infecção de patógenos pela ativação de genes de respostas de defesa. Uma estratégia de defesa bem sucedida é baseada no reconhecimento de moléculas conservadas dos patógenos (PAMPs) pelos receptores específicos das plantas (Medzhitov & Janeway, 2002). Receptores com regiões repetidas ricas em leucina (LRR) desempenham papel central no monitoramento da presença do patógeno desencadeando uma rápida expressão de genes de defesa.

Durante décadas têm sido reconhecido que componentes da parede celular de fungos e bactérias podem ativar mecanismos de defesa em plantas (Boller, 1995). Entre estes componentes pode-se citar elicitores β -glucanos, fragmentos de quitina, lipopolissacarídeos, glicopeptídeos e proteínas, que vão interagir com receptores na superfície celular ou no citoplasma das plantas, para iniciar uma rápida resposta de defesa da planta contra patógenos. A caracterização destes componentes celulares envolvidos na tradução de sinais e o entendimento do papel de sinais moleculares da defesa em plantas são beneficiados pelo isolamento e análise de mutantes com resposta de defesa alterada (Kunkel &

Brooks, 2002; Durrant & Dong, 2004). Estes estudos são de grande importância para um entendimento do reconhecimento do patógeno pela ativação de respostas de defesa na planta. Genes como *OCP3*, o qual codifica um fator de transcrição que regula diferentes aspectos da resposta de defesa em plantas, quando superexpresso, media a via de jasmonato para patógenos necrotróficos (Coego *et al.*, 2005).

A sinalização dependente de JA/Et atua através do aumento da síntese de jasmonato e etileno, respectivamente, em resposta ao ataque de patógenos e conseqüentemente aumenta a expressão de genes de defesa, como PDF1.2 (Glazebrook, 2005). Adicionalmente, trabalhos com plantas transgênicas realizados por Berrocal-Lobo *et al.* (2002) também indicam a atuação destes hormônios na resistência contra diferentes patógenos. Os autores verificaram que a expressão constitutiva de ERF1, um componente da via de sinalização do etileno, aumenta resistência a *Botrytis cinerea* e *Plectosphaerella cucumerina*.

Outro importante gene recentemente descoberto é o gene codificante do peptídeo AtPep1, um produto do gene *PROPEP1*, o qual quando superexpresso, ativa genes envolvidos na defesa, produzindo um fenótipo com maior resistência à *Pythium irregulare*, um patógeno que infecta o sistema radicular (Huffaker *et al.*, 2006).

2.2.3 AtPep1, um peptídeo endógeno que amplifica sinais de defesa

Elicitores endógenos nas plantas são tipicamente fragmentos oligossacarídeos, derivados da parede celular das plantas, produzidos pela infecção de patógenos ou por enzimas endógenas das plantas que são sintetizadas em resposta à infecção de patógenos (Orozoco-Cárdenas & Ryan, 2003).

A recente identificação e caracterização de uma família de peptídeos endógenos elicitores, chamados de peptídeos *AtPep* (Huffaker *et al.*, 2006) e do seu receptor (Yamaguchi *et al.*, 2006) contribui para uma melhor compreensão das vias de sinalização para a resposta imune contra patógenos e suas PAMPs, as quais podem ser diferencialmente amplificadas.

AtPep1 é derivado de uma proteína precursora (*PROPEP1*) cujo gene é expresso em resposta a ferimentos, jasmonato e etileno. O gene *PROPEP1* é também expresso pela aplicação de *AtPep1* exógeno (Huffaker *et al.*, 2006).

Os autores acima descritos constataram que *PROPEP1* pertence a uma família de genes com 7 membros em *A. thaliana*, identificados no GenBank, dos quais um gene não é detalhado. Três parálogos, At5g64890 (*PROPEP2*), At5g64900 (*PROPEP1*), At5g64905 (*PROPEP3*), estão sequencialmente codificados numa região 5.5 kb do cromossomo V (National Center for Biotechnology Information Arabidopsis Genome Data-base). Os parálogos At5g09980 (*PROPEP4*) e At5g09990 (*PROPEP5*) e o gene não detalhado (*PROPEP7*), são encontrados no segundo braço do cromossomo V, enquanto que At2g22000 (*PROPEP6*) é encontrado no cromossomo II. Adicionalmente, ortólogos de *PROPEP1* estão presentes em numerosas espécies de dicotiledôneas e monocotiledôneas, como arroz, milho, trigo, cevada, canola, soja batata, uva e outras.

A expressão do gene *PROPEP1* em um promotor forte como o 35S em *A. thaliana* resultou em um fenótipo que expressou constitutivamente PDF1.2 e exibiu um aumento na resistência ao oomiceto *P. irregulare* (Huffaker *et al.*, 2006). *PROPEP1* é um membro de uma pequena família de genes que codificam precursores que contêm seqüências homólogas ao *AtPep1* na sua região C-terminal (Huffaker & Ryan, 2007). Alguns destes genes são expressos em

respostas a PAMPs e produzem peptídeos *AtPep* que amplificam a sinalização de defesa através das vias JA/Et e SA, Figura 1.

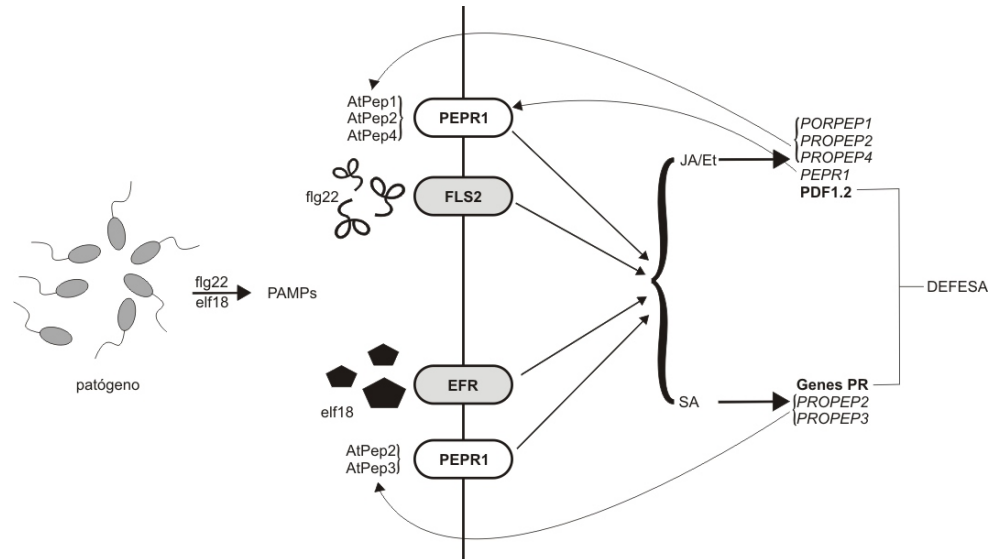


FIGURA 1. Modelo proposto para a via de amplificação da sinalização de PAMPs e peptídeos *AtPep* em *A. thaliana* (adaptado de Huffaker & Ryan, 2007)

Plantas de *A. thaliana* superexpressando o gene *PROPEP1*, expressaram genes de defesa como PDF1.2, PR-1, PR-3 e PR-4, indicando a relação de *PROPEP1* com estes genes, regulando a sua expressão através de múltiplas vias de sinalização, um fenômeno observado durante a indução de genes de defesa através da PAMP flg22 (Gómez-Gómez *et al.*, 1999; Zipfel *et al.*, 2004).

A expressão de *PROPEP1* em resposta a ferimentos e a metil jasmonato (MeJA) sugerem que este gene pode ser um sinalizador de defesa similar as sisteminas que são encontradas na família Solanaceae como sinalizador de defesa local e sistêmica contra o ataque de herbívoros (Pearce *et al.*, 2006).

AtPep e seus homólogos são os primeiros peptídeos endógenos que sinalizam a defesa identificados em *A. thaliana*. A descoberta de genes ortólogos no reino vegetal sugere que esta família de genes pode ter um papel fundamental

na amplificação da defesa das plantas associada com a defesa. Embora peptídeos endógenos de plantas apresentem ação de defesa contra herbívoros (Pearce *et al.*, 1991; Pearce & Ryan, 2003), e peptídeos derivados de patógenos ativem respostas de defesa contra patógenos, incluindo elicitores de fungos Pep13, AVR9 e elicinas (Hahlbrock *et al.*, 1995; Kamoun, 2001; Navarro *et al.*, 2004), e elicitores de bactérias NPP1, flg22 e elf13 (Kunze *et al.*, 2004), AtPep1 é o único exemplo de um peptídeo sinal endógeno em plantas que ativa genes de defesa especificamente contra patógenos (Yamaguchi *et al.*, 2006).

2.3 Genômica funcional

O termo genômica funcional é descrito por Hieter & Boguski (1997) como o desenvolvimento e a aplicação de métodos experimentais de capacidade de análise em grande escala em nível genômico para avaliar a função dos genes. Os avanços das estratégias de análise funcional podem ser verificados através de técnicas de análise *in vitro* de acumulação de mRNAs e técnicas de análise genética direta e reversa *in vivo* (Rensink & Buell, 2004). Nesse contexto, ferramentas como marcadores moleculares, silenciamento gênico, inativação de genes por inserção de elementos genéticos móveis, indução de mutagenese através da transferência de T-DNA e ensaios de localização de proteínas de fusão utilizando métodos baseados em genes marcadores de fluorescência, constituem mecanismos para o descobrimento da função biológica das seqüências geradas (Waterhouse, 2002; Waterhouse & Helliwell, 2003; Jones *et al.*, 2004).

Além dessas, uma técnica que vem sendo utilizada com freqüência é a superexpressão, que consiste em produzir plantas com expressão aumentada do produto de um gene em questão. A superexpressão de um gene é possível graças à utilização de promotores fortes, em geral o promotor 35S do vírus do

mosaico da couve-flor (CaMV) (Tang *et al.*, 1999; Qin *et al.*, 2006), que em dicotiledôneas é expressado constitutivamente. Esse método permite o direcionamento da superexpressão de um gene-alvo, sendo uma ferramenta eficiente, rápida e específica na detecção da função gênica.

A fusão de proteínas tem sido outra técnica amplamente utilizada para a avaliação da expressão de um determinado gene de interesse através de sua ligação a um gene denominado marcador ou repórter. A proteína verde fluorescente (*Green fluorescent protein* - GFP) é o produto de um gene marcador que foi descoberto por Shimomura *et al.* (1962) na água viva *Aequorea victoria*, e tem apresentado vantagens sobre outros genes marcadores, tais como luciferase pois não requer quaisquer co-fatores para sua expressão e dispensa qualquer técnica de fixação que possa causar danos às células (Jones *et al.*, 2004).

O uso da GFP como marcador permite a fácil localização subcelular de fusões de proteínas *in vivo*, facilitando em muito os estudos em biologia celular (Escobar *et al.*, 2003). Em plantas, fragmentos de cDNAs randômicos, fusionados à extremidade 3' do gene *gfp* foram transformados em massa em *A. thaliana* através de *A. tumefaciens* para localizar produtos gênicos vegetais (Cutler *et al.*, 2000). Em muitos casos, a localização apresentada por uma proteína vegetal tem uma relação direta com a sua função, determinando seu papel dentro do processo celular. Estes benefícios tornam válida essa estratégia, mesmo que as proteínas de fusão expressadas não apresentem viabilidade como as formas nativas (Escobar *et al.*, 2003).

2.4 Transformação genética de *A. thaliana* mediada por *A. tumefaciens*

A transformação em plantas via *A. tumefaciens* tornou-se o método mais utilizado na introdução de genes exógenos em células vegetais com subsequente

regeneração de plantas transgênicas (Batra & Kumar, 2003). Herrera-Estrella *et al.* (1983) introduziram e expressaram genes em plantas usando o sistema natural de *Agrobacterium tumefaciens*. Este método, junto com bombardeamento com micropartículas (Klein *et al.*, 1988), tem sido usado com sucesso em muitas espécies de plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas gerando diversas linhas transgênicas de interesse para agricultura, medicina e indústria (Martinez Trujillo, 2004). A facilidade com que as transformações são efetuadas e a incorporação de menor número de cópias do transgene, o que é um importante fator na sua preservação através das gerações subseqüentes, são algumas das vantagens do método de transformação mediada por *A. tumefaciens* em relação aos demais métodos.

A transformação genética de plantas tem sido empregada com os mais diversos objetivos, entre eles, estudos relacionados à determinação da função de genes, que ainda estão limitados a determinadas espécies e devem, quando possível, ser conduzidos em plantas modelo. Neste sentido a escolha da planta modelo é fundamental (Aragão *et al.*, 2002). *Arabidopsis thaliana*, um membro da família Cruciferae, é usado como modelo para estudos moleculares e fisiológicos, pois apresenta ciclo de vida curto, tamanho reduzido, genoma pequeno e facilidade em análises mutagênicas (Meinke *et al.*, 1998). Além disso, *A. thaliana* apresenta células grandes, permitindo fácil visualização de suas estruturas celulares ao microscópio (Cutler *et al.*, 2000). Adicionalmente, a facilidade com a qual *A. thaliana* pode ser transformada por *A. tumefaciens* têm viabilizado a produção de grande número de linhas transgênicas independentes.

A transformação de plantas geralmente requer métodos sofisticados de regeneração que exigem habilidade técnica, tais como a variação somaclonal e mudanças epigenéticas como a metilação do DNA (Bent, 2000). O primeiro

método de transformação de *A. thaliana* exigiu técnicas de cultura de tecidos e regeneração (Valvekens *et al.*, 1988), no entanto, atualmente os protocolos utilizados procuram eliminar estes passos, objetivando facilitar a transformação de plantas (Chang *et al.*, 1994; Katavic *et al.*, 1994).

Procedimentos de transformação floral utilizando *Agrobacterium* têm apresentado grande êxito em *A. thaliana*. Tais êxitos, acompanhados das recentes informações sobre regiões representando alvo de transformação em *A. thaliana*, devem inspirar uma renovação de esforços em adaptar esses métodos à transformação de outras espécies vegetais. Os benefícios são claros: transformação sem necessidade de cultura de tecidos pode proporcionar um método de alta capacidade de análise requerendo mínimos esforços, custos e habilidade para ser executado. Além disso, os riscos de variação somaclonal decorrentes da eliminação desta etapa são minimizados. E o mais importante, protocolos de transformação simplificados facilitam os procedimentos intensivos de transformação, reduzindo o esforço requerido pelos testes de uma determinada construção de DNA em plantas (Bent, 2000).

O método mediado por *A. tumefaciens* baseado na infiltração da flor *in planta* é singular no que se refere ao fato de não requerer cultura celular *in vitro* (Bechtold *et al.*, 1993), além disso, não exige a posterior eliminação das células bacterianas do sistema de transformação. Isto leva à captura direta do DNA plasmidial bacteriano pelas células-ovo (ou suas células progenitoras) e à integração do DNA exógeno ao DNA nuclear das sementes transgênicas recuperadas (Clough & Bent, 1998; Desfeux *et al.*, 2000).

O método de transformação floral evita ou reduz as alterações do DNA a níveis não detectáveis. Dessa forma, é desejável que esse método possa ser

estendido a outras plantas, incluindo àquelas de relevância agronômica (Labra *et al.*, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Plantas de *Arabidopsis thaliana* (ecótipo Columbia) foram utilizadas para a realização dos testes de patogenicidade e resistência. Previamente à semeadura, sementes de *A. thaliana* foram submetidas à quebra de dormência por estratificação. As sementes foram imersas em água destilada e expostas a uma temperatura de 4 °C durante 3 a 5 dias no escuro, segundo metodologia adaptada de Zhang *et al.* (2006). Após este período foi realizada a semeadura em bandejas de isopor contendo o substrato comercial TecnoMax® previamente autoclavado. As bandejas de 24 alvéolos foram colocadas em flutuação em bandejas plásticas com água destilada e mantidas em câmaras de crescimento com fotoperíodo de 16 h de luz e temperatura de 20 ± 2 °C (Zhang *et al.*, 2006), onde permaneceram até o período de florescimento das plantas (entre 45 e 60 dias após o início da germinação). Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia Molecular do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS, entre o período de março de 2006 a fevereiro de 2008.

3.2 Isolados de *Pythium* spp. e produção de zoósporos

Os isolados das 5 espécies do gênero *Pythium* utilizadas no presente trabalho *P. graminicola*, *P. inflatum*, *P. deliense*, *P. dissotocum* e *P. ultimum*, fazem parte da coleção de isolados do Laboratório de Fitopatologia Molecular da UFRGS. Os isolados foram mantidos em meio de cultura “Corn Meal” (CM), composto por farinha de milho, agar e 100 mg. L⁻¹ de ampicilina e as placas foram armazenadas a 4 °C. Um bloco de meio CM (1 cm x 1 cm) com micélio do patógeno foi retirado da placa e re-inoculado em placas de Petri contendo meio CM e crescidos por 4 a 5 dias a 28 °C, no escuro. Para homogeneidade do inóculo, foram adicionados em toda superfície da placa grãos de aveia previamente autoclavados e após as placas foram mantidas no escuro a 28 °C por 7 dias (comunicação pessoal Jéferson Mateus Dariva).

O método de produção de zoósporos foi adaptado de Raftoyannis & Dick (2006). Um bloco (5 mm x 5 mm) de meio de cultura CM contendo micélio dos isolados utilizados foi transferido com auxílio de um bisturi para uma placa de Petri contendo meio de cultura Agar-água (AA), composto por 15 g. L⁻¹ de agar acrescido de ampicilina (100 mg. L⁻¹). As placas foram incubadas no escuro a 25 °C durante três dias. Após esse período, um bloco deste meio foi transferido para placas de Petri contendo meio de cultura V8, composto por 100 ml. L⁻¹ de suco de vegetais V8 (Campbell), acrescido de 20 g. L⁻¹ de Agar e 100 mg. L⁻¹ de ampicilina. As placas foram incubadas por mais três dias no escuro a 25 °C. Em seguida, o meio de cultura contendo micélio do patógeno foi transferido para uma nova placa de Petri e o meio foi submetido a três lavagens com água destilada estéril. Após a última lavagem, o meio foi submerso em aproximadamente 15 mL de água destilada estéril e mantido sob luz durante 15 min. A placa foi então incubada a 4 °C durante sete dias. A quantificação da produção de zoósporos foi

realizada com a utilização de câmara de Neubauer em microscópio ótico da marca Olympus (modelo BX 41 TF), com aumento de 400 vezes.

3.3 Teste de patogenicidade

Os testes de patogenicidade dos isolados das diferentes espécies do gênero *Pythium* foram conduzidos em plântulas de *A. thaliana*. Primeiramente, as sementes de *A. thaliana* foram cultivadas em bandejas de isopor, com alvéolos individualizados, contendo substrato TecnoMax[®], previamente autoclavado. Foi colocado em cada alvéolo 1 grão de aveia contendo micélio dos isolados de cada espécie do gênero *Pythium*. A bandeja controle conteve apenas as sementes de *A. thaliana* e o grão de aveia autoclavado sem o inóculo. As bandejas foram mantidas em sala de cultivo por 14 dias sob fotoperíodo de 16 h e temperaturas de 20 ± 2 °C. Após, as plantas foram avaliadas a fim de verificar a patogenicidade dos isolados. O critério de avaliação foi a incidência da doença monitorada através da contagem de plantas com sintomas de amarelecimento ou de morte.

3.4 Teste de resistência

O teste de resistência das plantas de *A. thaliana* da progênie T2 transformadas com os vetores pEGAD, pEGAD-AtPep, pGSA1427 e pGSA-AtPep foram realizados em placa de Petri contendo meio Murashige & Skoog (MS, 1962). As sementes de *A. thaliana* de todos os eventos de transformação foram submetidas à quebra de dormência pela sua submersão em água destilada e exposição das mesmas a uma temperatura de 4 °C durante quatro dias.

A assepsia das sementes de *A. thaliana* foi realizada em cabine de fluxo laminar horizontal através da imersão das sementes em etanol 96 % durante 30 s, seguida de 5 min de imersão em hipoclorito de sódio 1 % acrescido de Tween-20 0,1 %. Em seguida, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada

estéril. Após a assepsia, as sementes foram colocadas em placas de Petri contendo aproximadamente 20 ml de meio MS, suplementado com 8 g. L⁻¹ de Agar, 100 mg. L⁻¹ de ampicilina e 10 µM do herbicida glufosinato de amônio (50 µL. L⁻¹ Finale®). O pH da solução foi ajustado previamente à esterilização em 5,8 pela adição de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico, conforme a necessidade. Foram distribuídas aproximadamente 200-300 sementes por placa, as quais foram mantidas em câmara de crescimento sob temperatura de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h de luz.

Após 15 dias de crescimento em meio seletivo, as plantas de *A. thaliana* tolerantes ao herbicida foram transferidas para novas placas de Petri contendo meio MS, suplementado com 8 g. L⁻¹ de Agar, 100 mg. L⁻¹ de ampicilina e 10 µM do herbicida glufosinato de amônio (50 µL. L⁻¹ Finale®), com pH da solução ajustado previamente à esterilização em 5,8. Cada nova placa continha 10 plântulas de *A thaliana*. Imediatamente após a transferência as plântulas foram inoculadas com os zoósporos das diferentes espécies do gênero *Pythium*. Os tratamentos consistiram da inoculação de zoósporos em uma concentração ajustada de 10⁵ zoósporos. ml⁻¹ de um dos cinco isolados das espécies *P. graminicola*, *P. inflatum*, *P. deliense*, *P. dissotocum* e *P. ultimum*, além de um tratamento controle contendo apenas água destilada estéril. Foi aplicado nas placas 500 µL da solução contendo os zoósporos. As placas foram mantidas em câmara de crescimento na temperatura de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h de luz.

Sete dias após a inoculação, as plantas foram avaliadas quanto à resistência ao patógeno através da contagem das plantas sobreviventes e crescimento do oomiceto na placa. Os dados analisados foram submetidos à análise de variância sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey (P≤0,05). Duas plântulas de cada evento inoculada com cada um dos tratamentos foi

coletada para posterior análise de expressão gênica, sete dias após a inoculação. As plântulas foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente foi realizada a extração de RNA total.

Um lote de plantas foi conduzido paralelamente. Após 20 dias em meio de seleção com herbicida, 8 plantas de cada evento de transformação foram transplantadas em copos plásticos contendo substrato comercial, e inoculadas com blocos de meio Agar-água com os isolados de *P. graminicola*, *P. inflatum*, *P. deliense*, *P. dissotocum* e *P. ultimum*, para verificar a influência da inoculação no crescimento radicular das plantas. Vinte dias após a inoculação as plantas foram retiradas dos copos, lavadas e foi medido o comprimento das raízes de 3 plantas de cada evento. Os comprimentos médios das raízes foram submetidos à análise de variância e complementada pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

3.5 Seleção *in silico* de genes relacionados à resistência

Foram realizadas buscas em bases de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Arabidopsis Information Resource (TAIR, <http://www.arabidopsis.org>) e SOL Genomics Network (Solgenes, <http://www.sgn.cornell.edu>) por genes envolvidos nas vias de resposta de defesa de plantas contra patógenos necrotróficos e com características semelhantes a *Pythium* sp. Os genes selecionados foram o gene codificante do peptídeo AtPep1, *PROPEP1* (TAIR locus N° AT5G6400) e PDF1.2 (TAIR locus N° AT5G44420). Para os genes selecionados foram sintetizados oligonucleotídeos iniciadores específicos baseados nas seqüências de cDNA completos destes genes. Os oligonucleotídeos iniciadores sintetizados foram: AtPep-E e AtPep-H, PDF1.2-E e PDF1.2-H, e AtPep-A e AtPep-S, cujas seqüências encontram-se descritas na Tabela 1.

TABELA 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR e RT-qPCR na direção 5' a 3'.

	Direto (5' a 3')	Reverso (5' a 3')
Gapdh F/2R	GAAATGCATCTTGCACTACCAACTGTCTTGC	CTGTGAGTAACCCCATTCATTATCATACCAAGC
AtPep-E/H	TAG GAATTC ATGGAGAAATCAGATAGACG	AT AAGCTT CTAATTATGTTGGCCAGGAC
AtPep- A/S	TAG GGCGCGCC ATGGAGAAATCAGATAGACG	AT ACTAGT CTAATTATGTTGGCCAGGAC
PDF1.2-E/R	TAGAATTCATGGCTAAGTTTGCTTCCAT	AACAACAACGGGAAAATAAACA
5A/EGAD	CTCGGCATGGACGAGCTG	TCCTCGAGATCAGTTATCTAG
CaMV9/OCSI	ATCTCTCTGCCGACAGTGGT	TAGCTCAGATCCTTACCGCC

* os nucleotídeos em destaque são referentes aos sítios das enzimas de restrição adaptadas aos oligonucleotídeos iniciadores.

3.6 Vetores

Para análise funcional do gene codificante do peptídeo *AtPep1*, foi utilizado o vetor de expressão pGSA1427 (TAIR 1004952079) submetido por Doetsch (2002), obtido da coleção do Centro de Recursos Biológicos de Arabidopsis (ABRC). Este vetor apresenta sítios de clonagem para as enzimas de restrição *Ascl* e *SpeI*, contém o gene de resistência à clorofenicol para seleção em *Escherichia coli* e em *Agrobacterium tumefaciens* e o gene de resistência ao herbicida glufosinato de amônio (Finale®) para seleção *in planta* (Figura 2).

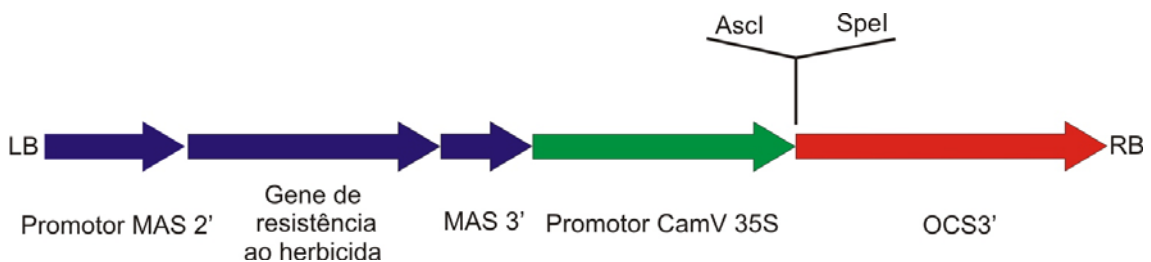


FIGURA 2. Estruturas relevantes do vetor binário pGSA1427 (adaptado de <http://www.chromdb.org>).

Para a construção do vetor pGSA-*AtPep*, 2 oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados, *AtPep-A* e *AtPep-S* (Tabela 1), a fim de amplificarem a região correspondente ao primeiro ATG até alguns nucleotídeos após o possível ponto de clivagem do peptídeo. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para

amplificação do cDNA de *PROPEP1* apresentavam em suas extremidades nucleotídeos correspondentes aos sítios das enzimas de restrição *Ascl* e *SpeI*, respectivamente, para facilitar a clonagem e foram preparados de forma a estarem em fase de leitura com o vetor de expressão em planta (pGSA1427), Apêndice 1.

O vetor de fusão EGFP:cDNA (Cutler *et al.*, 2000) foi construído a partir do plasmídeo binário pEGAD (Genbank AF218816). Este vetor apresenta sítios de clonagem para as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, localizado na extremidade 3' do gene codificante da proteína GFP, e contém gene de resistência à canamicina para seleção em *Escherichia coli* e em *Agrobacterium tumefaciens*, e gene de resistência ao herbicida glufosinato de amônio (Finale®) para seleção *in planta* (Figura 3).

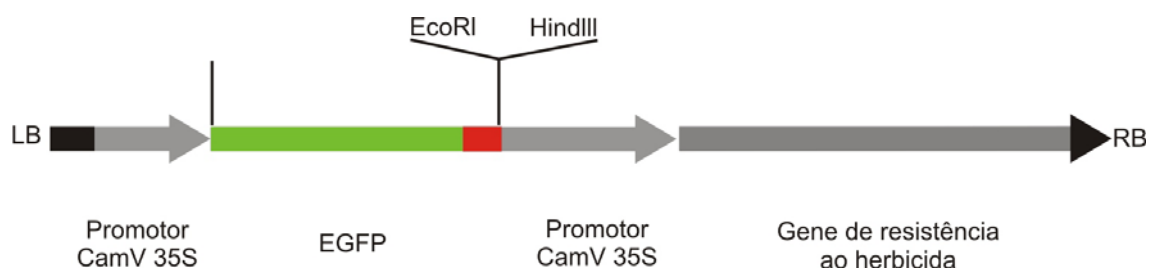


FIGURA 3. Estruturas relevantes do vetor de fusão cDNA:EGFP construído a partir do vetor binário pEGAD (adaptado de Cutler & Ehrhardt: <http://www.deepgreen.stanford.edu>).

Para a construção do vetor pEGAD_AtPep, 2 oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados, AtPep-E e AtPep-H (Tabela 1), a fim de amplificarem a região correspondente ao primeiro ATG até alguns nucleotídeos após o possível ponto de clivagem do peptídeo. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do cDNA de *PROPEP1* apresentavam em suas extremidades nucleotídeos correspondentes aos sítios das enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*,

respectivamente, para facilitar a clonagem e foram preparados de forma a estarem em fase de leitura com o vetor pEGAD (Apêndice 2).

3.7 Extração de RNA total e isolamento de mRNA

Plântulas de *A. thaliana* foram colocadas em nitrogênio líquido para extração de RNA total. O RNA total foi extraído a partir de tecido foliar (100 a 200 mg) triturado na presença de nitrogênio líquido. Foram acrescentados 400 μ L de tampão de extração de RNA [100 mM de Tris-HCl (pH 9,0); 200 mM de NaCl; 15 mM de EDTA; e 0,5 % de SDS], 2,3 μ L de 2-mercaptoetanol, 400 μ L de solução de fenol equilibrado com pH 8,0 e 80 μ L de uma mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v:v). Após a homogeneização em um agitador tipo vórtex por 2 min, foram acrescentados 28 μ L de acetato de sódio 3 M (pH 5,2). Nova agitação vigorosa foi realizada por 1 min, seguida de uma incubação no gelo por 15 min. Posteriormente, foi realizada centrifugação a 16.000 x g por 10 min a 4 °C. Ao líquido sobrenadante foram acrescentados 400 μ L solução de fenol equilibrado com pH 8,0 e 80 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v:v), seguida de agitação vigorosa por 2 min e centrifugação a 16.000 x g por 5 min a 4 °C. Esse procedimento foi repetido com o líquido sobrenadante obtido após a centrifugação. Após as extrações, os ácidos nucleicos foram precipitados através da adição de 500 μ L de isopropanol e da incubação por aproximadamente 1 h a – 20 °C, seguida de centrifugação a 10.000 x g por 10 min a 4 °C. O líquido sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500 μ L de etanol 70 % ao precipitado, seguido de centrifugação a 10.000 x g por 5 min a 4 °C. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente. Após, o precipitado foi ressuscitado em 82,5 μ L de água ultra pura (Milli-Q) e incubado à temperatura ambiente por 10 min. A precipitação seletiva de RNA foi

realizada com a adição de 37,5 μL de cloreto de lítio 8 M e da incubação no gelo durante 3 h, seguida de centrifugação a 10.000 x g por 10 min a 4 °C. O líquido sobrenadante contendo o DNA foi retirado e a lavagem do precipitado foi realizada com 500 μL de etanol 70 % seguida de centrifugação a 10.000 x g por 5 min a 4 °C. Esse último procedimento foi repetido mais uma vez. O precipitado permaneceu em temperatura ambiente até secar e foi ressuspendido em 50 μL de água ultra pura. O RNA foi incubado por 10 min à temperatura ambiente antes de ser armazenado à - 20 °C.

A concentração de RNA total foi estimada através da leitura em espectrofotômetro (Smart SpecTM Plus, Bio-Rad) pela absorbância a 260 nm (nanômetros) (A_{260}), utilizando como padrão 1 ($A_{260} = 1$ equivale a uma concentração de 40 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ de RNA). A qualidade do RNA extraído foi avaliada por espectrofotometria pela relação OD260/280 nm e por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1 %, contendo tampão TBE [90 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 90 mM de H_3BO_3 e 2 mM de EDTA. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$), fotografado e analisado através do sistema de fotodocumentação computadorizado de análise de gel (Kodak Digital Science 1D-EDAS 120).

Para obtenção dos mRNAs das amostras foi utilizado aproximadamente 10 ng. μL^{-1} de RNA total extraído que foi submetido ao sistema “PolyAtract® mRNA Isolation System III” (Promega), segundo as instruções do fabricante.

3.8 Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA de fita simples (ss cDNA), os mRNAs foram submetidos à reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Para transcrição reversa (RT), foi adicionado ao mRNA 320 μM de cada dNTP, tampão 1x (Invitrogen), contendo 20 mM Tris-HCl (pH

8,4), 50 mM KCl, 3 mM de $MgCl_2$ e 6,6 mM ditioneitol (DTT); 1,32 μM de oligonucleotídeo antisenso oligo dT (5' – TTTTTTTTTTTTTTTTTT – 3') e 6,4 U de enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen). A reação foi incubada a 37 °C por 1h.

3.9 Digestão do cDNA de *PROPEP1*

O cDNA de *PROPEP1* foi digerido com as enzimas de restrição *Ascl* e *SpeI* que reconhece o sítio de clonagem dos fragmentos gerando extremidades coesivas, bem como com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. A reação foi composta por 10 μg de cDNA; tampão REact® 1, 10x (Invitrogen) com uma concentração final de 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM $MgCl_2$; 1 U da enzima *Asc I* (Invitrogen); 1 U da enzima *Spe I* (Invitrogen); 5 μL de H_2O ultrapura. O volume final da reação 15 μL . O tempo de incubação da reação foi de 2 h a 37 °C. A inativação da atividade das enzimas *Ascl* e *SpeI* foi feita pela elevação da temperatura (desnaturação) a 65 °C por 20 min. A mesma reação foi realizada substituindo as enzimas de restrição *Ascl* e *SpeI* pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*. O tamanho dos fragmentos e a concentração de cDNAs foram estimados pela análise do perfil eletroforético visualizado em gel de agarose 1 % (TBE 1x) com o auxílio dos marcadores de massa molecular λ *HindIII* (Invitrogen) e 1 kb DNA Ladder (Invitrogen). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado através do sistema de fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak Sciences 2d).

3.10 Digestão dos vetores pGSA1427 e pEGAD

O vetor pGSA1427 foi digerido com as enzimas de restrição *Ascl* e *SpeI*, resultando em uma molécula de DNA linear de extremidades coesivas,

compatíveis com as extremidades dos cDNAs, após sua digestão. A reação foi composta por 15 µg de DNA; 20mM Tris-HCl pH 7,4; 5 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 15 U da enzima *Ascl* (Invitrogen); 15 U da enzima *Sp I*; e 6,8 µL de H₂O ultrapura. O volume final da reação foi 20 µL. O tempo de incubação da reação foi de 2 h a 37 °C. A inativação da atividade das enzimas *Ascl* e *Spel* foi feita pela elevação da temperatura (desnaturação) a 65 °C por 20 min.

O vetor de fusão EGFP: cDNA (Cuttler *et al.*, 2000) foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, resultando em uma molécula de DNA linear de extremidades coesivas, compatíveis com as extremidades dos cDNAs, após sua digestão. A reação foi composta por 15 µg de DNA; 20 mM Tris-HCl pH 7,4; 5 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 15 U da enzima *Eco I* (Gibco BRL); 15 U da enzima *HindIII*; e 6,8 µL de H₂O ultrapura. O volume final da reação foi 20 µL. O tempo de incubação da reação foi de 2 h a 37 °C. A inativação da atividade das enzimas *EcoRI* e *HindIII* foi feita pela elevação da temperatura (desnaturação) a 65 °C por 20 min.

O produto das digestões dos vetores pGSA1427 e pEGAD foram purificados pela adição de 10% do volume da reação de acetato de amônio 7,5 M (2,5 µL) e 2,5 vezes do volume da reação (após adição de acetato de amônio 7,5 M) de etanol 100 % (68,7 µL). O material foi homogeneizado e precipitado a -20 °C por 1 h, seguido de centrifugação a 16.000 x g por 20 min a 4 °C. A fase superior foi descartada e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70 %, sendo centrifugado a 16.000 x g por 5 min a 4 °C e ressuspenso em 20 µL de H₂O ultrapura. O tamanho dos fragmentos e a concentração do vetor foram estimados pela análise do perfil eletroforético visualizado em gel de agarose 1 % (TBE 1x), com o auxílio dos marcadores de massa molecular λ *HindIII* (Invitrogen) e 1kb DNA Ladder (Invitrogen). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado

através do sistema de fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak Sciences 2d).

3.11 Inserção do cDNA de PROPEP1 nos vetores de transformação em planta

Os cDNAs digeridos foram ligados aos vetores pGSA1427 (pGSA-AtPep, Apêndice 1) e pEGAD (pEGAD-AtPep, Apêndice 2), digeridos conforme item 3.10, na razão molar inserto:vetor de 3:1. A reação de ligação foi composta por 6,5 ng de DNA do inserto (cDNA), 77 ng de DNA do vetor (pGSA1427 ou pEGAD), 1 U da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), 50 mM de Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 1,0 mM ATP, 1,0 mM DTT, 25 % (v/v) polietilenoglicol 8000, e 4,2 µL de H₂O ultrapura. O volume final da reação de ligação foi de 15 µL e a mesma foi incubada durante 20 h a 14 °C. O produto da reação de ligação foi purificado pela adição de 10 % do volume da reação de acetato de amônio 7,5 M (1,5 µL) e com 41,2 µL de (adicionada do acetato de amônio 7,5 M) de etanol 100 % (2,5 vezes o volume da reação). O material foi homogeneizado e precipitado a -20°C por 1 h, seguido de centrifugação a 16.000 x g por 20 min a 4 °C. A fase superior foi descartada e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70 %, centrifugado a 16.000 x g por 5 min a 4 °C e ressuspendido em H₂O ultrapura, no volume final de 5 µL.

3.12 Transformação genética de *A. tumefaciens*

Os produtos da reação de ligação entre o fragmento de cDNA (*PROPEP1*) e os vetores pGSA1427 ou pEGAD, foram utilizados para transformação de células de *A. tumefaciens* LBA 4404, as quais contêm o gene que confere resistência ao antibiótico rifampicina, para a seleção de bactérias transformadas.

Estas células foram gentilmente fornecidas por Norma Paniego, do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA) de Castelar, Argentina, e foram tornadas eletrocompetentes conforme descrito no manual de instruções do eletroporador Micro Pulser™ (Bio-Rad). Dois microlitros (aproximadamente 100 ng) do produto da reação de ligação foram adicionados a 20 µL de células eletrocompetentes de *A. tumefaciens*. As células foram transformadas geneticamente por choque elétrico (eletroporação) de acordo com as instruções do fabricante do eletroporador (Micro Pulser™, Bio-Rad). Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura líquido Luria-Bertani - LB (1 % triptona, 0,5 % extrato de levedura, 1 % NaCl - pH 7,5, esterilizado por autoclavagem). As células foram então incubadas por 3 h a 28 °C com agitação de 150 rpm. Após, 150 µL do meio contendo as células bacterianas foi espalhado em placa de Petri. A seleção das colônias recombinantes (colônias positivas) foi realizada através da distribuição das bactérias em placas de Petri contendo meio seletivo. As células foram distribuídas em placas de Petri contendo meio de cultura sólido LB (adicionado de ágar 1,6 % p/v) com os antibióticos rifampicina (100 µg. mL⁻¹) para seleção de crescimento de *A. tumefaciens* e canamicina (100 µg. mL⁻¹) para seleção das colônias transformadas com o vetor pEGAD ou clorofenicol (25 µg. mL⁻¹) para seleção das colônias transformadas com o vetor pGSA1427. As placas foram incubadas em estufa a 28 °C por 48 h até o momento da visualização das colônias bacterianas recombinantes.

3.13 Identificação de colônias de *A. tumefaciens* contendo plasmídeos recombinantes

A avaliação da transformação bacteriana foi realizada através da análise do padrão da massa molecular do fragmento do vetor amplificado através da reação

em cadeia da polimerase (PCR). Foi realizada PCR de amostras coletadas das colônias individuais crescidas em placa de Petri (5 – 20 colônias) visando à identificação de células de *A. tumefaciens* possuidoras dos plasmídeos recombinantes. Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 5A e EGAD, baseados nas seqüências de nucleotídeos do vetor pEGAD e CaMV9 e OCSI, baseados nas seqüências de nucleotídeos do vetor pGSA1427, ambos pares oligonucleotídeos são flanqueadores dos cDNAs inseridos nos respectivos vetores, conforme Tabela 1. A PCR foi composta por 0,15 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Invitrogen); 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl; 3,75 mM MgCl₂; 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 0,1 µL de cada colônia bacteriana amostrada, totalizando um volume final de 20 µL. A PCR foi realizada em um termociclador PTC - 100™ (MJ Research, Inc.), com os seguintes parâmetros: desnaturaçãõ inicial a 94 °C por 10 min; 30 ciclos constituídos de desnaturaçãõ a 94 °C por 1 min, pareamento a 50 °C por 1 min, extensãõ a 72 °C por 1 min, seguido de uma extensãõ final a 72 °C por 10 min. O produto da reaçãõ foi analisado através do perfil eletroforético obtido em gel de agarose 3 % contendo tampãõ TBE 1x, com o auxílio do marcador de massa molecular 1 Kb DNA Ladder (Gibco BRL), seguido da exposiçãõ em soluçãõ contendo brometo de etídio (0,5 µg. mL⁻¹). O gel foi visualizado sob luz UV e fotografado através do sistema de fotodocumentaçãõ computadorizado EDAS 120 (Kodak Sciences 2d).

3.14 Extraçãõ de plasmídeos recombinantes

A extraçãõ de plasmídeos foi baseada na técnica descrita por Brasileiro & Carneiro (1998). Três colônias foram transferidas para 3 mL de meio LB líquido com adiçãõ de rifampicina (100 µg. mL⁻¹) e de canamicina (100 µg. mL⁻¹), no caso

da utilização do vetor pEGAD, ou cloranfenicol ($25 \mu\text{g. mL}^{-1}$), no caso do vetor pGSA1427. O meio foi mantido sob agitação (150 rpm) em torno de 24 h a 28°C . As células foram coletadas por centrifugação a $4.000 \times \text{g}$ durante 5 min à 4°C . Em seguida, foram ressuspensas em $200 \mu\text{L}$ de solução P1 (RNase $100 \mu\text{g. mL}^{-1}$; Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM), seguida de adição de $200 \mu\text{L}$ da solução P2 (NaOH 200 mM; SDS 1 %), vertendo o tubo para completa homogeneização e observando a formação de uma solução viscosa indicando lise celular. Após, foi adicionado $200 \mu\text{L}$ da solução P3 (acetato de potássio 3 M, pH 5,5), vertendo o tubo para a homogeneização, seguida de centrifugação a $16.000 \times \text{g}$ por 10 min. A fase superior foi transferida para novo tubo e foram realizadas duas extrações pela adição de igual volume (aproximadamente $500 \mu\text{L}$) de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v:v) e agitação, seguida de centrifugação $16.000 \times \text{g}$ por 2 min. Para a precipitação do material, utilizou-se igual volume de isopropanol (aproximadamente $500 \mu\text{L}$) e 10 % de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e foi mantido durante 2 h a -20°C e centrifugação a $16.000 \times \text{g}$ durante 15 min. a 4°C . O precipitado obtido foi lavado com 1 mL de etanol 70 %, centrifugado a $16.000 \times \text{g}$ por 5 min a 4°C e ressuspensado em $30 \mu\text{L}$ de água ultra pura. Para verificação da presença da inserção do cDNA nos plasmídeos pEGAD e pGSA1427 foi realizada PCR e análise em gel de agarose, conforme descrito no item 3.11.

3.15 Reação de sequenciamento

Os produtos de PCR descritos nos itens 3.14 e 3.18 que apresentaram fragmentos de tamanho esperado foram purificados em uma reação com as enzimas EXO/SAP contendo 0,5 U da enzima Exonuclease I e 0,1 U da Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP). O volume final da reação foi de $6\mu\text{L}$. e foi enviado

para seqüenciamento. Os plasmídeos pEGAD-AtPep foram seqüenciados em ambas as fitas com os oligonucleotídeos iniciadores AtPep-E ou AtPep-H, e os plasmídeos pGSA-AtPep também foram seqüenciados em ambas as fitas, porém com os oligonucleotídeos iniciadores AtPep-A ou AtPep-S.

O seqüenciamento foi realizado no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUC/RS, através do sistema “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit for MegaBACE DNA Analysis Systems” no seqüenciador automático MegaBACE (Amersham Biosciences).

Os eletroferogramas obtidos do seqüenciamento foram analisados pelo programa Chromas Lite, através da comparação das seqüências obtidas no sequenciamento com as seqüências esperadas, dos vetores pGSA1427 e pEGAD com e sem a presença do cDNA de interesse (*PROPEP1*).

3.16 Transformação floral de *A. thaliana*

A. thaliana foi transformada pelo método adaptado de Clough & Bent (1998), em que plantas nos estádios iniciais de florescimento (30 % a 40 % do total de inflorescências abertas) foram aspergidas com o inóculo contendo células transformadas de *A. tumefaciens* linhagem LBA 4404 contendo um dos os vetores descritos no item 3.9 ou com os mesmos vetores, porém sem o cDNA inserido.

O meio de infiltração foi composto por 5 % de sacarose, 0,05 % de surfactante *Silwet L77* em um volume final de 100 mL de água destilada e autoclavada, sendo aplicado aproximadamente 10 mL por planta. Esta suspensão foi aplicada a uma distância de 30 cm das plantas, sendo distribuída uniformemente sobre a superfície das flores. As bandejas contendo as plantas aspergidas foram incubadas por 24 h em câmaras plásticas borrifadas

internamente com água destilada. Após o período de 24 h, as plantas foram removidas das câmaras plásticas e mantidas em câmaras de crescimento climatizadas a 20 ± 2 °C com fotoperíodo 16 h de luz. A aspersão foi repetida 3 vezes com intervalos de 7 dias, nas mesmas plantas, sendo essas mantidas nas mesmas condições citadas anteriormente. Após o período de incubação em câmaras plásticas, as plantas foram acondicionadas em câmaras de crescimento por aproximadamente 30 dias até a coleta total de sementes maduras.

3.17 Análises fenotípicas

3.17.1 Seleção de plantas transformadas de *A. thaliana*

Após a coleta, as sementes provenientes das plantas de *A. thaliana* transformadas (plantas T0) foram submetidas à quebra de dormência por 3 a 5 dias a 4 °C, no escuro. A semeadura foi realizada em copos plásticos contendo substrato comercial Tecnomax® autoclavado. Os copos foram furados na parte inferior e colocados em bandejas plásticas contendo uma solução de 10 mg. L⁻¹ do herbicida glufosinato de amônio (Finale®). As bandejas contendo as sementes foram mantidas em câmaras climatizadas a 20 ± 2 °C com fotoperíodo 16 h de luz. Após o surgimento das primeiras folhas verdadeiras, foram realizadas 3 aplicações de solução 10 mg. L⁻¹ do herbicida glufosinato de amônio (Finale®) na superfície foliar (aproximadamente 10 ml por planta), com intervalos de 3 dias entre as aplicações.

As plantas foram avaliadas quanto à tolerância ao herbicida 15 dias após a emergência.

Sessenta dias após o plantio, sementes das plantas (T1) tolerantes ao herbicida foram colhidas. A quebra de dormência das sementes de *A. thaliana* (plantas T1) foi pela imersão em 1 mL de água destilada e incubação a 4 °C

durante 3 a 5 dias no escuro. Após, as sementes foram desinfestadas com etanol 95 % por 1 min e 1 % de hipoclorito de sódio com 0,1 % de Tween 20 por 5 min e lavadas (3 vezes) com água destilada e esterelizada. Após a desinfestação as sementes foram colocadas nas placas de Petri com meio MS suplementado com 8 g. L⁻¹ de Agar e 100 mg. L⁻¹ de ampicilina, acrescido de 10 mg. L⁻¹ de glufosinato de amônio (Finale[®]).e mantidas em câmaras de crescimento com fotoperíodo 16h de luz a 20 ± 2 °C. A avaliação das plantas (T2) tolerantes ao herbicida ocorreu 15 dias após a semeadura nas placas.

3.17.2 Microscopia de epifluorescência

Plântulas de *A. thaliana* foram analisadas através de visualização por microscopia de epifluorescência para identificar estruturas celulares expressando GFP (Cutler *et al.*, 2000). Plântulas com aproximadamente 20 dias desde a germinação, foram retiradas das placas de Petri e avaliadas por microscopia. Foi utilizado um microscópio de fluorescência modelo BX 41 TF (Olympus), equipado com sistema óptico UIS (sistema de infinito universal) e iluminação do tipo Koehler. Foi preparada ao menos uma lâmina a partir de cada placa com plântulas sobreviventes à seleção pelo herbicida. As plântulas foram posicionadas com a adição de uma gota de água destilada entre a lâmina e a lamínula de vidro sob leve pressão, e visualizado com aumento de 100 a 1000 vezes. A visualização com aumento de 1000 vezes foi realizada com imersão da objetiva em óleo apropriado. As imagens das amostras foram registradas através de uma câmera fotográfica digital Nikon COOLPIX 4500 (4.0 mega pixels 4 x zoom).

3.18 Análises genotípicas para detecção dos genes introduzidos nas plantas transformadas

O DNA foi extraído pelo método CTAB adaptado de Murray & Thompson (1980) a partir de folhas de plantas de *A. thaliana* transformadas e tolerantes ao herbicida. Aproximadamente 100 mg de tecido vegetal foi coletado e triturado na presença de N₂ líquido em um tubo de microcentrífuga (1,5 mL). Em seguida, foram adicionados 750 µL de tampão de extração CTAB (CTAB, 55 mM; Tris, 100 mM pH 8,0; EDTA, 10 mM; NaCl, 0,7 M) e 15 µL de 2-mercaptoetanol. A mistura foi homogeneizada vigorosamente por 2 min, incubada a 65 °C durante 15 min e posteriormente, acrescentados 520 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v:v). A mistura foi novamente homogeneizada vigorosamente por 1 min e centrifugada por 10 min a 18.400 x g em temperatura ambiente. A fase líquida sobrenadante foi transferida para um novo tubo, à qual foi adicionado igual volume de isopropanol (500 µL) e 50 % do volume de acetato de amônio 7,5 M (250 µL). Em seguida, a mistura foi centrifugada por 10 min a 18.400 x g em temperatura ambiente. A fase sobrenadante foi desprezada e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70 % por duas vezes, centrifugado por 5 minutos a 18.400 x g, seco a 65 °C e solubilizado em 100 µL de H₂O ultrapura. O material extraído foi armazenado a – 20 °C.

O DNA extraído de plantas transformadas (T1) foi submetido à PCR com a utilização dos seguintes pares de oligonucleotídeos iniciadores CaMV9 e OCSI para pGSA1427, AtPep-A e AtPep-S para pGSA-AtPep; 5A e EGAD para pEGAD; e AtPep-E e AtPep-H para pEGAD-AtPep (Tabela 1). A PCR foi realizada em um volume final de 20 µl, contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 25 mM KCl; 2,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen); 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1 U da enzima Taq DNA polimerase

(Invitrogen). A reação foi realizada no termociclador PTC-100™ (MJ Research) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C (2 min), seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C (20 s), pareamento a 50 °C (25 s) e extensão a 72°C (50 s), e uma etapa final de extensão 72 °C (10 min). O tamanho dos fragmentos foi estimado pela análise do perfil eletroforético visualizado em gel de agarose 2 % (TBE 1x) com o auxílio do marcador de massa molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado através do sistema de fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak Sciences 2d).

3.19 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

A expressão gênica em plantas transformadas de *A. thaliana* foi determinada pelo método de quantificação relativa por PCR em tempo real. Os pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram Gapdh-F e Gapdh-2R para o controle endógeno e AtPep-E e AtPep-H para *PROPEP1* indicados na (Tabela 1). A especificidade das condições aplicadas ao RT-qPCR foi verificada através gel de agarose, conforme condições detalhadas no item 3.18 e da curva de dissociação realizada após a reação de amplificação de acordo com as seguintes condições: 95 °C (15 s), 60 °C (1 min), 95 °C (15 s) e 60 °C (15 s).

As amostras para realização da PCR consistiram de 5 µL de cDNA diluído (50 vezes), obtido conforme item 3.8. A reação da qPCR foi realizada com mix Platinum® Sybr® Green qPCR – UDG com ROX (Invitrogen) e concentração final dos oligonucleotídeos iniciadores foi 0,2 µM. A reação foi executada em um sistema de detecção de seqüências modelo 7300 Applied Biosystems. As condições de termociclagem consistiram de 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C e 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 50 °C e 1 min a 72 °C. O sinal verde fluorescente

do fluoróforo SYBR foi normalizado por um marcador de referência passiva (corante ROX) incluído no mix da Invitrogen. O limiar de fluorescência foi estabelecido no início da curva representando a taxa de amplificação do amplicon. O número de ciclos pelo qual a fluorescência passou o limiar (C_T) para cada reação foi calculado pelo programa "7000 System SDS – Sequence detection, version 1.4" (Applied Biosystem) e posteriormente exportados para planilhas do programa "Microsoft Excel" para análise. O nível de expressão de cada amostra de cDNA foi obtido pela normalização com um gene endógeno Gapdh (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, Shih *et al.*, 1991). Os níveis de quantificação relativa do transcrito pelo gene de referência (ΔC_T) foi determinado pela subtração do C_T do gene endógeno pelo C_T do gene alvo pela função $\Delta C_T = C_T(\text{gene alvo}) - C_T(\text{gene endógeno})$. Para comparar níveis de expressão entre plantas transformadas com e sem *PROPEP1*, com o calibrador (plantas pEGAD-C) a função $\Delta\Delta C_T$ foi primeiramente determinada usando a equação $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{transformada}) - \Delta C_T(\text{controle})$ (Livak & Schmittgen, 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e clonagem do cDNA de *PROPEP1*

O cDNA correspondente ao gene codificante do peptídeo *PROPEP1* foi isolado de plantas de *A. thaliana*, através da reação de RT-PCR com os pares de oligonucleotídeos iniciadores AtPep-A e AtPep-S ou AtPep-E e AtPep-H (Tabela 1). Foi obtido um fragmento de 279 pb correspondente ao cDNA de AtPep1 em ambas as reações (Figura 4A). O fragmento obtido apresenta o tamanho esperado, para o fragmento compreendido entre as seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores de acordo com o cDNA do gene codificante do peptídeo AtPep1, *PROPEP1*, depositada no Genbank (acesso At5g64900) (Huffaker *et al.*, 2006) .

4.2 Seleção das colônias de *A. tumefaciens* contendo o cDNA de *PROPEP1*

Após 48 horas de crescimento, foram selecionadas aproximadamente 20 colônias transformadas com o vetor pEGAD-AtPep, 10 colônias transformadas com o vetor pGSA-AtPep, 10 colônias transformadas com o vetor pEGAD e 10 colônias transformadas com o vetor pGSA foram avaliadas através de PCR. Foram utilizadas duas reações independentes para cada colônia transformada com o vetor pEGAD-AtPep: com os oligonucleotídeos iniciadores 5A e EGAD, que

permitem identificar pelo tamanho do fragmento parte da seqüência do vetor com o cDNA de *AtPep1* inserido (376 pb); e com os oligonucleotídeos iniciadores *AtPep-E* e *AtPep-H* que permitem identificar a presença do cDNA de *PROPEP1* (279 bp) (Tabela 1). Foram confirmadas 11 colônias contendo o cDNA de *PROPEP 1* no vetor pEGAD.

No caso da transformação com o vetor pGSA-*AtPep* também foram usadas duas reações independentes de PCR: com os oligonucleotídeos iniciadores CaMV9 e OCSI (Tabela 1), que permitem identificar pelo tamanho do fragmento parte da seqüência do vetor com o cDNA de *PROPEP1* inserido (698 pb); e com os iniciadores *AtPep-A* e *AtPep-S* (Tabela 1), que permitem identificar a presença do cDNA de *PROPEP1* (279 bp). Foram confirmadas 5 colônias contendo o cDNA de *PROPEP1* no vetor pGSA1427.

Para as colônias transformadas com os vetores pEGAD e pGSA foram realizadas reações independentes com os oligonucleotídeos iniciadores 5A e EGAD (Tabela 1), que permitem identificar pelo tamanho do fragmento parte da seqüência do vetor pEGAD (117 pb); e com os oligonucleotídeos iniciadores CaMV9 e OCSI (Tabela 1), que permitem identificar pelo tamanho do fragmento parte da seqüência do vetor pGSA (419 pb). Todas as colônias confirmaram a presença dos vetores pEGAD ou pPGSA. Observou-se que os produtos amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores CaMV9 e OCSI apresentaram 3 fragmentos, sendo o fragmento de 419 pb referente a parte da seqüência do vetor pGSA1427, sem o cDNA de *PROPEP1*. A reação de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores CAMV9 e OCSI também amplifica outros dois fragmentos inespecíficos devido à similaridade de seqüência entre um dos oligonucleotídeos iniciadores (CaMV9) e outras seqüências do promotor CaMV-35S localizadas a montante no vetor pGSA1427.

A autenticidade dos clones foi verificada através de seqüenciamento. O produto da PCR com os oligonucleotídeos indicadores AtPep-E e AtPep-H ou AtPep-A e AtPep-S de 3 plasmídeos pEGAD-AtPep e 3 plasmídeos pGSA-AtPep de colônias positivas pela PCR (Figura 4B) foram seqüenciados. Todas as amostras apresentaram seqüências idênticas a do cDNA de *PROPEP1* (Genbank At5g64900) (Huffaker *et al*, 2006) .

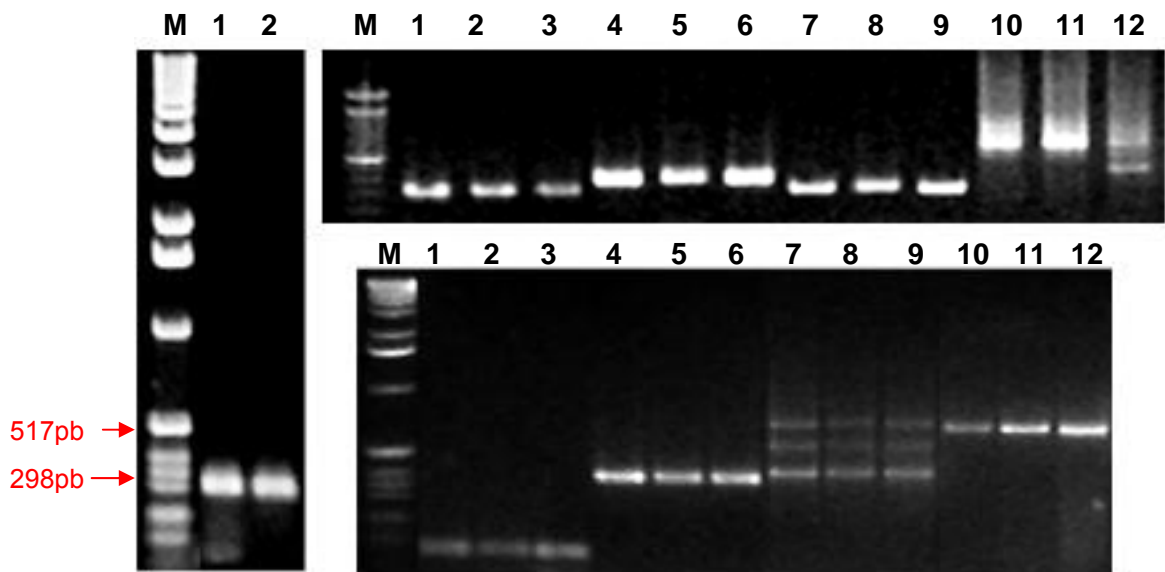


FIGURA 4. Eletroforese em gel de agarose com fragmentos amplificados de *PROPEP1*. (A) Produtos de RT-PCR obtidos de RNA de plantas de *A. thaliana* com os iniciadores 1 - AtPep-A e AtPep-S e 2 - AtPep-E e AtPep-H (B) 1 a 6 - produtos de PCR obtidos de DNAs de plasmídeos pEGAD-AtPep. 1 a 3 amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores AtPep-E e AtPep-H, e de 4 a 6 com 5A e EGAD; 7 a 12 - produtos de PCR obtidos de DNAs de plasmídeos pGSA-AtPep. 7 a 9 amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores AtPep-A e AtPep-S e de 10 a 12 com CaMV9 e OCSI. (C) 1 a 12 produtos de RT-PCR obtidos de DNA de plantas de *A. thaliana* transformadas com os vetores 1 a 3 pEGAD e 4 a 6 pEGAD-AtPep amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores 5A e EGAD; e 7 a 9 pGSA1427 e 10 a 12 pGSA-AtPep amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores CaMV9 e OCSI. M – marcador de massa molecular 1 Kb (DNA Ladder, Invitrogen);

4.3 Seleção das plantas transformadas de *A. thaliana*.

Com o objetivo de minimizar a ocorrência de alterações inesperadas devido a variação somaclonal freqüentemente observada em processos de transformação de células vegetais que necessitam cultivo de tecidos *in vitro* (Labra *et al.*, 2004), foi utilizado no presente estudo o método de transformação floral, no qual as plantas são transformadas por aplicação direta de *A. tumefaciens* ao tecido floral (Clough & Bent, 1998; Chung *et al.*, 2000).

No método de transformação floral, os óvulos são as estruturas alvo da transformação (Desfeux *et al.*, 2000). Clough & Bent (1998), demonstraram que plantas inoculadas com numerosos brotos florais imaturos e poucas siliquis encontravam-se mais predispostas à transformação. Assim, as plantas de *A. thaliana* em estádios iniciais de florescimento foram utilizadas como alvo da transformação no presente estudo.

A transformação floral de *A. thaliana* foi realizada com uma cultura bacteriana com densidade óptica de aproximadamente 2,0 (OD₆₀₀). Este valor foi considerado o mais adequado para a obtenção de maior eficiência no índice de transformação floral. Martínez-Trujillo *et al.* (2004) demonstraram que uma densidade óptica de 2,0 (OD₆₀₀) elevou a eficiência da transformação em mais que o dobro em relação aquela obtida com uma cultura com densidade óptica de 0,8 (OD₆₀₀). Esta elevação no índice de transformação possivelmente está relacionada com a existência de maior quantidade de células bacterianas sobre a superfície das plantas. Porém, em estudos anteriores foram usadas distintas concentrações de *A. tumefaciens* para transformação. Clough & Bent (1998) mostraram que densidades entre 0,15 e 1,75 (OD₆₀₀) não altera a taxa de eficiência da transformação. Já Cutler *et al.* (2000), usaram uma densidade óptica

de aproximadamente 0,5 (OD_{600}) em um estudo no qual uma biblioteca de cDNAs foi introduzida em *A. thaliana* através de *A. tumefaciens*.

Plantas de *A. thaliana* (T0) foram transformadas com *A. tumefaciens* contendo o cDNA do gene codificante do peptídeo AtPep1, *PROPEP1*, fusionado ao gene GFP no vetor pEGAD (pEGAD-AtPep) e com *A. tumefaciens* contendo o cDNA de *PROPEP1* inserido no vetor pGSA1427 (pGSA-AtPep). Paralelamente, plantas de *A. thaliana* (controles) foram transformadas com *A. tumefaciens* contendo os vetores pEGAD e pGSA1427 sem o cDNA de *PROPEP1*(controles).

As plantas T1 foram avaliadas quanto à tolerância ao herbicida glufosinato de amônio (Finale[®]) 15 dias após a emergência. O critério de seleção para a presença de tolerância foi a presença de plantas que apresentavam desenvolvimento compatível com o estágio de desenvolvimento e presença de pigmentação foliar verde. Para ausência de tolerância foi avaliado o desenvolvimento reduzido em relação ao estágio de desenvolvimento (ou morte) e pigmentação foliar clorótica (ou necrose) (Figura 5)



FIGURA 5. Efeito do herbicida glufosinato de amônio (Finale[®]) na seleção de plantas T1 de *A. thaliana*.

Cerca de 30 a 55% das plantas T1 transformadas com os vetores pEGAD e pGSA1427 com e sem o cDNA de *PROPEP1* germinaram. Este baixo percentual de germinação pode estar relacionado com o período de coleta de sementes. Chung *et al.* (2000) recomendam que a coleta deverá ser após 3 ou 4 semanas da transformação, porém no presente estudo, tendo em vista a necessidade de cumprimento do cronograma, foi necessário coletar as sementes após 15 dias da transformação, o que pode ter prejudicado a germinação.

Para confirmação de que as plantas transformadas e tolerantes ao herbicida continham as inserções desejadas, o DNA de todas as plantas foi avaliado através de PCR com um dos seguintes pares de oligonucleotídeos iniciadores 5A e EGAD ou com AtPep-E e AtPep-H (Tabela 1) para as plantas transformadas com o vetor pEGAD e pEGAD-AtPep; CaMV9 e OCSI ou com AtPep-A e AtPep-S (Tabela 1) para as plantas transformadas com o vetor pGSA1427 e pGSA-AtPep. Os resultados indicaram a presença dos fragmentos esperados de PCR em: 25 plantas transformadas com o vetor pGSA1427, 9 plantas transformadas com o vetor pGSA-AtPep, 19 plantas transformadas com o vetor pEGAD e 20 plantas transformadas com o vetor pEGAD-AtPep.

Os produtos de PCR obtidos do DNA de 3 plantas T1 transformadas com cada um dos 4 distintos plasmídeos (Figura 4C) foram selecionados para confirmação da inserção do cDNA através de seqüenciamento (Apêndice 3). As amostras do DNA das plantas transformadas com os vetores pEGAD e pEGAD-AtPep foram amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores 5A e EGAD e os produtos amplificados foram seqüenciados com o oligonucleotídeo iniciador EGAD, resultando em seqüências idênticas ao vetor pEGAD e ao cDNA de *PROPEP1*, respectivamente. Enquanto as amostras de DNA das plantas transformadas com os vetores pGSA e pGSA-AtPep foram amplificada com os

oligonucleotídeos iniciadores CaMV9 e OCSI e seqüenciadas com o oligonucleotídeo iniciador OCSI, estes por sua vez apresentaram seqüência idêntica ao vetor pGSA e ao cDNA de *PROPEP1*, respectivamente (Apêndice 3).

Os resultados obtidos através do cálculo da eficiência apresentados na Tabela 2, apontam uma baixa eficiência de transformação (0,12 – 0,34%) quando comparado com os estudos de Clough & Bent (1998), que obtiveram uma eficiência de 1% nas plantas transformadas por transformação floral por imersão dos brotos florais. Chung *et al.* (2000) obtiveram eficiências de transformação ainda maiores: 2,09% para a transformação floral de *A. thaliana* por imersão e 2,41% por aspersão. Entretanto, Martínez-Trujillo *et al.* (2004), observaram que o método de transformação floral por imersão afetava o desenvolvimento das siliquis e sugeriu uma inoculação direta em cada flor através do uso de uma micropipeta. Este método apresentou um aumento da eficiência de transformação de 2 a 3% devido a inoculação seletiva dos brotos florais ainda fechados e uma diminuição dos danos causados pelo surfactante. Porém este método é extremamente laborioso e não representa um incremento na eficiência em relação aos obtidos anteriormente por aspersão (Chung *et al.*, 2000).

Tabela 2. Análise da eficiência da transformação floral de *A. thaliana*.

	Sementes de plantas T0	Plantas T1 germinadas (%)	Plantas T1 transgênicas* tolerantes a herbicida** (%)***
pGSA1427	18,000	7.300 (40,7)	25 (0,34)
pGSA1427-AtPep	24,000	7.200 (30,0)	9 (0,12)
pEGAD	30,000	16.400 (54,8)	19 (0,12)
pEGAD-AtPep	19,000	9.800 (51,6)	20 (0,20)

*Plantas com a presença do gene de interesse confirmados por PCR.

** Glufosinato de amônio 10 µM

*** Percentual de plantas tolerantes ao herbicida em relação ao total de plantas germinadas.

Outro fator que está relacionado com a baixa eficiência é a escolha do estágio de desenvolvimento dos brotos florais, uma vez que plantas de *A. thaliana* formam uma inflorescência indeterminada, apresentando flores com distintos estágios de desenvolvimento (Desfeux *et al.*, 2000). No presente estudo, foi tentado minimizar este fator através da aspersão de *A. thumefaciens* em distintos períodos. Na primeira pulverização foram utilizadas plantas com brotos florais com poucas flores abertas, na segunda pulverização foram utilizadas plantas com brotos florais com a maioria das flores abertas e iniciando a produção de siliquis e na terceira pulverização foram utilizadas plantas com brotos florais com flores totalmente abertas e desenvolvimento de siliquis. As pulverizações foram realizadas com intervalos de 7 dias. Provavelmente, a eficiência poderia ser aumentada com um número maior de pulverizações e intervalos menores entre as pulverizações.

Entretanto, apesar da eficiência inferior aos trabalhos relatados, a facilidade, rapidez e eficácia do método empregado no presente estudo são amplamente favoráveis quando comparados com outros processos de transformação.

4.4 Quantificação da expressão de *PROPEP1* em plantas transformadas e inoculadas com *Pythium* spp

Estudos prévios têm relatado a importância do peptídeo endógeno *AtPep1* de *A. thaliana* na via de sinalização de respostas de defesa contra *Pythium irregulare* e na indução de genes envolvidos nas respostas de defesa da planta (Huffaker *et al.*, 2006; Huffaker & Ryan, 2007). No presente estudo, foram avaliados o efeito da superexpressão de *PROPEP1*, e consequente expressão do peptídeo *AtPep1*, na defesa contra diferentes espécies do gênero *Pythium* e a

existência de uma relação entre a ativação de respostas de defesa por *AtPep1* e a expressão do gene *PDF1.2*. Para tanto, foi realizada extração do mRNA da progênie T2 de plantas transformadas com os vetores pEGAD (evento pEGAD-02) e pEGAD-*AtPep* (eventos *AtPep*-03 e *AtPep*-04) após 20 dias em meio seletivo contendo o herbicida glufosinato de amônio, e 5 dias em contato com zoósporos dos isolados das espécies de *P. graminicola* (isolado 12), *P. deliense* (isolado 17), *P. inflatum* (isolado 29), *P. ultimum* (isolado 95) ou *P. dissotocum* (isolado 123). Em cada evento, foi extraído mRNA de 1 planta inoculada e de 1 planta não inoculada. As plantas inoculadas com os isolados de *P. inflatum* e *P. ultimum* não foram utilizadas para extração de mRNA, pois não foi possível detectar em microscópio o crescimento do patógeno no tecido vegetal.

Através do uso de um método de alta sensibilidade como o RT-qPCR, foi possível quantificar o acúmulo diferencial de mRNA do gene *PROPEP1*, após transformação com o vetor pEGAD-*AtPep* (plantas T2) em relação a plantas transformadas com o vetor pEGAD (plantas T2). As plantas transformadas de ambos os eventos e inoculadas com *P. graminicola* ou *P. deliense* foram analisadas pelo mesmo método.

Os resultados obtidos com a análise de expressão relativa comprovam que a progênie T2 de plantas transformadas com o vetor pEGAD-*AtPep* dos diferentes eventos (*AtPep*-03 e *AtPep*-04) apresentam altos níveis de acumulação de mRNA do gene codificante do peptídeo *AtPep1*, independentemente da inoculação, comparado com níveis de *PROPEP1* acumulados nas plantas transformadas com o vetor pEGAD. A expressão relativa de *PROPEP1* chega a ser 1.000 vezes superior a do calibrador (pEGAD02-C) em plantas do evento *AtPep*-03 não inoculada e 4.000 vezes superior em plantas do mesmo evento inoculadas com *P. deliense* (Figura 6, Apêndice 4). Estes resultados atestam que o mRNA de

PROPEP1 é acumulado em níveis muito altos nas plantas do evento AtPep-03, indicando que ocorreu a superexpressão deste gene.

As plantas do evento AtPep-03 quando inoculadas com os isolados *P. graminicola* (isolado 12) e *P. deliense* (isolado 17) apresentaram expressão relativa de *PROPEP1* significativamente superior a expressão relativa das plantas não inoculadas do mesmo evento (Figura 6). Este aumento significativo na expressão relativa de *PROPEP1*, possivelmente se deve a inoculação com *Pythium* spp. Neste caso, AtPep1 amplifica a sinalização de defesa do hospedeiro pelo reconhecimento dos patógenos através das PAMPs e seus receptores, ativando as vias de defesa e induzindo a expressão de genes de defesa, assim como no modelo proposto por Huffaker & Ryan (2007), Figura 1.

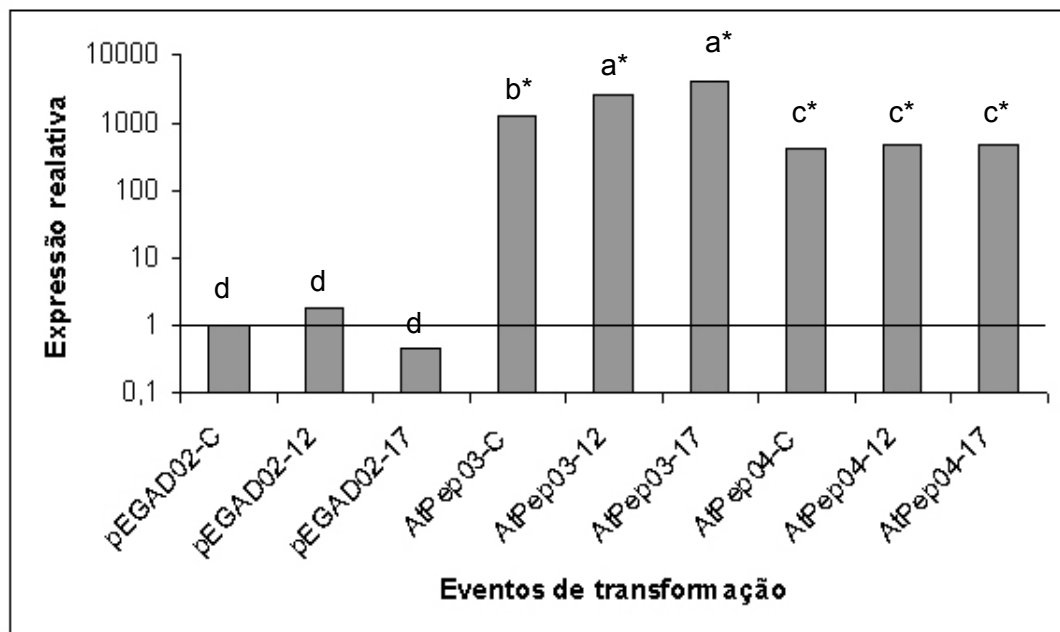


FIGURA 6. Expressão relativa do gene codificante do peptídeo AtPep1. Progênie T2 de plantas de *A. thaliana* (evento pEGAD02) e pEGAD-AtPep (eventos AtPep-03 e AtPep-04), não inoculados (C), inoculados com *P. graminicola* (isolado 12) e *P. deliense* (isolado 17). Todos os valores de Cts foram normalizados em relação aos valores dos Cts do controle endógeno (Gapdh). Os valores da expressão representam o número de vezes que a expressão aumenta ou diminui em relação ao calibrador pEGAD02-C. * Tukey $P \leq 0,05$

4.5 Relação entre a expressão de *PROPEP1* e genes relacionados a respostas de defesa em plantas transformadas

Para verificar se a superexpressão de *PROPEP1* e conseqüentemente de seu peptídeo *AtPep1* está relacionada com genes de defesa da planta, como PDF1.2 foi realizada 2 reações de RT-qPCR com os oligonucleotídeos iniciadores Gapdh-F e Gapdh-2R para o gene constitutivo Gapdh, utilizado como controle endógeno, e PDF1.2-E e PDF1.2-R para o gene PDF1.2 (Tabela 1). Desta forma foi possível quantificar o acúmulo de mRNA do gene PDF1.2 após transformação com o vetor pEGAD-*AtPep* (plantas T2) em relação a plantas transformadas com o vetor pEGAD (plantas T2). As plantas transformadas de ambos os eventos e inoculadas com *P. graminicola* ou *P. deliense* foram analisadas pelo mesmo método.

Os resultados obtidos com a análise de expressão relativa comprovam que a progênie T2 de plantas transformadas com o vetor pEGAD-*AtPep* do evento *AtPep-03* apresenta altos níveis de acumulação de mRNA do gene da defensina PDF1.2, quando inoculada com *P. deliense*, comparado com níveis de PDF1.2 acumulados nas plantas transformadas com o vetor pEGAD. A expressão relativa de PDF1.2 chega a ser 1.680 vezes superior a do calibrador (pEGAD02-C) em plantas do evento *AtPep-03* inoculada com *P. deliense* (Figura 7, Apêndice 5). Estes resultados estão correlacionados com o acúmulo dos altos níveis de mRNA de *PROPEP1* encontrados nas plantas do evento *AtPep-03* inoculada com *P. deliense*, no item 4.4, indicando que a superexpressão deste gene na presença de *P. deliense* elevou a expressão relativa da defensina PDF1.2.

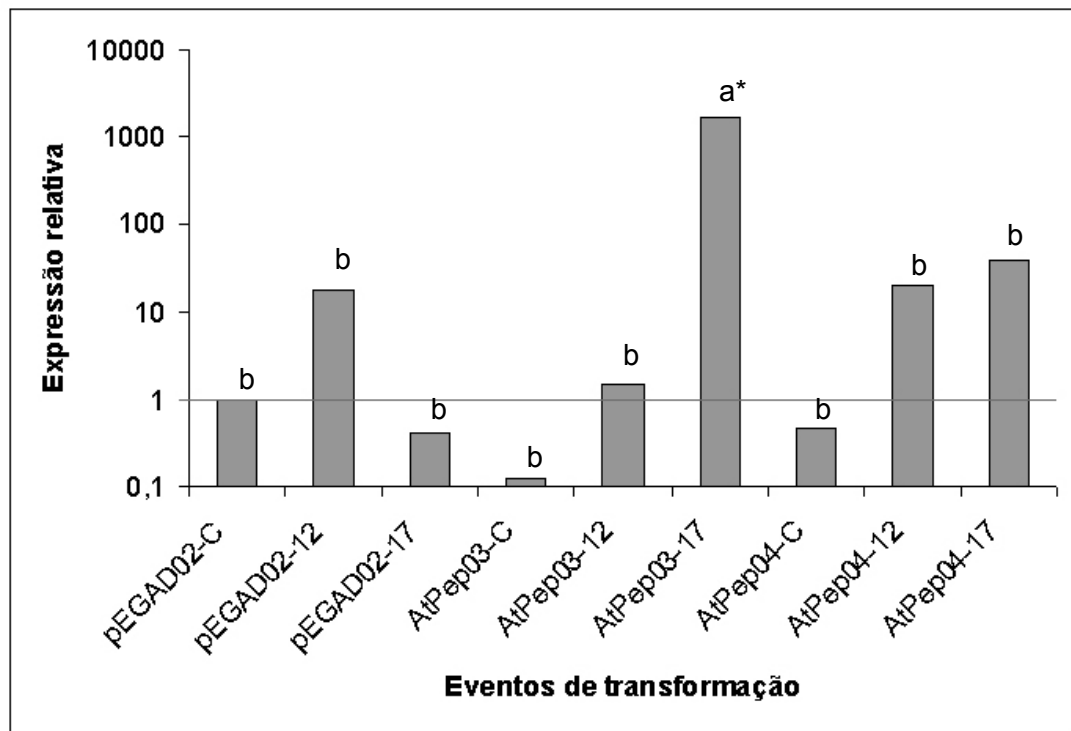


FIGURA 7. Expressão relativa do gene PDF1.2. Progenie T2 de plantas de *A. thaliana* (evento pEGAD02) e pEGAD-AtPep (eventos AtPep-03 e AtPep-04), não inoculados (C), inoculados com *P. graminicola* (isolado 12) e *P. deliense* (isolado 17). Todos valores de Cts foram normalizados em relação aos valores dos Cts do controle endógeno (Gapdh). Os valores da expressão representam o número de vezes que a expressão aumenta ou diminui em relação ao calibrador pEGAD02-C. * Tukey $P \leq 0,05$

Este aumento significativo na expressão relativa de PDF1.2, possivelmente se deve a inoculação com *Pythium* spp. Neste caso, a superexpressão de *PROPEP1* faz com que mais AtPep1 seja clivado no interior da célula amplificando a sinalização de defesa do hospedeiro pelo reconhecimento dos patógenos através das PAMPs e seus receptores, ativando as vias de defesa e induzindo a expressão de genes de defesa, assim como no modelo proposto por Huffaker & Ryan (2007), Figura 1.

Outro fato observado está associado com a variação da acumulação de mRNA de PDF1.2 em plantas pEGAD-AtPep inoculadas com diferentes espécies de *Pythium*, indicando que existe uma resposta diferencial do patógeno em relação ao mecanismo de defesa. Huffaker *et al.* (2006) verificaram que ocorre

uma expressão diferencial dos 6 membros da família PROPEP em respostas a determinados patógenos. Este fato sugere que a maior acumulação de mRNA de PDF1.2 das plantas pEGAD-AtPep inoculadas com *P. deliense* possivelmente está relacionada ao reconhecimento do peptídeo de AtPep1 a sua proteína precursora PROPEP1, o que pode não estar ocorrendo na presença de outro patógeno em plantas pEGAD-AtPep inoculadas com *P. graminicola*.

Huffaker & Ryan (2007), propuseram um modelo no qual a indução de genes de defesa PDF1.2 é ativada pelo reconhecimento de PAMPs flg22 e elf18 pelos seus respectivos receptores, FLS e ERF. Estes regulam as vias de sinalização JA/Et e SA e conseqüentemente induzem genes de defesa, PDF1.2 e PR, respectivamente. Segundo os autores citados acima, este mecanismo é retroalimentado pela produção de peptídeos AtPep que podem amplificar as vias de sinalização e expressar os genes de defesa destas vias (Figura 1). Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que plantas que superexpressam o gene PROPEP1 conseqüentemente superexpressam o peptídeo AtPep1, quando inoculadas com *P. deliense* amplificam a via de sinalização JA/Et induzindo genes PDF1.2. Porém quando plantas superexpressando o peptídeo AtPep1 é inoculado com *P. graminicola* observa-se um baixo acúmulo de mRNA de PDF1.2. Este fato pode estar relacionado com um bloqueio na via de sinalização, pelo não reconhecimento das PAMPs pelos seus receptores (Figura 1).

Cabe ressaltar que nos trabalhos realizados por Huffaker *et al.* (2006) e Huffaker & Ryan (2007) os níveis de expressão de AtPep1, PROPEP1 e PDF1.2 foram determinados por RT-PCR semi-quantitativo. Além disso, os autores verificaram a expressão de AtPep1 e PDF1.2 em plantas tipo selvagem de *A. thaliana* e na ausência de patógenos, sendo a indução de AtPep1 realizada

através de ensaios pela imersão de folhas de *A. thaliana* em extratos artificiais do peptídeo AtPep1 em concentrações nM. No presente estudo, a expressão relativa de *PROPEP1* e PDF1.2 foram quantificadas pelo método de alta sensibilidade RT-qPCR, em plantas transformadas com e sem a superexpressão de *PROPEP1* e na presença e ausência do patógeno, representando uma situação real das respostas da planta a infecção por patógenos.

4.6 Localização subcelular de GFP::*PROPEP1*

No presente estudo, o cDNA de *PROPEP1* foi fusionado com uma variante do gene GFP (EGFP), resultando na proteína de fusão GFP::*PROPEP1*. A presença do cDNA inserido não necessariamente indica que o gene de interesse introduzido seja expresso. O chamado efeito de posição, relacionado ao locus no qual o gene foi inserido, faz com que variações na expressão de um gene sejam observadas, inclusive o total silenciamento do gene de interesse (Mlynarova *et al.*, 1996). Assim sendo metodologias que monitorem a expressão do gene inserido são necessárias para caracterização molecular das plantas. A transcrição dos genes nas plantas transgênicas foi observada a partir de experimentos de RT-PCR. Os resultados mostraram a presença de transcritos específicos à todas as construções utilizadas nos diferentes transformantes, conforme descrito no item 4.3 . A progênie T2 de plantas pEGAD e pEGAD-AtPep foi avaliada por microscopia de fluorescência para identificar plantas transgênicas expressando GFP.

Quinze dias após a seleção das plantas transformadas pela ação do herbicida glufosinato de amônio (7 dias após a inoculação com zoósporos de *Pythium* spp.) 3 plantas de cada evento independente de transformação foram avaliadas: 2 eventos independentes de progênies de plantas transformadas com

pEGAD e 3 eventos de progênies de plantas transformadas com pEGAD-AtPep. As plântulas de todos 5 eventos independentes apresentaram padrões de localização subcelular similares tanto nas células das folhas como nas células das raízes (Figura 8). Foi possível verificar acúmulo de fluorescência na parede celular e ou membrana e no citoplasma, porém não foi verificado acúmulo de fluorescência no núcleo.

Para obter a localização do produto de um cDNA inserido nas plantas pela visualização com GFP, a fase de leitura do cDNA e da GFP tem que ser compatíveis, ou seja elas devem manter a identidade entre os aminoácidos, garantindo a integridade da proteína a ser expressa (Misawa *et al.*, 2000). No presente estudo foi confirmada a integridade da fase de leitura do cDNA e da GFP através do sequenciamento das plantas transgênicas, embora a construção dos vetores e posterior clonagem do inserto tenham sido realizados com o objetivo de manter a integridade da proteína, como foi mencionado nos materiais e métodos.

No estudo realizado por Oard & Enright (2006) foi observada a atividade antimicrobiana de peptídeos codificados por genes que foram introduzidos em *A. thaliana*. A fusão com EGFP demonstrou a acumulação da proteína β -Purotionina em tricomas da planta pelo redirecionamento do sinal fluorescente. A proteína quimérica deteve o desenvolvimento de um fungo patogênico na superfície foliar e estômatos, demonstrando atividade semelhante à observada *in vitro*. Desta forma, no presente estudo o fenótipo encontrado entre os diferentes eventos de transformação indica que o gene codificante do peptídeo AtPep1 não apresenta um direcionamento específico a determinadas localizações pela fusão do seu gene a uma variante do GFP. Possivelmente o gene codificante do peptídeo AtPep1 não possui um sinal que determine seu direcionamento.

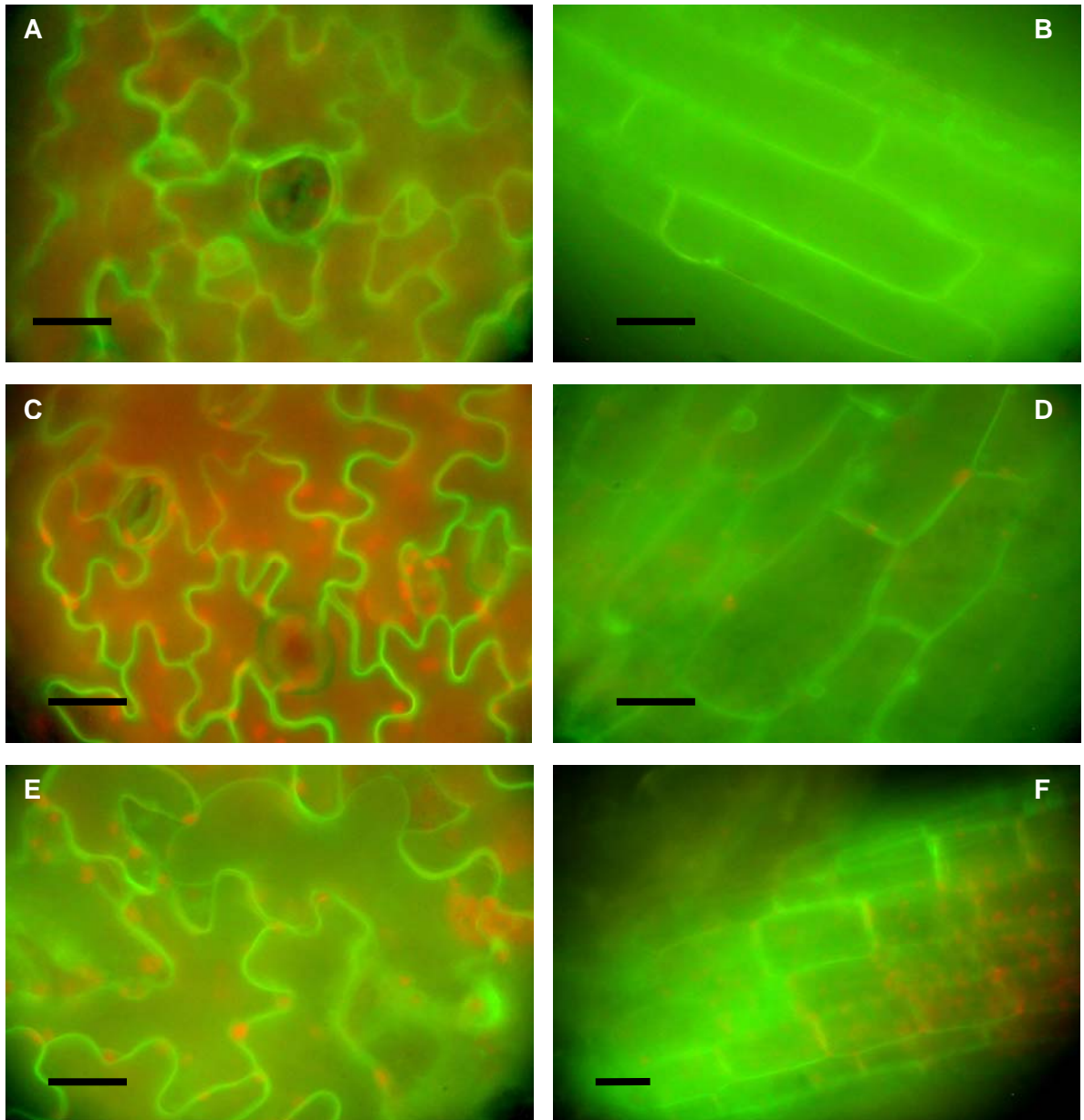


FIGURA 8. Localização subcelular de GFP em plantas T2 de *A. thaliana*, transformadas com o vetor pEGAD e pEGAD-AtPep. A e B - Imagem de células de folha e raiz de plantas transformadas com o vetor pEGAD, respectivamente. C e D - Imagem de células de folha e raiz de plantas do evento de transformação pEGAD-AtPep 03, respectivamente. E e F - Imagem de células de folha e raiz de plantas do evento de transformação pEGAD-AtPep 04, respectivamente. Barra representa 20 μm .

4.7 Patogenicidade de diferentes isolados de *Pythium* spp. a *A. thaliana*.

O teste de patogenicidade apresentou resultados significativos quanto à presença de sintomas como pigmentação amarelada nas folhas e morte de plantas de *A. thaliana* inoculadas com os isolados de *Pythium* spp. Todos isolados estudados foram patogênicos a *A. thaliana*, pois embora não foram obtidas diferenças estatísticas entre os isolados de *P. graminicola* e *P. inflatum* e as plantas controle (Figuras 10 e 11), todas as plantas foram infectadas pelos diferentes isolados conforme foi observado em análise de microscopia realizada nas raízes das plantas (Figura 9). Entretanto, o que foi observado é que existe uma diferença na virulência dos diferentes isolados. Cabe ressaltar que este estudo é o primeiro relato sobre a infecção de isolados das espécies de *P. graminicola*, *P. deliense*, *P. inflatum*, *P. ultimum* e *P. dissotocum* em plantas de *A. thaliana*.

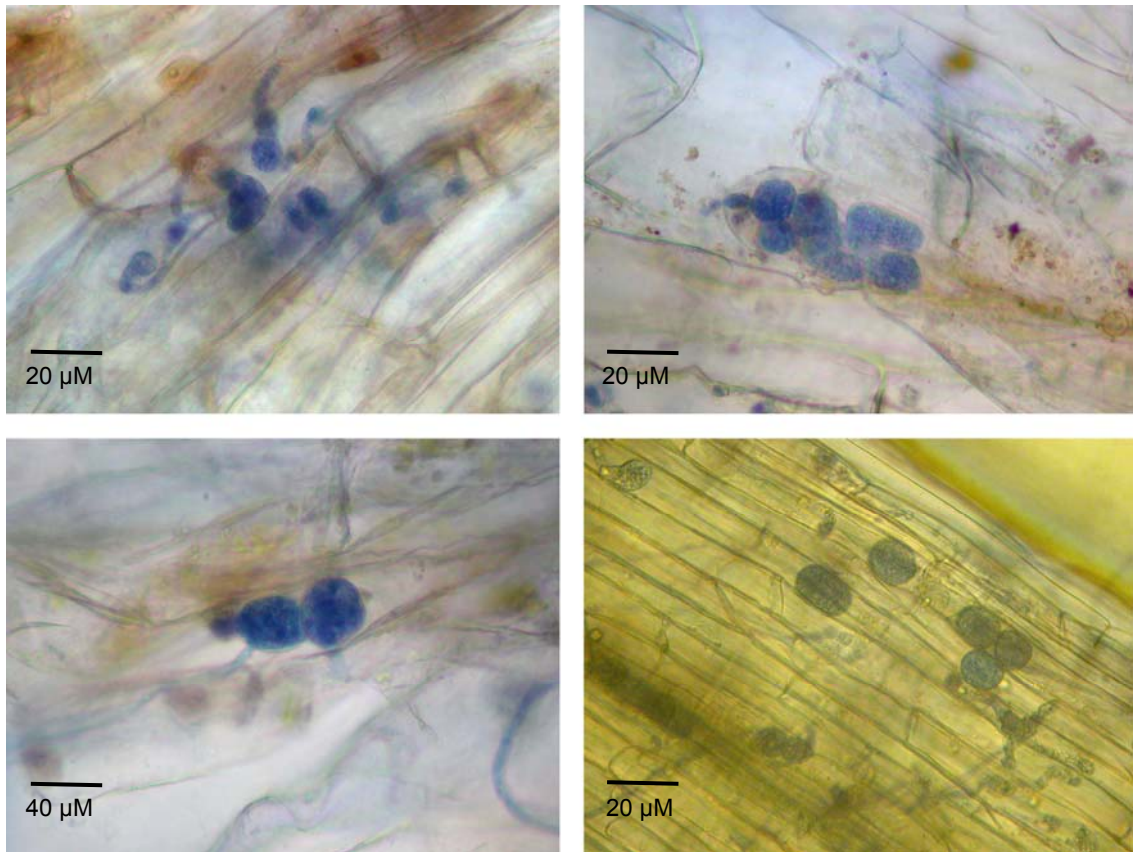


FIGURA 9. Estruturas observadas em raízes de plântulas de *A. thaliana* inoculadas com isolados de diferentes espécies do gênero *Pythium*. Os tecidos foram corados com azul de trypan e visualizados em microscópio ótico. a) Esporângios de *P. graminicola*; b) Esporângios e vesículas de *P. inflatum*; c) Esporângio de *P. deliense*; d) Vesículas de *P. ultimum* em tecido radicular necrosado.

Quando avaliada a presença de amarelecimento, foi possível observar que 2,66 % das plantas de *A. thaliana* inoculadas com o isolado de *P. graminicola* apresentaram incidência da doença. Esse resultado não diferiu significativamente ($P \leq 0,05$) das plantas controle não inoculadas (ausência de sintomas). Por outro lado, um maior percentual de incidência foi observado nos tratamentos de inoculação com os isolados de *P. inflatum* (6 %) e *P. deliense* (8 %). O percentual de incidência nesses dois casos difere significativamente do controle, porém não do tratamento de inoculação com o isolado de *P. graminicola*. A maior incidência de plantas com sintomas foi obtida no tratamento inoculado com o isolado de *P. ultimum* (25,33 %), como pode ser observado na Figura 10.

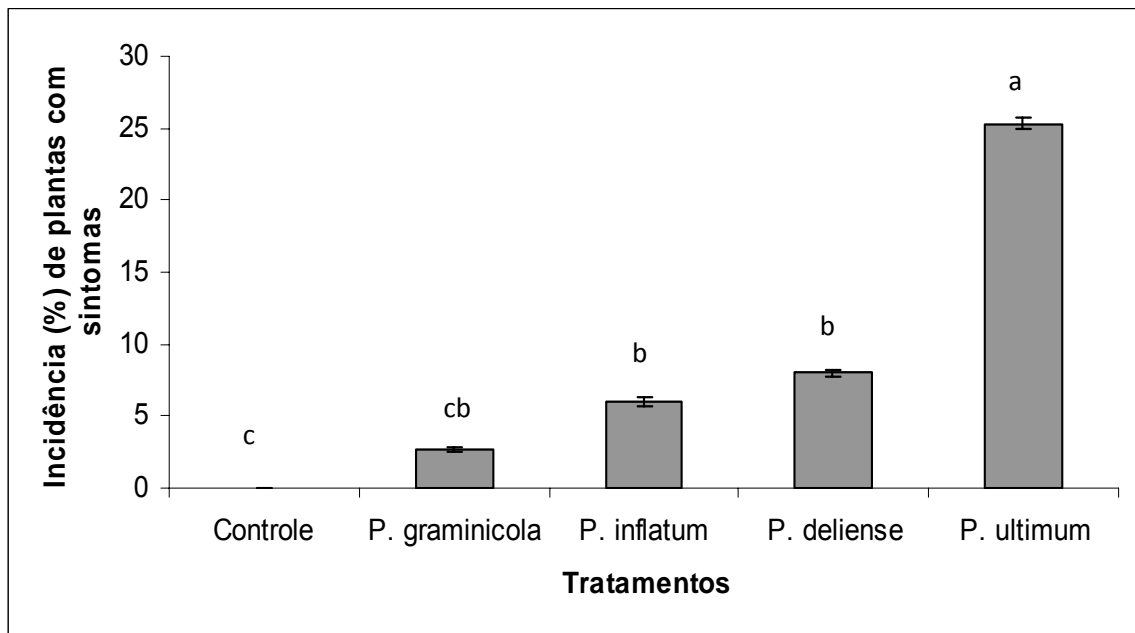


FIGURA 10. Incidência de plantas de *A. thaliana* com amarelecimento. Plantas controle (não inoculadas) e plantas inoculadas com os isolados de *P. graminicola*, *P. inflatum*, *P. deliense* e *P. ultimum*. Barras representam as médias da incidência de sintomas \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes. * Tukey $P \leq 0,05$

Outro sintoma observado foi o da morte de plantas de *A. thaliana* quando inoculadas com os diferentes isolados de *Pythium* spp. (Figura 11), onde foram obtidos resultados similares aos encontrados na avaliação do sintoma de amarelecimento (Figura 10). Assim como no caso do amarelecimento, a inoculação com o isolado de *P. ultimum* apresentou uma alta incidência de morte (48 %). A virulência de um isolado de determinado patógeno está associada à quantidade de doença induzida no hospedeiro, ou seja, quanto maior a intensidade da doença, mais virulento o isolado. Enquanto a agressividade está associada à velocidade no aparecimento dos sintomas da doença, ou seja, quanto mais agressivo for determinado isolado, mais rápido será o aparecimento dos sintomas (Agrios, 2004). Estes dois fatores foram avaliados no presente estudo, sendo *P. ultimum* considerado o isolado mais virulento e o mais agressivo para as plantas de *A. thaliana*.

Ingran & Cook (1990), ao avaliarem a patogenicidade de 4 espécies de *Pythium* em trigo, ervilha, lentilha e cevada, constataram que as espécies mais virulentas foram *P. ultimum* e *P. irregulare*. Higginbotham *et al.* (2004), examinaram a virulência entre isolados de *Pythium* spp. coletados de grãos de trigo e verificaram que os isolados de *P. debaryanum* e *P. ultimum* foram os mais virulentos.

Além de ser considerado um patógeno extremamente virulento para diversos cultivos, *P. ultimum* também tem sido considerado um dos patógenos mais agressivos. Em estudos realizados por Zhang & Yang (2000), onde foram avaliados diversos isolados de *P. ultimum* obtidos de plântulas infectadas de soja, foi verificado que 70% dos isolados foram altamente agressivos às culturas de soja e milho. Herrero *et al.* (2003) testaram a patogenicidade de 16 espécies de *Pythium* coletadas de pepinos em cultivo hidropônico. Entre as espécies testadas, as mais agressivas foram: *P. aphanidermatum*, *P. irregulare*, *P. paroecandrum* e *P. ultimum*. Em outro trabalho Benard & Punja (1995) demonstraram que entre 8 espécies de *Pythium* patogênicas à cenoura, as mais agressivas foram *P. violae*, *P. ultimum* e *P. sulcatum*. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho, evidenciando a virulência e agressividade de *P. ultimum*.

Segundo Plaats-Niterink (1981), diversos fatores contribuem para o sucesso da infecção de *Pythium* spp., entre eles a densidade de inóculo, conteúdo de água no solo, temperatura, pH, intensidade de luz e presença de outros microorganismos. De acordo com o autor, a influência da temperatura na patogenicidade e na severidade de doença, pode depender tanto de variações entre as espécies e isolados de *Pythium*, quanto dos hospedeiros envolvidos. É importante observar que a temperatura na qual foram conduzidos os experimentos para avaliação da patogenicidade (20 ± 2 °C), é possivelmente

favorável tanto ao desenvolvimento das plantas de *A. thaliana* como à infecção por *P. ultimum*. Plaats-Niterink (1981) descreveu que o crescimento de *P. ultimum* no solo ocorre em temperaturas abaixo de 20 °C. Essa é uma possível explicação para a maior incidência da doença quando a inoculação é realizada com um isolado dessa espécie.

A incidência de plantas mortas inoculadas com os isolados de *P. graminicola* (14,66 %) e *P. inflatum* (14 %) não diferiram ($P \leq 0,05$) do controle (8 %). Além disso, as plantas de *A. thaliana* inoculadas com os isolados de *P. graminicola* e *P. inflatum* não apresentaram uma incidência de plantas mortas que diferisse ($P \leq 0,05$) do percentual de incidência de plantas inoculadas com o isolado *P. deliense* (22,66 %), embora este tenha diferido significativamente ($P \leq 0,05$) do percentual de plantas mortas do tratamento controle.

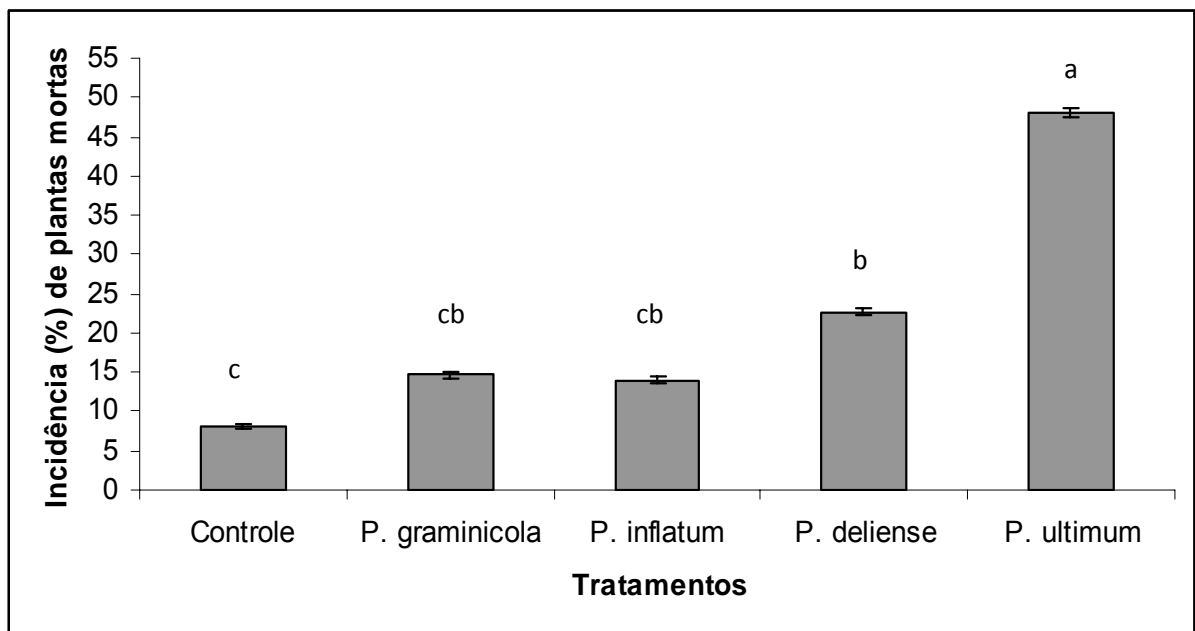


FIGURA 11. Incidência de plantas mortas de *A. thaliana*. Plantas controle (não inoculadas) e plantas inoculadas com os isolados de *P. graminicola*, *P. inflatum*, *P. deliense* e *P. ultimum*. Barras representam as médias da incidência de morte \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes. * Tukey $P \leq 0,05$

4.8 Patogenicidade de diferentes isolados de *Pythium* spp. a *A. thaliana* transformadas com os vetores pEGAD e pEGAD-AtPep

Huffaker *et al.* (2006) avaliaram plantas transformadas de *A. thaliana* superexpressando o gene codificante do AtPep1 (*PROPEP1*) quanto à resistência a *P. irregulare*. Com o objetivo de amplificar a via de sinalização de genes de defesa, no presente estudo foi superexpressado o gene codificante do peptídeo AtPep1, o qual ativa a transcrição de defensinas, para verificar a resistência as espécies de *P. graminicola*, *P. deliense*, *P. inflatum*, *P. ultimum* e *P. dissotocum*.

As progênes T2 de plantas de *A. thaliana* de 2 eventos de transformação com o vetor pEGAD (pEGAD-02 e pEGAD-05) e 3 eventos de transformação com o vetor pEGAD-AtPep (AtPep-03, AtPep-04 e AtPep-05), foram avaliadas 7 dias após a inoculação quanto a resistência aos isolados de *P. graminicola* (isolado 12), *P. deliense* (isolado 17), *P. inflatum* (isolado 29), *P. ultimum* (isolado 95) e *P. dissotocum* (isolado 123). Os dados referentes às plantas inoculadas com os isolados de *P. inflatum* (isolado 29) e *P. ultimum* (isolado 95) não foram considerados na análise estatística, pois não foi possível detectar em análise de microscopia o crescimento do patógeno, embora experimentos prévios realizados com plantas de *A. thaliana* crescidas em placas de Petri contendo meio MS com e sem glufosinato de amônio e inoculadas com *P. ultimum* apresentaram crescimento do patógeno independente da presença do herbicida (dados não apresentados). Além disso, o evento AtPep-05 foi descartado das avaliações pois devido ao pequeno tamanho das plântulas, ocorreu morte do tratamento controle, possivelmente devido a danos causados pela transferência das plântulas para novas placas ou pelo excesso de umidade na placa.

Os resultados indicam um baixo percentual de sobrevivência de plantas pEGAD resistentes à inoculação com *P. deliense* (isolado 17), que diferiu

significativamente ($P \leq 0,05$) do percentual das plantas pEGAD-AtPep inoculadas com o mesmo isolado (Tabela 3). O maior percentual de sobrevivência nas plantas transformadas com o vetor pEGAD-AtPep, indica que a superexpressão do gene codificante do peptídeo *AtPep1* pode estar implicado na resistência de plantas de *A. thaliana* a *P. deliense*. Segundo o modelo, proposto por Huffaker & Ryan (2007) (Figura 1), o peptídeo *AtPep1*, amplifica a via de sinalização de respostas de defesa através das PAMPs em plantas *A. thaliana* ativando a expressão de genes de defesa como PDF1.2. Estes resultados aliados aos resultados da expressão gênica de *PROPEP1* e PDF1.2, obtidos nos itens 4.4 e 4.5 confirmam que a superexpressão de *PROPEP1* e conseqüente aumento da expressão de *AtPep1* e da defensina PDF1.2 proporcionou um aumento na resistência a *P. deliense*.

TABELA 3. Percentual de sobrevivência da progênie T2 de plantas pEGAD e pEGAD-AtPep, referentes a Figura 12.

EVENTOS	TRATAMENTOS											
	Controle			Isolado 12			Isolado 17			Isolado 123		
PEGAD-02	70	a	A	55	ab	A	20	b	B	80	a	A
PEGAD-05	65	a	AB	50	a	A	0	b	C	40	a	AB
ATPEP-03	85	a	A	10	c	B	60	b	A	25	c	B
ATPEP-04	35	a	B	25	a	AB	55	a	A	20	a	B

^aValores seguidos da mesma letra minúscula (linha) ou maiúscula (coluna) não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

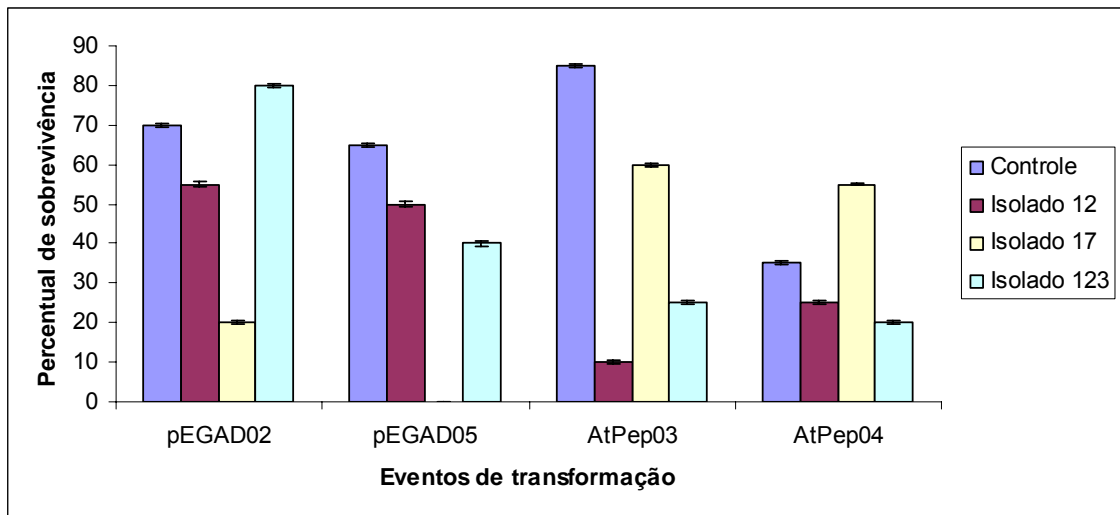


FIGURA 12. Percentual de sobrevivência da progênie T2 de plantas pEGAD e pEGAD-AtPep. Eventos de plantas transformadas pEGAD: pEGAD-02 e pEGAD-05. Eventos de plantas transformadas pEGAD-AtPep: AtPep-03 e AtPep-04. Tratamentos: Controle (sem inoculação); inoculado com os isolados de *P. graminicola* (isolado 12), *P. deliense* (isolado 17) e *P. dissotocum* (isolado 123). Barras representam as médias de sobrevivência \pm desvio padrão de 2 experimentos independentes.

Por outro lado, quando foi avaliado o efeito da inoculação de *P. graminicola* (isolado 12) e *P. dissotocum* (isolado 123) nos diferentes eventos de transformação, foi verificada uma relação inversa àquela obtida com a inoculação de *P. deliense*. Neste caso, plantas pEGAD-AtPep inoculadas com *P. graminicola* (isolado 12) e *P. dissotocum* (isolado 123) tiveram um menor percentual de sobrevivência quando comparado com plantas pEGAD inoculadas com os mesmos isolados (Figura 12 e Tabela 3). Uma possível explicação desses resultados é de que as plantas poderiam não estar reconhecendo o patógeno e, desse modo, impedindo a ativação de genes de defesa e, portanto sendo suscetível à infecção pelo patógeno. Essa observação é reforçada pelo resultado do experimento com plantas de *A. thaliana* tipo selvagem onde foi verificado que *P. graminicola* foi pouco virulento, não sendo significativamente diferente das plantas não inoculadas (Figuras 10 e 11). Portanto, plantas de *A. thaliana* poderiam não reconhecer este isolado como patogênico. Nesse caso, seguindo a

interpretação do modelo proposto por Huffaker & Ryan (2007) (Figura 1), as PAMPs não seriam reconhecidas pelos seus receptores e não ativariam as vias de sinalização JA/Et e, conseqüentemente, não ativariam a expressão de genes de defesa. Neste caso, a superexpressão de *AtPep1* seria dispensável.

A fim de verificar o efeito da superexpressão de *PROPEP1* nas raízes, no presente estudo foi analisado o comprimento radicular das plantas adultas transformadas de *A. thaliana* nos diferentes eventos de transformação (pEGAD e pEGAD-*AtPep*) e inoculadas com os isolados de *P. graminicola* (isolado 12), *P. deliense* (isolado 17) e *P. dissotocum* (isolado 123). As plantas foram avaliadas quanto ao comprimento das raízes 15 dias após a inoculação. Cabe ressaltar que experimento similar foi conduzido por Huffaker *et al.* (2006) em plantas de *A. thaliana* superexpressando *PROPEP1* e inoculadas com *P. irregulare*.

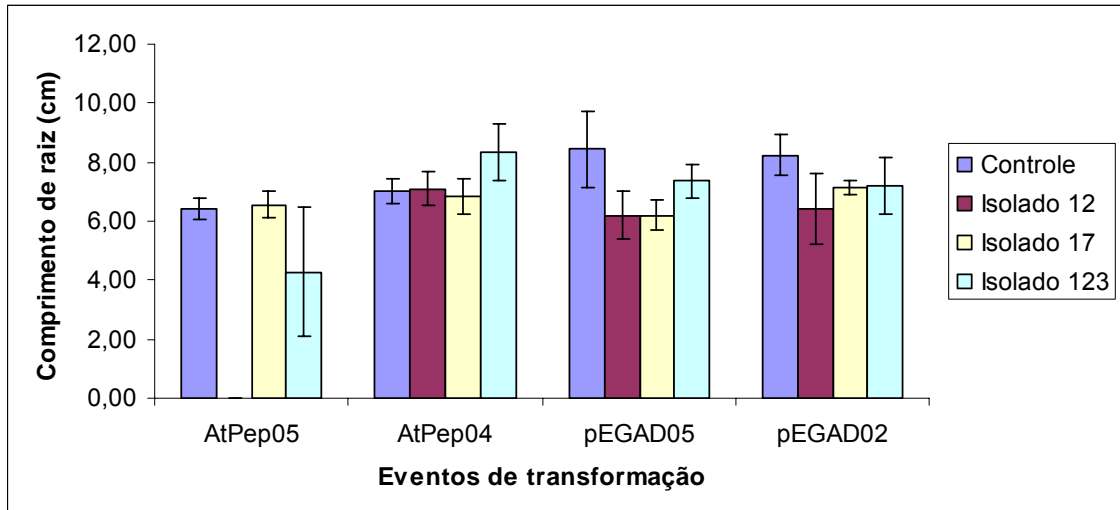


FIGURA13. Comprimento radicular da progênie T2 de plantas pEGAD e pEGAD-AtPep. Eventos de plantas transformadas pEGAD: pEGAD-02 e pEGAD-05. Eventos de plantas transformadas pEGAD-AtPep: AtPep-04, e AtPep-05. Tratamentos: Controle (sem inoculação); inoculado com *P. graminicola* (isolado12), *P. deliense* (isolado 17 e, *P. dissotocum* (isolado 123). Barras representam as médias de comprimento de raiz de 3 plantas de cada evento \pm desvio padrão.

Os dados obtidos apontam um menor do comprimento das raízes das plantas pEGAD de ambos os eventos (pEGAD-05 e pEGAD-02) inoculadas com todos os isolados, quando comparadas com os eventos não inoculados (controle), (Figura 13, Tabela 4). Porém quando foram comparadas plantas pEGAD-AtPep inoculadas com os mesmos isolados foi observado que essas apresentavam um crescimento radicular igual ou superior as plantas não inoculadas (controle) do mesmo evento de transformação, exceto nas plantas do evento AtPep05 inoculadas com *P. graminicola*, as quais morreram devido ao transplante (Figura 13, Tabela 4). Os resultados obtidos com este experimento confirmam os resultados de sobrevivência obtidos no experimento anterior. Sendo assim, os dois métodos apontam para uma possível resistência das plantas pEGAD-AtPep ao isolado *P. deliense*.

TABELA 4. Comprimento de raiz (cm) da progênie T2 de plantas pEGAD e pEGAD-AtPep, referentes a Figura 13.

EVENTOS	TRATAMENTOS											
	Controle			Isolado 12			Isolado 17			Isolado 123		
AtPep-05	6.44	a	B	0	c	B	6.56	a	A	4.26	b	B
AtPep-04	7.04	a	B	7.10	a	A	6.81	a	A	8.34	a	A
pEGAD-05	8.45	a	A	6.20	b	A	6.21	b	A	7.36	ab	A
pEGAD-02	8.24	a	A	6.42	b	A	7.14	ab	A	7.19	ab	AB

^a Valores seguidos da mesma letra minúscula (linha) ou maiúscula (coluna) não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Outro dado verificado é que as plantas pEGAD-AtPep controle apresentam um comprimento radicular significativamente inferior ao das plantas pEGAD, indicando que a superexpressão de *PROPEP1* nas plantas de *A. thaliana* afeta o crescimento radicular. Já nas plantas inoculadas com os isolados de *Pythium* não foram observadas diferenças no crescimento radicular entre os diferentes eventos de transformação (Figura 14). No entanto, Huffaker *et al.* (2006) verificaram que as plantas superexpressando *PROPEP1* não apresentavam diferença no crescimento radicular quando comparadas com plantas tipo selvagem, porém quando plantas superexpressando *PROPEP1* foram inoculadas com *P. irregulare* elas apresentavam um maior crescimento radicular às plantas não transformadas inoculadas com o mesmo patógeno. Estes resultados diferem dos resultados encontrados no presente estudo, possivelmente devido ao grande acúmulo de *PROPEP1* obtido nas plantas transformadas pEGAD-AtPep no presente estudo, no entanto não existem evidências da toxicidade de *PROPEP1* no crescimento radicular, para tanto mais estudos devem ser realizados.

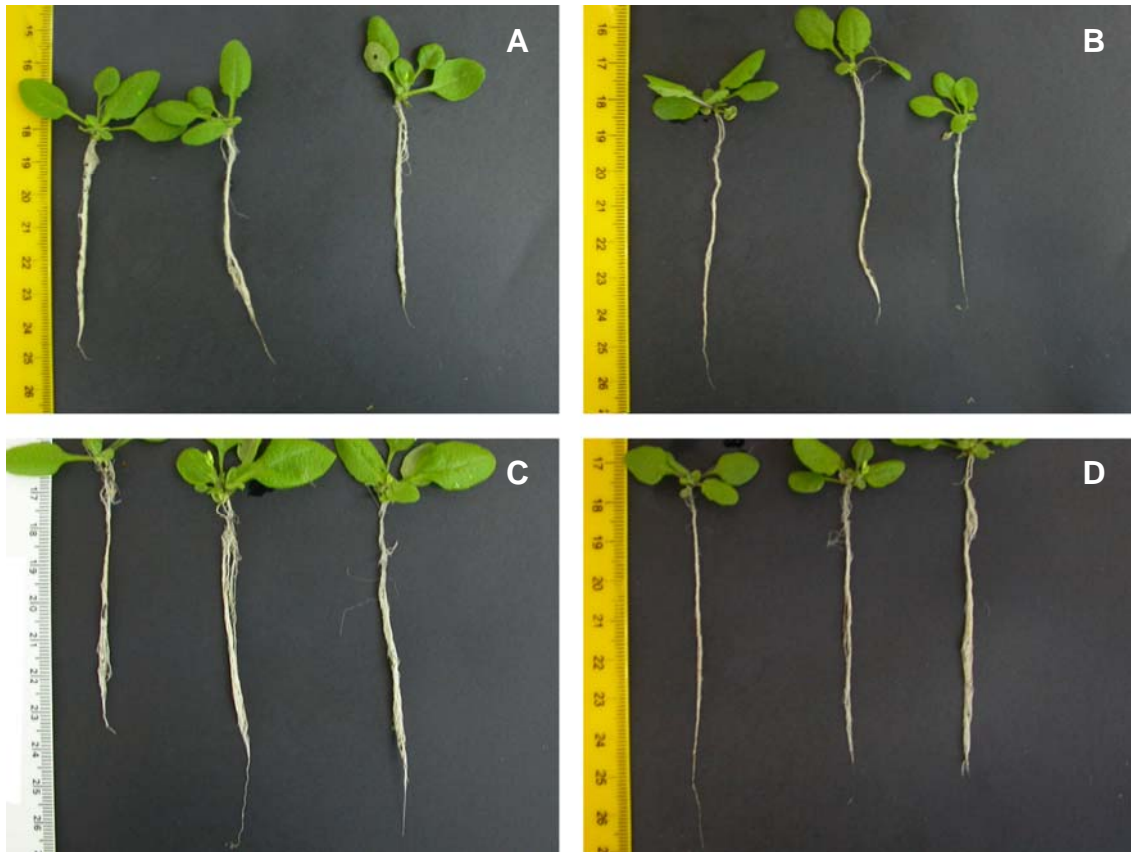


FIGURA 14. Comprimento radicular (cm) da progênie T2 de plantas pEGAD e pEGAD-AtPep. A) Raízes de plantas transformadas pEGAD 02 não inoculadas, B) raízes de plantas transformadas pEGAD-AtPep 03 não inoculadas, C) raízes de plantas pEGAD 02 inoculadas com *P. deliense*, D) raízes de plantas transformadas pEGAD-AtPep 03 inoculadas com.

4.9 Patogenicidade de diferentes isolados de *Pythium* spp. em *A. thaliana* transformadas com os vetores pGSA e pGSA-AtPep

A progênie T2 de plantas de *A. thaliana* de 1 evento de transformação com o vetor pGSA1427 (pGSA-17) e 2 eventos de transformação com o vetor pGSA-AtPep (pGSAAtPep-01 e pGSAAtPep-02), foram avaliadas 7 dias após a inoculação, quanto a resistência aos isolados de *P. graminicola* (isolado 12) e *P. deliense* (isolado 17). Este experimento teve como objetivo verificar se os resultados obtidos com pEGAD-AtPep, que produzem uma proteína de fusão GFP::PROPEP1, poderiam alterar a funcionalidade da propteína PROPEP1 e de seu peptídeo AtPep1.

Os dados obtidos revelaram que existe diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre o percentual de plantas T2 sobreviventes do evento pGSA-17 (Figura 15, Tabela 5) e o percentual de plantas T2 resistentes dos eventos de transformação pGSA-AtPep (pGSAtPep-01 e pGSAtPep-02 Figura 15). O evento de transformação pGSA-AtPep apresentou maior percentual de sobrevivência das plantas inoculadas com o *P. graminicola* e *P. deliense*, diferindo significativamente, quando comparados com os eventos de transformação pGSA-17 inoculados com os mesmos isolados. De um modo geral estes resultados confirmam a importância do peptídeo AtPep1 em induzir respostas de defesa contra *P. deliense* obtidos através da transformação das plantas pEGAD-AtPep. Além disso, estes resultados comprovam que não houve alteração da funcionalidade da proteína PROPEP1 e do seu peptídeo AtPep1 devido à fusão com a proteína GFP.

TABELA 5. Percentual de sobrevivência da progênie T2 de plantas pGSA e pGSA-AtPep, referentes a figura 15.

EVENTOS	TRATAMENTOS							
	Controle		Isolado 12			Isolado 17		
pGSA-17	33	a B	0	b B	42	a B		
pGSAtPep-01	58	b A	53	b A	81	a A		
pGSAtPep-02	61	ab A	31	b A	69	a AB		

^aValores seguidos da mesma letra minúscula (linha) ou maiúscula (coluna) não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

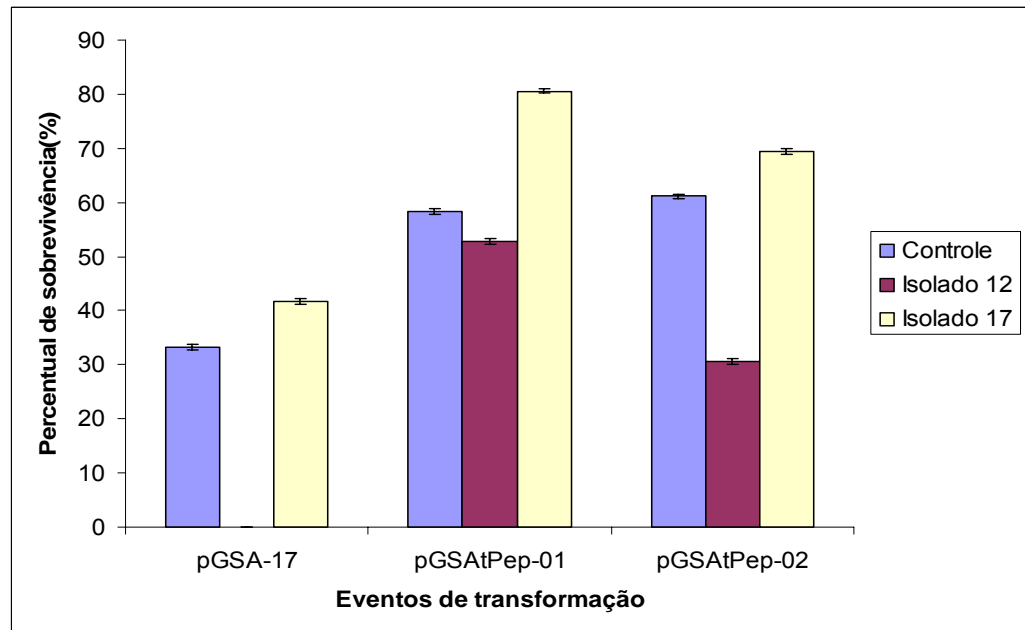


FIGURA 15. Percentual de sobrevivência da progênie T2 de plantas pGSA (evento pGSA-17) e pGSA-AtPep (eventos pGSAtPep-01 e pGSAtPep-02). Tratamentos: Controle (sem inoculação); inoculado com *P. graminicola* (isolado 12) e inoculado com *P. deliense* (isolado 17). Barras representam as médias de sobrevivência \pm desvio padrão de 2 experimentos independentes.

5 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que:

1. As espécies de *P. graminicola*, *P. deliense*, *P. inflatum*, *P. ultimum* e *P. dissotocum* são patogênicas a *A. thaliana*;
2. As espécies *P. ultimum* e *P. deliense* diferiram das espécies *P. graminicola* e *P. inflatum* quanto ao grau de virulência durante a infecção de *A. thaliana*
3. Plantas pEGAD-AtPep acumulam altos níveis de mRNA do gene codificante do peptídeo AtPep1 e a proteína de GFP::*PROPEP1* se expressa.
4. A superexpressão de *PROPEP1* em plantas de *A. thaliana* aumenta os níveis de mRNA de PDF1.2 nas plantas infectadas com *P. deliense*.
5. A superexpressão de *PROPEP1* e conseqüentemente do seu peptídeo AtPep1 em plantas de *A. thaliana* aumenta a resistência das plantas infectadas com *P. deliense*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. Plant disease epidemiology. In: AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5 ed. San Diego: Academic Press, 2004. p.269-271.

ARAGÃO, F.J.L. *et al.* Metodologias para transformação genética em plantas Modelo. **Circular Técnica EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, v.1, n.15, p.1-5, 2002.

BATRA, S.; KUMAR, S. *Agrobacterium*-mediated transient *GUS* gene expression in buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.). **Journal of Applied Genetics**, Poznań, v.44, n.4, p. 449-458. 2003.

BECHTOLD, N. *et al.* In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v.316, 1194-1199, 1993.

BENARD D.; PUNJA Z. K. Role of *Pythium* species in cavity spot development on carrots in British Columbia. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v.17, p.31–45, 1995.

BENT, A.F. *Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. **Plant Physiology**, Washington, v.124, p.1540-1547, 2000.

BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA, A.; SOLANO, R. Constitutive expression of ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. **The Plant Journal**, Oxford, v.29, p.23-32, 2002.

BERRY, L.A.; JONES, E.E.; DEACON, J.W. Interaction of the mycoparasite *Pythium oligandrum* with other *Pythium* species. **Biocontrol Science and Technology**, London, v.3, p.247-260. 1993.

BOLLER, T. Chemoperception of microbial signals in plant cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.46, p.189–214, 1995

BRASILEIRO, A.C.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-Cenargen, 1998.

- CAO, H. *et al.* Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v.6, p.1583-1592, 1994.
- CHANG, S.S. *et al.* Stable genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium* inoculation *in planta*. **Plant Journal**, Oxford, v.5, p.551–558, 1994.
- CHUNG, M-H.; CHEN, M-K.; PAN S-M. Floral spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis* transgenic plants. **Transgenic Research**, London, v.9, p.471–476, 2000.
- CLOUGH, S.J.; BENT, A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, Oxford, v.16, p.735-743, 1998.
- COEGO, A. *et al.* An *Arabidopsis* homeodomain transcription factor, overexpressor of cationic peroxidase 3 mediates resistance to infection by necrotrophic pathogens. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p.2123-2137, 2005.
- CUTLER, S.R. *et al.* Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at high frequency. **The Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.97, p.3718-3723, 2000.
- DANGL, J.L.; JONES, J.D.G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, London, v.411, p.826-833, 2001.
- DE VOS, M. *et al.* Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. **Mol Plant–Microbe Interactions**, Sain Paul, v.18, p.923–937, 2005.
- DELANEY, T.P. *et al.* A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. **Science**, London, v.266, p.1247–1250, 1994.
- DELANEY, T.P.; FRIEDRICH, L.; RYALS, J.A. *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. **The Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, Washington v.92, p.6602–6606, 1995.
- DESFEUX, C. *et al.* Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. **Plant Physiology**, Washington, v.123, p.895-904, 2000.
- DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto, v.42, p.185–209, 2004.
- EHRET, D.L. *et al.* Disinfestation of recirculating nutrient solutions in greenhouse horticulture. **Agronomie**, France, v.21, p.323–339, 2001.
- ESCOBAR, N.M. *et al.* High-throughput viral expression of cDNA-green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies

- unique proteins that interact with plasmodesmata. **The Plant cell**, Rockville, v.15, p.1507-1523, 2003.
- FOLMAN, L.B.; POSTMA, J.; VAN VEEN, J.A. Characterisation of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber. **Microbiological Research**, Jena, v.158, p.107-115, 2003.
- GAFFNEY, T. *et al.* Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance. **Science**, London v.261, p.754–756, 1993.
- GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p.205-227, 2005.
- GLAZEBROOK, J.; ROGERS, E.E.; AUSUBEL, F.M. Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. **Genetics**, Austin, v.143, p.973–982, 1996.
- GOLD, S.E.; STANGHELLINI, M.E. Effects of temperature on *Pythium* root rot of spinach grown under hydroponic conditions. **Phytopathology**, Berlin, v.75, n.3, p.333-337, 1985.
- GÓMEZ-GÓMEZ, L.; FELIX, G.; BOLLER, T. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, Oxford, v.18, p. 277 - 284, 1999
- GOTESSON, A. *et al.* Characterization and evolutionary analysis of a large polygalacturonase gene family in the oomycete plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, Saint Paul, v.15, p.907–21, 2002.
- GRAVEL, V. *et al.* Antagonist microorganisms with the ability to control *Pythium* damping-off of tomato seeds in rockwool. **Biocontrol**, Dordrecht, v.50, p.771-786, 2005.
- GUDMESTAD, N.C.; TAYLOR, R.J.; PASCHE, J.S. Management of soilborne diseases of potato. **Australasian Plant Pathology**, Australia, v.36, n.2, 109–115, 2007.
- HAHLBROCK, K. *et al.* Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. **The Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, Washington v.92, p.4150–4157, 1995.
- HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology, Plant Molecular and Biology**. Palo Alto, v.48, p.575–607, 1997.
- HAMMOND-KOSACK, K.E.; PARKER, J.E. Deciphering plant–pathogen communication: fresh perspectives for molecular plant breeding. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.14, p.177–193, 2003

- HENDRIX, F. F. e CAMPBELL, W. A. *Pythium* as a plant pathogen. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.11, p.77-98, 1973.
- HERRERA-ESTRELLA, L. *et al.* Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. **Nature**, London, v. 303, p.209-213, 1983.
- HERRERO, M.L.; HERMANSEN, A.; ELEN, O.N. Occurrence of *Pythium* spp. and *Phytophthora* spp. in Norwegian Greenhouses and their Pathogenicity on Cucumber Seedlings. **Journal Phytopathology**, Berlin, v.151, p.36–41,2003.
- HIETER, P.; BOGUSKI, M. Functional genomics: it's all how you read it. **Science**, London, v.278, p.601-602, 1997.
- HIGGINBOTHAM, R.W. *et al.* Evaluation of adapted wheat cultivars for tolerance to *Pythium* root rot. **Plant Disease**, Saint Paul, v.88, p.1027-1032, 2004.
- HUFFAKER, A.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. **The Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.103, p.10098-10103, 2006.
- HUFFAKER, A.; RYAN, C. A. Endogenous peptide defense signals in *Arabidopsis* differentially amplify signaling for the innate immune response. **The Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 104, n. 25, p.10732–10736, 2007.
- INGRAM, D.M.; COOK, R.J. Pathogenicity of four *Pythium* species to wheat, barley, peas and lentils. **Plant Pathology**., Oxford, v.39, p.110-117. 1990.
- JONES, J.J. *et al.* Potential of real-time measurement of GFP-fusion proteins. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.109, p.201-211, 2004.
- KAMOUN S. Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.4, p.295–300, 2001.
- KAMOUN, S.; HUITEMA, E.; VLEESHOUWERS, V.G.A.A. Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? **Trends in Plant Science**, Oxford, v.4, p.196-200, 1999.
- KATAVIC, V. *et al.* *In planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.245, p.363–370,1994.
- KLEIN, T.M. *et al.* Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. **The Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, Washington,v.85, n.12, p.4305–4309, 1988.
- KOHLER, R.H. GFP for in vivo imaging of subcellular structures in plant cells, **Trends Plant Science**, Oxford, v.3, p.317-320, 1998.
- KONG, P. *et al.* Single-strand conformational polymorphism analysis of the ribosomal internal transcribed spacer 1 for rapid species identification within the

- genus *Pythium*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.240, p.229–236, 2004.
- KUCHAREK, T.; MITCHELL, D. **Diseases of agronomic and vegetable crops caused by *Pythium***. Plant Pathology Fact Sheet, University of Florida, p.14, 2000. Disponível em: <http://128.227.207.24/takextpub/FactSheets/pp53.pdf>. Acesso em: agosto/2006.
- KUMAR, C.; RZHETSKY, A. Evolutionary relationships of eukaryotic kingdoms. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.42, p.183–193, 1996.
- KUNKEL, B. N.; BROOKS, D. N. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.5, p.325–331, 2002.
- KUNZE, G. *et al.* The N terminus of bacterial elongationfactor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. **The Plant Cell**, Rockville, v.16, p.3496–3507, 2004.
- LABRA, M. *et al.* Genomic stability in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants obtained by floral dip. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.109, p.1512-1518, 2004.
- LATIJNHOUWERS, M.; DE WIT, P.J.G.M.; GOVERS, F. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. **TRENDS in Microbiology**, Cambridge, v.11, n.10, p. 462-469, 2003.
- LAWTON, K.A. *et al.* Signal transduction in systemic acquired resistance. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, Sain Paul, v.8, p.863–870, 1995.
- LEMAGA, B. *et al.* The effect of crop rotation on bacterial wilt incidence and potato tuber yield. **African Crop Science Journal**, Kampala, v.9, p.257–266, 2001.
- LENHARDT, A. **Controle Biológico de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma sp.* em fumo cultivado no sistema float**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2000.
- LÉVESQUE C.A; DE COCK A.W. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. **Mycological Research**, Cambridge, v.108, p.1363–1383, 2004.
- LIFSHITZ, R. *et al.* Biological control of seedling damping-off caused by *Pythium ultimum* by *Pseudomonas putida* GR 12-2 which also stimulates seedling emergence directly. **Phytopathology**, Saint Paul, v.78, p.1521-1522, 1988.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, New York, v. 25, p. 402–408, 2001.
- LOPES, A.C.; REIS, A.; MAKISHIMA, N. **Como prevenir o “tombamento” em mudas de hortaliças**. Comunicado técnico, Brasília, n. 28, 2005. Disponível em :

http://www.cnph.embrapa.br/paginas/publicacoes/publicacoes_2005/pdf_vfinal_2005. Acesso em: agosto 2006.

LORENZO, O. *et al.* ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **The Plant Cell**, Rockville, v.15, p.165–178, 2003.

LORENZO, O. *et al.* JASMONATE-INSENSITIVE1 Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between Different Jasmonate-Regulated Defense Responses in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v.16, p.1938–1950, 2004.

LORENZO, O.; SOLANO R. Molecular players regulating the jasmonate signalling network. **Current Opinion in Plant Biology**, London v.8, p. 532-540, 2005.

LU, Z. *et al.* In vivo study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, p.3073-3081, 2004.

MARTÍNEZ-TRUJILLO, M. *et al.* Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v.22, p.63-70, 2004.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A.JR. Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. **Science**, London, v. 296, n. 5566, p. 298 – 30012, 2002:

MEINKE, D.W. *et al.* *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis **Science**, London, v. 282, n. 5389, p. 662 – 682, 1998.

MESSIHA, N.A.S. *et al.* Biological Soil Disinfestation (BSD), a new control method for potato brown rot, caused by *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 117, p. 403–415, 2007.

MÉTRAUX, J.P. *et al.* Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. **Science**, London, v.250, n.4983, 1004-1006, 1990.

MIDDLETON, J.T. The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *Pythium*. **Memoirs of the Torrey Botanical Club**, New York, v.20, p.1-171, 1943.

MISAWA K. *et al.* A method to identify cDNAs based on localization of green fluorescent protein fusion products. **The Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 97, p. 3062–3066, 2000.

MLYNAROVA, L. *et al.* Approaching the lower limits of transgene variability. **The Plant Cell**, Rockville, v.8, p. 1589-1599, 1996.

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

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Res.** London, v.8, n.19, p.:4321-5, 1980.

NASEBY, D.C.; PASCUAL, J.A.; LYNCH, J.M. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.88, n.1, p.161-169, 2000.

NAVARRO, L. *et al.* The transcriptional innate immune response to flg22. interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. **Plant Physiology**, Washington, v.135, p. 1113–1128, 2004.

NAWRATH, C.; MÉTRAUX, J-P. Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. **The Plant Cell**, Rockville, v.11, p.1393–1404, 1999.

OARD, S.V.; ENRIGHT, F.M. Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.3, p.1-12, 2006.

OKUBARA, P.A.; PAULITZ, T.C. Root defense responses to fungal pathogens: A molecular perspective. **Plant and Soil**, The Hague, v. 274, p.215–226, 2005.

OPARKA, K.J.; BOEVINK, P.; SANTACRUZ, S. Studying the movement of plant viruses using green fluorescent protein. **Trends Plant Sci.** London, v.1, p.412-418, 1996.

OROZCO-CÁRDENAS, M.L.; RYAN, C.A. Polygalacturonase beta-subunit antisense gene expression in tomato plants leads to a progressive enhanced wound response and necrosis in leaves and abscission of developing flowers. **Plant Physiology**, Washington, v.133, p. 693–701, 2003.

OWEN-GOING, N.; SUTTON, J.C.; GRODZINSKI, B. Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. **Canadian journal of plant pathology-revue canadienne de phytopathologie**, Ontario, v. 25, p. 155-167, 2003.

PAQUIN, B. *et al.* The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. **Current Genetics**, New York, v.31, p.380–395, 1997.

PAULITZ, T. C. Biological control of root pathogens in soilless and hydroponic systems. **HortScience**, Alexandria, v.32, n.2, p.193-196. 1996.

PAULITZ, T.C. Population dynamics of biocontrol agents and pathogens in soils and rhizospheres. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.106, p.401–413, 2000.

PAULITZ, T.C.; BÉLANGER, R.R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.39, p.103-133, 2001.

PEARCE, G. *et al.* A polypeptide from tomato leaves activates the expression of proteinase inhibitor genes. **Science**, London, v.253, p.895–897, 1991.

PEARCE, G.; RYAN, C.A. Systemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. Isolation and characterization of three novel defense signaling glycopeptide hormones coded in a single precursor gene. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.278, p.30044–30050, 2003.

PEARCE, G.; NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J.; RYAN, C.A. Systemins. In *Handbook of Biologically Active Peptides*. Kastin, A.J. (ed.). Burlington: Academic Press, pp. 49–53, 2006.

PENNINCKX, I.A. *et al.* Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. **The Plant Cell**, Rockville, v.8, p.2309–2323, 1996.

PLAATS-NITERINK, J. VAN DER. Monograph of the genus *Pythium*. **Studies in Mycology**, v.21, 1981. Disponível em: http://www.cbs.knaw.nl/simonline/sim_021/sim21.htm. Acesso em: jun. 2006.

QIN, J. *et al.* Overexpression of *GbERF* confers alteration of ethylene-responsive gene expression and enhanced resistance to *Pseudomonas syringae* in transgenic tobacco. **Journal of biosciences**, Bangalore, v.31, n.2, p.255-263, 2006.

RAFTOYANNISA, Y.; DICKB, M.W. Zoospore encystment and pathogenicity of *Phytophthora* and *Pythium* species on plant roots. **Microbiological Research**, Jena, v. 161, p.1-8, 2006.

RANKIN, L.; PAULITZ, T.C. Evaluation of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium* root rot of greenhouse cucumbers in hydroponic culture. **Plant Disease**, Saint Paul, v.78, n.5, p.447- 451, 1994.

RENSINK, W.A.; BUELL, C.R. *Arabidopsis* to rice. Applying knowledge from a weed to enhance our understanding of a crop species. **Plant Physiology**, Washington, v.135, p.622-629, 2004.

ROSE, J.K. *et al.* Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: coevolution of a counterdefense mechanism by plant pathogens. **The Plant Cell**, Rockville, v.14, p. 1329-45, 2002.

SCHENK, P.M. *et al.* Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis.) **The Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.97, p.11655–11660, 2000.

SHIH, M-C; HEINRICH, P.; GOODMAN, H.M. Cloning and chromosomal mapping of nuclear genes encoding chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. **Gene**, v.104, p. 133-138, 1991.

SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F.H.; SAIGA, Y. Extraction, purification and properties of Aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, Philadelphia, v.59, p.223-229, 1962.

SOLANO, R. *et al.* Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE

- FACTOR1. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 12, n. 23, p. 3703-3714, 1998.
- STANGHELLINI, M.E. *et al.* Control of root rot of peppers caused by *Phytophthora capsici* with a nonionic surfactant. **Plant disease**, Saint Paul, v. 80, p. 1113-1116, 1996.
- STANGHELLINI, M.E.; RASMUSSEN, S.L. Hydroponics – A solution for zoosporic pathogens. **Plant Disease**, Saint Paul, v.78, p.1129-1138, 1994.
- STASWICK, P.E.; YUEN, G.Y.; LEHMAN C.C. Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. **The Plant Journal**, Oxford, v.15, p.747-754, 1998.
- STINTZI, A. *et al.* Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, Paris v.75, p.687–706, 1993.
- SUTTON, J.C. *et al.* Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.32, n.4, p.307-321, 2006.
- TANG, X. *et al.* Overexpression of *Pto* activates defense responses and confers broad resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v.11, p.15–29, 1999.
- TERMORSHUIZEN, A.J. *et al.* Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems: Variability in pathogen response. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v.38, p.2461–2477, 2006.
- THOMMA, B.P.H.J. *et al.* Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **The Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.95, p.15107–11, 1998.
- THOMMA, B.P.H.J. *et al.* The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. **Current Opinion in Immunology**, London, v.13, p.63–68, 2001.
- TYLER, B.M. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.40, p.137–167, 2002.
- UTKHEDE, R.S.; LEVESQUE, C.A.; DINH. D. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v.22, n.2, p.138-144, 2000.
- VALVEKENS, D.; MONTAGUE, M.V.; LIJSBETTENS, M.V. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. **The Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.85, p.5536–5540, 1988.
- VAN DE PEER, Y.; DE WACHTER, R. Evolutionary relationships among the eukaryotic crown taxa taking into account site-to-site rate variation in 18S rRNA. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 45, p. 619–630, 1997.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.55, p.85–97, 1999.

VAN WEST, P. *et al.* Oomycete plant pathogens use electric fields to target roots. **Molecular plant-microbe interactions**, Sain Paul, v.15, p.790-798, 2002.

VAN WEST, P.; APPIAH, A.A.; GOW, N.A.R. Advances in research on oomycete root pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 62, p.99-113, 2003.

VIJAYAN, P. *et al.* A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. **The Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.95, p.7209–7214, 1998.

WATERHOUSE, G. Key to *Pythium* Pringsheim. **Mycological Papers**, Great Britain, v.109, p.1-15, 1967.

WATERHOUSE, P.M.; HELLIWELL, C.A. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. **Nature Reviews Genetics**, London, v.4, p.29-38, 2003.

WATERHOUSE, P.M. Plant gene silencing applications. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v.5, p.1-3, 2002.

YAMAGUCHI, Y.; PEARCE G.; RYAN C.A. The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. **The Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 103, n. 26, p.10104–10109, 2006.

ZHANG, B.Q.; YANG, X.B. Pathogenicity of *Pythium* populations from corn soybean rotation fields. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, n.1, p.94-99, 2000.

ZHANG, X. *et al.* Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. **Nature Protocols**, London, v. 1, n.2, p.641 - 646, 2006.

ZIPFEL, C. *et al.* Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. **Nature**, London, v.428, p.764-767, 2004.

ZIMNOCH-GUZOWSKA, E.; LEBECKA, R.; FLIS, B. (2005). Breeding for resistance to bacterial disease in potato. In E. RITTER & A. CARRASCAL (EDS.), PROCEEDINGS TRIENNIAL CONFERENCE OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR POTATO RESEARCH, 16, 2005, Bilbao, Spain. **Annals...** Bilbao, 2005. p. 656–659.

APÊNDICE 1. Seqüência de nucleotídeos do vetor pGSA 1427. Em destaque, as seqüências referentes aos oligonucleotídeos iniciadores, CaMV9 e OCSI, utilizados nas reações de PCR e RT-PCR (rosa), aos sítios de corte das enzimas utilizadas na digestão dos vetores e do inserto (amarelo) e ao cDNA de *PROPEP1* (cinza).

TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAAATTGACGCTTAGACAACCTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTAATG
TACTGAATTAACGCCGAATTCAGATTTTTCAAATCAGTGCAGCAAGACGTGACGTAAGTATCCGAGTCAGTT
TTTTTTTTCTACTAATTTGGTCGTTTTATTCGGCGTGTAGGACATGGCAACCGGGCCTGAATTTGCGGGTA
TTCTGTTTCTATTCCAACTTTTCTTGATCCGCAGCCATTAACGACTTTTGAATAGATACGCTGACACGCCAA
GCCTCGCTAGTCAAAAGTGTACCAAACAACGCTTTACAGCAAGAACGGAATGCGCGTGCAGCTCGCGGTGACG
CCATTTGCGCTTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCTATTATATCTTCCCAAATTACCAATACATTAC
ACTAGCATCTGAATTTTATAACCAATCTCGATACACCAAATCGAATCGATGAGCCAGAACGACGCCCGCG
ACATCCGCGTGCACCGAGGCGGACATGCCGGCGGTCTGCACCATCGTCAACCACTACATCGAGACAAGCAC
GGTCAACTTCCGTACCGAGCCGAGGAACCGCAGGAGTGGACGGACGACCTCGTCCGTCTGCGGGAGCGCTAT
CCCTGGCTCGTCCGCGAGGTGGACGGCGAGGTGCGCGGCATCGCCTACGCGGGCCCTGGAAGGCACGCAACG
CCTACGACTGGACGGCCGAGTCGACCGTGTACGTCTCCCCCGCCACCAGCGGACGGGACTGGGCTCCACGCT
CTACACCCACCTGCTGAAGTCCCTGGAGGCACAGGGCTTCAAGAGCGTGGTTCGCTGTCATCGGGCTGCCAAC
GACCCGAGCGTGCATGCACGAGGCGCTCGGATATGCCCGCGGCATGCTGCGGGCGGCGGCTTCAAGC
ACGGAACTGGCATGACGTGGGTTTTCTGGCAGCTGGACTTCAGCCTGCCGGTACCGCCCCGTCCGGTCTGCC
CGTCACCGAGATTTGACTGCAGAATCTTGACTCCCATGTTGGCAAAGGCAACCAAACAATGAATGATC
CGCTCCTGCATATGGGGCGTTTTGAGTATTTCAACTGCCATTTGGGCTGAATTGAAGACATGCTCCTGTGAGA
AATCCGTGATCTTACTCAATATTCAGTAATCTCGGCAATATCTAAATGTGCGTGGCTTTATCTGTCTTTG
TATTGTTTCATCAATTCATGTAACGTTTGCTTTTCTTATGAATTTTCAAATAAATTATCAGATCTCTCTGCGG
ACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTC
AAAGCAAGTGGATTGATGTGACATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGAGGAT
CTCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAA
CCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGACATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCC
TTCGCAGGATCTCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAA
GACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGACATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAAT
CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTTCAATTTCAATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTAT
AAGAGCTCATTTTTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAACAACAATTACAATTACATTTACAATTACC
ATGGCGCGCATATGGAGAAATCAGATAGACGAAGCGAAGAAAGTCACTATGGATTCTCTTTCAGTGCCTCGAC
CAAACCTCAGAGCTATCTTGAATGCCTTGGTCTTTTTTTCATCAAGATTCTCCGACAACGTCTCTCCCGGAA
CTTCGAAACAGCCGAAGGAGGAAAAAGAAGACGTTACCATGGAAAAGGAGGAGGTGCTTGTGACGAGTAGAGC
CACAAAGGTCAAGGCAAAGCAAAGGGGGAAGGAGAAAGTTAGCTCAGGCCGTCTGGCCAACATAATTAGACT
AGTCCCTAGAGTCTGCTTTAATGAGATATGCGAGACGCCTATGATCGCATGATATTTGCTTTCAATTCTGTT
GTGCACGTTGTAATAAACCTGAGCATGTGTAGCTCAGATCCTTACCGCGGTTTCGGTTCATTCTAATGAATA
TATCACCCGTTACTATCGTATTTTTATGAATAATATTCTCCGTTCAATTTACTGATTGTACCCTACTACTTAT
ATGTACAATATTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
AATAACAACAATAAATGCGTTTTATTATTACAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
GACTGATTACATAAATCTTATTCAAATTTCAAAGTGCCTGAGGCTAGTATCTACGACACACCGAGCGCGC
AACTAATAACGCTCACTGAAGGAACTCCGGTTCCCGCGCGCATGGGTGAGATTCTTGAAGTTGAGT
ATTGGCCGTCCGCTCTACCGAAAGTTACGGGCACCATTCAACCCGGTCCAGCACGGCGGCGGGTAACCGACT
TGCTGCCCGGAGAATTATGCAGCATTTTTTTTGGTGTATGTGGGCCCAAATGAAGTGCAGGTCAAACCTTGAC
AGTGACGACAAATCGTTGGGCGGTCAGGGCGAATTTTGCACAACATGTCGAGGCTCAGCAGGACCTGCAG
GCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAATTAAT
CGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAAC
AGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGATCAGATTGTCGTTTTCCCGCCTTCAGTT
TAACTATCAGTGTGTTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTTATTAGAATAACGGA
TATTTAAAAGGGCGTGAAGGTTTTATCCGTTTCGTCATTTGTATGTGCATGCCAACCACAGGGTTCCCCTCG
GGATCAAAGTACTTTGATCCAACCCCTCCGCTGCTATAGTGCAGTCGGCTTCTGACGTTTCAGTGCAGCCGTCT
TCTGAAAACGACATGTGCGACAAGTCTAAGTTACGCGACAGGCTGCCGCCCTGCCCTTTTTCTGGCGTTTTTC
TTGTGCGGTGTTTTAGTCGCATAAAGTAGAATACTTGGGACTAGAACCAGGACATTACGCCATGAACAAGAG
CGCCGCGCTGGCTGCTGGGCTATGCCCGCGTCAGCACCGACGACCAGGACTTGACCAACCAACGGGCCGAA
CTGCACGCGCGCGGCTGCACCAAGCTGTTTTCCGAGAAGATCACCGGCACCAGGCGGACCGCCCGGAGCTGG
CCAGATGCTTACCACCTACGCCCTGGCGACGTTGTGACAGTACCAGGCTAGACCGCTGGCCCTGGCCGACGAC
CCCGGACTTACTGGACATTGCCGAGCGCATCCAGGAGCCGGCGCGGCTGCGTAGCCTGGCAGAGCGGTGG
GCCGACACCACCGCCGGCCGGCCGATGGTGTGACCGTGTTCGCCGGCATTTGCCGAGTTTCGAGCTTCCC
TAATCATCGACCGCACCCGAGCGGGCGGAGGCCGCAAGGCCGAGGCGTGAAGTTTGGCCCCGCCCTAC
CCTCACCCCGGCACAGATCGCGCACGCCCGGAGCTGATCGACCAGGAAGGCCGACCGTGAAGAGGGCGGCT
GCATGCTTGGCGTGCATCGCTCGACCCGTGACCGCGACTTGGAGCGCAGCGAGGAAGTGCAGCCACCGAGG

Continuação APÊNDICE 1. Sequência de nucleotídeos do vetor pGSA. Em destaque, as seqüências referentes aos oligonucleotídeos iniciadores, CaMV9 e OCSI, utilizados nas reações de PCR e RT-PCR (rosa), aos sítios de corte das enzimas utilizadas na digestão dos vetores e do inserto (amarelo) e ao cDNA de PROPEP1 (cinza).

CCAGGCGGGCGGGTGCCTTCCGTGAGGACGCATTGACCGAGGCCGACGCCCTGGCGGCCGCGAGAATGAACG
 CCAAGAGGAACAAGCATGAAACCCGACCAGGACGGCCAGGACGAACCGTTTTTCATTACCGAAGAGATCGAGG
 CGGAGATGATCGCGGCCGGGTACGTGTTTCGAGCCGCCCGCGCACGTCTCAACCGTGCGGCTGCATGAAATCCT
 GGCCGGTTTTGTCTGATGCCAAGCTGGCGGCCCTGGCCGGCCAGCTTGGCCGCTGAAGAAACCGAGCGCCGCCGT
 CTAAAAAGGTGATGTGTATTTGAGTAAAACAGCTTGCCTCATGCGGTGCTGCGTATATGATGCGATGAGTAA
 AATAACAAATACGCAAGGGGAACGCATGAAGTTATCGCTGTACTTAACCAGAAAGGCGGGTCAGGCAAGACG
 ACCATCGCAACCCATCTAGCCCGCGCCCTGCAACTCGCCGGGGCCGATGTTCTGTTAGTCGATTCCGATCCCC
 AGGGCAGTGCCCGGATTGGGCGGCCGTGCGGGAAGATCAACCGCTAACCGTTGTGCGCATCGACCGCCCGAC
 GATTGACCGCGACGTGAAGGCCATCGGCCGGCGCGACTTCGTAGTGATCGACGGAGCGCCCCAGGCGGGCGGAC
 TTGGCTGTGTCCGCGATCAAGGCAGCCGACTTCGTGCTGATTCCGGTGCAGCCAAGCCCTTACGACATATGGG
 CCACCGCCGACCTGGTGGAGCTGGTTAAGCAGCGCATTGAGGTCACGGATGGAAGGCTACAAGCGGCCTTTGT
 CGTGTGCGGGCGATCAAAGGCACGCGCATCGGCGGTGAGGTTGCCGAGGCGCTGGCCGGGTACGAGCTGCC
 ATCTTTGAGTCCCCTATCACGCAGCGCGTGAGCTACCCAGGCACTGCCGCCGCCGGCACAACCGTTCTTGAAT
 CAGAACCCGAGGGCGACGCTGCCCGGAGGTCCAGGCGCTGGCCGCTGAAATTAATCAAACTCATTGTGAGT
 TAATGAGGTAAGAGAAAATGAGCAAAAGCACAAACACGCTAAGTGCCGGCCGTCCGAGCGCACGCAGCAGCA
 AGGCTGCAACGTTGGCCAGCCTGGCAGACACGCCAGCCATGAAGCGGGTCAACTTTCAGTTGCCGGCGGAGGA
 TCACACCAAGCTGAAGATGTACGCGGTACGCCAAGGCAAGACCATTACCGAGCTGCTATCTGAATACATCGCG
 CAGCTACCAGAGTAAATGAGCAAATGAATAAATGAGTAGATGAATTTTAGCGGCTAAAGGAGGCGGCATGGAA
 AATCAAGAACAACCAGGCACCGACGCCGTGGAATGCCCATGTGTGGAGGAACGGGCGGTTGGCCAGGCGTAA
 GCGGCTGGGTTGTCTGCCGGCCCTGCAATGGCACTGGAACCCCCAAGCCCGAGGAATCGGCGTGACGGTTCGCA
 AACCATCCGGCCCGGTACAAATCGGCGCGGCGCTGGGTGATGACCTGGTGGAGAAGTTGAAGGCCCGCGCAGGC
 CGCCACGCGCAACGCATCGAGGCAGAAGCAGCCCGGTGAATCGTGGCAAGCGCCGCTGATCGAATCCGC
 AAAGAATCCCGGCAACCGCCGGCAGCCGGTGCGCCCTGATTAGGAAGCCGCCAAGGCCGACGAGCAACCCAG
 ATTTTTTCGTTCCGATGCTCTATGACGTGGGCACCCGCGATAGTCGCAGCATCATGGACGTGGCGTTTTCCG
 TCTGTGCAAGCGTGACCGACGAGCTGGCGAGGTGATCCGCTACGAGCTTCCAGACGGGCACGTAGAGGTTTCC
 GCAGGGCCCGCCGGCATGGCCAGTGTGTGGGATTACGACCTGGTACTGATGGCGGTTTTCCCATCTAACCGAAT
 CCATGAACCGATACCGGGAAGGGAAGGGAGACAAGCCCGCCGCGTGTTCGCTCCACACGTTGCGGACGTA
 CAAGTTCTGCCGGCGAGCCGATGGCGGAAAGCAGAAAGACGACCTGGTAGAAACCTGCATTCCGGTTAAACACC
 ACGCACGTTGCCATGCAGCGTACGAAGAAGGCCAAGAACGGCCGCTGGTGACGGTATCCGAGGGTGAAGCCT
 TGATTAGCCGCTACAAGATCGTAAAGAGCGAAACCGGGCGGCCGGAGTACATCGAGATCGAGCTAGCTGATTG
 GATGTACCGGAGATCACAGAAGGCAAGAACCCGGACGTGCTGACGGTTCACCCCGATTACTTTTTGATCGAT
 CCCGGCATCGGCCGTTTTCTCTACCGCCTGGCACGCCGCGCCGAGGCAAGGCAGAAGCCAGATGGTTGTTCA
 AGACGATCTACGAACGCAGTGGCAGCGCCGGAGAGTTCAAGAAGTTCTGTTTACCGTGCGCAAGCTGATCGG
 GTCAAATGACCTGCCGGAGTACGATTTGAAGGAGGAGGCGGGGCGAGGCTGGCCCGATCCTAGTCATGCGCTAC
 CGCAACCTGATCGAGGGCGAAGCATCCGCCGGTTCTTAATGTACGGAGCAGATGCTAGGGCAAATTGCCCTAG
 CAGGGGAAAAAGGTCGAAAAGGTCTCTTTCTGTGGATAGCACGTACATTGGGAACCCAAAGCCGTACATTGG
 GAACCGGAACCCGTACATTGGGAACCCAAAGCCGTACATTGGGAACCGGTACACATGTAAGTGACTGATATA
 AAAGAGAAAAAAGGCGATTTTTCCGCCATAAACTCTTTAAAACTTATTAATACTCTTAAACCCCGCTGGCCT
 GTGCATAACTGTCTGGCCAGCGCACAGCCGAAGAGCTGCAAAAAGCGCCTACCCCTCGGTGCTGCGCTCCCT
 ACGCCCGCCGCTTCGCGTGGCCCTATCGCGGCCGCTGGCCGCTCAAAAATGGCTGGCCTACGCCAGGCAAT
 CTACCAGGGCGCGGACAAGCCGCGCCGCTGCCACTCGACCGCCGGCCACATCAAGGCACCCCTGCCTCGCG
 CGTTTTCGGTGATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGG
 ATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAAGGCGCGTCAAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCGCAGCCATGACCCA
 GTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTACTGAGAGTGCACC
 ATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCT
 CACTGACTCGCTGCGCTCGGTGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTA
 TCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAA
 AGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCA
 GAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCT
 GTTCCGACCCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCT
 CACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCA
 GCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGTAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTG
 GCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGC
 CTAATACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAG

Continuação APÊNDICE 1. Seqüência de nucleotídeos do vetor pGSA. Em destaque, as seqüências referentes aos oligonucleotídeos iniciadores, CaMV9 e OCSI, utilizados nas reações de PCR e RT-PCR (rosa), aos sítios de corte das enzimas utilizadas na digestão dos vetores e do inserto (amarelo) e ao cDNA de *PROPEP1* (cinza).

AGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTTGCAAGCAGCAGATT
 ACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAA
 ACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATCATGATATATCTCCCAATTTGTGTAGGGCTTATTATGCACGCTTAAAA
 ATAATAAAAGCAGACTTGACCTGATAGTTTGGCTGTGAGCAATTATGTGCTTAGTGCATCTAATCGCTTGAGT
 TnACGCCGGCGAAGCGGCGTCCGCTTGAACGAATTTCTAGCTAGAGGATCGCACCAATAACTGCCTTAAAAAA
 ATTACGCCCCGCTTGCACCTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATC
 ACAAACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTGCGCTTGCGTATAATATTTGCCATT
 GTGAAAACGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAACCTGGTGAAACTCACCCAGGGAT
 TGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTTACCCTAACACGCCAC
 ATCTTGCGAATATATGTGTAGAAACTGCCGAAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCA
 GTTTGCTCATGGAAAACGGTGTAAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTCATTGCCA
 TACGGAACCTCCGGATGAGCATTTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAACTTGTGCTTATT
 TTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGAC
 TGAAATGCCTCAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCT
 CCATGATGTTTAACTTTGTTTTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCCATAACATCAAACA
 TCGACCCACGGCGTAACGCGCTTGCTGCTTGATGCCCGAGGCATAGACTGTACCCCAAAAAAACATGTCATA
 ACAAGAAGCCATGAAAACCGCCACTGCGCCGTTACCACCGCTGCGTTCGGTCAAGGTTCTGGACCAGTTGCGT
 GACGGCAGTTACGCTACTTGCAATTACAGCTTACGAACCGAACGAGGCTTATGTCCACTGGGTTTCGTGCCCGAA
 TTGATCACAGGCAGCAACGCTCTGTTCATCGTTACAATCAACATGCTACCCCTCCGCGAGATCATCCGTGTTTCA
 AACCCGGCAGCTTAGTTGCCGTTCTTCCGAATAGCATCGGTAACATGAGCAAAGTCTGCCGCTTACAACGGC
 TCTCCCGCTGACGCCGTCGCCGACTGATGGGCTGCCTGTATCGAGTGGTGATTTTGTGCCGAGCTGCCGGTCCG
 GGGAGCTGTTGGCTGGCTGG

APÊNDICE 2. Sequência de nucleotídeos do vetor pEGAD. Em destaque, as sequências referentes à EGFP (verde), aos oligonucleotídeos iniciadores, 5A e EGAD, utilizados nas reações de PCR e RT-PCR (rosa), aos sítios de corte das enzimas utilizadas na digestão dos vetores e do inserto (amarelo) e ao cDNA de *PROPEP1* (cinza).

GGTTTACCCGCCAATATATCCTGTCAAACACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAATCTGATCATG
 AGCGGAGAATTAAGGGAGTCAGGCCTTAATTAAGAGCTCGCATGCCCTTTCAGAAAGAATGCTAACCCACAGA
 TGGTTAGAGAGGCTTACGCAGCAGGTCTCATCAAGACGATCTACCCGAGCAATAATCTCCAGGAAATCAAATA
 CCTTCCCAAGAAGGTTAAAGATGCAGTCAAAGATTTCAGGACTAACTGCATCAAGAACACAGAGAAAAGATATA
 TTTCTCAAGATCAGAAGTACTATTCCAGTATGGACGATTCAAGGCTTGCTTCAAAAACCAAGGCAAGTAATAG
 AGATTGGAGTCTCTAAAAAGGTAGTTCCCCTGAATCAAAGGCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCT
 AACAGAACTCCCCGTAAAGACTGGCGAACAGTTCATACAGAGTCTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATC
 TTCGTCAACATGGTGGAGCAGCAGACGCTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACAAA
 GGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCA
 CTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAAGGCCATC
 GTTGAAGATGCCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAG
 ACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATC
 CCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGAACACGGGGACTCTAG
 CGTACCGGTGCGCCACC**ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCTGGTTCGAGCT**
GGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTG
ACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACG
GCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGG
CTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAG
GGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGACA
AGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAA
CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCCATC
GGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACG
AGAAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTA
CAAGTCCGGAGCTGCGGCCGCTGCCGCTGCGGCAGCGGCC**GAATTC**ATGGAGAAATCAGATAGACGAAGCGAA
 GAAAGTCACCTATGGATTCCCTCTTCAAGTGCCTCGACCAAACCCTCAGAGCTATCTTGAATGCCTTGGTCTTT
 TTCATCAAGATTCTCCGACAACGTCTCTCCCGAACTTCGAAACAGCCGAAGGAGGAAAAAGAAGACGTTAC
 CATGAAAAAGGAGGAGGTGCTTGTGACGAGTAGACCCACAAGGTCAAGGCAAAGCAAAGGGGGAAAGGAGAAA
 GTTAGCTCAGGCCGTCTGGCCAACATAATTAG**AAGCTT**GGATCCACCGGAT**CTAGATAACTGATCTCGAGGA**
 GCTAGCTCGAATTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTC
 TTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTT
 ATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCAGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAG
 CGCGCAAACCTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCTATGTTACTAGATCGGGAATTAATTCGATAAGCTA
 GAGATCCGTCAACATGGTGGAGCAGCAGACGCTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGAC
 CAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCT
 GTCATTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAAGGC
 CATCGTTGAAGATGCCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGAAAAA
 GAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCAC
 AATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGACAGACCTGCA
 GGTCGATCCATGAGCCCAGAACGACGCCCGGCCGACATCCGCCGTGCCACCGAGGCGGACATGCCGGCGGTCT
 GCACCATCGTCAACCACTACATCGAGACAAGCAGGTCAACTTCCGTACCGAGCCGAGGAACCGCAGGAGTG
 GACGGACGACCTCGTCCGTCTGCGGGAGCGCTATCCCTGGCTCGTCCCGAGGTGGACGGCGAGGTGCGCCGGC
 ATCGCCTACGCGGGCCCCCTGGAAGGCACGCAACGCCTACGACTGGACGGCCGAGTCGACCGTGTACGTCTCCC
 CCCGCCACCAGCGGACGGGACTGGGCTCCACGCTCTACACCCACCTGCTGAAGTCCCTGGAGGCACAGGGCTT
 CAAGAGCGTGGTTCGTGTCTCGGGCTGCCAACGACCCGAGCGTGCATGCACGAGGCGCTCGGATATGCC
 CCCCGCGCATGCTGCGGGCGGCCGGCTTCAAGCACGGAACTGGCATGACGTGGGTTTTCTGGCAGCTGGACT
 TCAGCCTGCCGGTACCGCCCCGTCCGGTCTGCCCGTACCGAGATCTGATCTCACGCGTCTAGGATCGACCT
 GCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGGCATGATTATCA
 TCTAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGT

Continuação APÊNDICE 2. Seqüência de nucleotídeos do vetor pEGAD. Em destaque, as seqüências referentes à EGFP (verde), aos oligonucleotídeos iniciadores, 5A e EGAD, utilizados nas reações de PCR e RT-PCR (rosa), aos sítios de corte das enzimas utilizadas na digestão dos vetores e do inserto (amarelo) e ao cDNA de *PROPEP1* (cinza).

TTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACCTAGGAT
AAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCTCTAGCTTGATATCGAATTAATTCAGTGGCCGTCGT
TTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCC
AGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGCCCGCT
CCTTCGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCC
CTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAG
TGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTG
TTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCG
AACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGC
CAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCCAGTACATTA AAAAC
GTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTACACCACAATATATCCTGCCACCAGCCAGCC
AACAGCTCCCCGACCGGCAGCTCGGCACAAAATCACCCTCGATACAGGCAGCCCATCAGTCCGGGACGGCGT
CAGCGGGAGAGCCGTTGTAAGGCGGCAGACTTTGCTCATGTTACCGATGCTATTCCGGAAGAACGGCAACTAAG
CTGCCGGGTTTGAACACGGATGATCTCGCGGAGGGTAGCATGTTGATTGTAACGATGACAGAGCGTTGCTGC
CTGTGATCAAATATCATCTCCCTCGCAGAGATCCGAATTATCAGCCTTCTTATTCATTTCTCGCTTAACCGTG
ACAGGCTGTCGATCTTGAGAACTATGCCGACATAATAGGAAATCGCTGGATAAAGCCGCTGAGGAAGCTGAGT
GGCGCTATTTCTTTAGAAGTGAACGTTGACGATATCAACTCCCCTATCCATTGCTCACCGAATGGTACAGGTC
GGGGACCCGAAGTTCCGACTGTCGGCCTGATGCATCCCCGGCTGATCGACCCAGATCTGGGGCTGAGAAAGC
CCAGTAAGGAAACAAC'TGTAGGTTGAGTTCGCGAGATCCCCCGGAACCAAAGGAAGTAGGTTAAACCCGCTCC
GATCAGGCCGAGCCACGCCAGGCCGAGAACATTGGTTCTGTAGGCATCGGGATTGGCGGATCAAACACTAAA
GCTACTGGAACGAGCAGAAGTCTCCGGCCGCCAGTTGCCAGGCGGTAAAGGTGAGCAGAGGCACGGGAGGTT
GCCACTTGCGGGTTCAGCACGGTTCGGAACGCCATGGAACCGCCCCGCCAGGCCCGCTGCGACGCCGACAGG
ATCTAGCGCTGCGTTTGGTGTCAACACCAACAGCGCCACGCCCGCAGTTCCGCAAATAGCCCCAGGACCGCC
ATCAATCGTATCGGGCTACCTAGCAGAGCGGCAGAGATGAACACGACCATCAGCGGCTGCACAGCGCCTACCG
TCGCCGCGACCCCGCCCGGCAGGCCGTTAGCCGAAATAACAACAAGCTCCAGAATAGCGAAATATTAAGTGCG
CCGAGGATGAAGATGCGCATCCACCAGATTCCCCTTGGAAATCTGTTCGGACGATCATCACGAGCAATAAACCCG
CCGGCAACGCCCGCAGCAGCATAACGGCGACCCCTCGGCCTCGCTGTTTCGGGCTCCACGAAAACGCCGGACAG
ATGCGCCTTGTGAGCGTCTTGGGGCCGTCTCCTGTTTGAAGACCGACAGCCCAATGATCTCGCCGTCGATG
TAGGCGCCGAATGCCACGGCATCTCGCAACCGTTTCAGCGAACGCCTCCATGGGCTTTTTCTCCTCGTGTCTCGT
AAACGGACCCGAACATCTCTGGAGCTTTCTTCAGGGCCGACAATCGGATCTCGCGGAAATCCTGCACGTCCGC
CGCTCCAAGCCGTGCAATCTGAGCCTTAATCACAATTGTCAATTTAATCCTCTGTTTATCGGCAGTTTCGTAG
AGCGCGCCGTGCGTCCCAGCGATACTGAGCGAAGCAAGTGCCTGAGCAGTGCCCGCTTGTTCCTGAAATGC
CAGTAAAGCGCTGGCTGCTGAACCCCGCCGGAAGTACCCCAAGGCCCTAGCGTTTGCAATGCACCAGG
TCATCATTGACCCAGGCGTGTCCACCAGGCCGCTGCCTCGCAACTCTTCGAGGCTTCGCCGACCTGCTCGC
GCCACTTCTTACGCGGGTGGAAATCCGATCCGCACATGAGGCGGAAGGTTTCCAGCTTGAGCGGGTACGGCTC
CCGGTGCAGCTGAAATAGTGAACATCCGTCCGGCCGTCCGGCAGAGCTTGCGGTACTTCTCCCATATGAAT
TTCTGTAGTGGTTCGCCAGCAAACAGCACGACGATTTCTCTGTCGATCAGGACCTGGCAACGGGACGTTTCT
TGCCACGGTCCAGGACGCGGAAGCGGTGCAGCAGCGACACCGATTCCAGGTGCCCAACGCGGTTCGGACGTGAA
GCCCATCGCCGTCGCCTGTAGGCGCGACAGGCATTCTCGGCCTTCGTGTAATACCGGCCATTGATCGACCAG
CCCAGTCTTGCAAAGCTCGTAGAACGTGAAGGTGATCGGCTCGCCGATAGGGGTGCGCTTCGCGTACTCCA
ACACCTGCTGCCACACCAGTTCGTATCGTTCGGCCCGCAGCTCGACGCCGGTGTAGGTGATCTTACGTCTCTT
GTTGACGTGGAAAATGACCTTGTTTTGCAGCGCCTCGCGCGGGATTTTCTTGTGCGCGTGGTGAACAGGGCA
GAGCGGGCCGTGTCGTTTGGCATCGCTCGCATCGTGTCCGGCCACGGCGCAATATCGAACAAGGAAAGCTGCA
TTTCTTGTATCTGCTGCTTCTGTGTGTTTTCAGCAACGCGGCCTGCTTGGCCTCGCTGACCTGTTTTTGCAGGTC
CTCGCCGGCGGTTTTTTCGCTTCTTGGTTCGTATAGTTCTCTCGCTGTCGATGGTTCATCGACTTCGCCAAACCT
GCCGCTCTGTTTCGAGACGACGCGAACGCTCCACGGCGCCGATGGCGCGGGCAGGGCAGGGGGAGCCAGTT
GCACGCTGTCGCGCTCGATCTTGGCCGTAGCTTGTGGACCATCGAGCCGACGGACTGGAAGGTTTTCGCGGGG

Continuação APÊNDICE 2. Seqüência de nucleotídeos do vetor pEGAD. Em destaque, as seqüências referentes à EGFP (verde), aos oligonucleotídeos iniciadores, 5A e EGAD, utilizados nas reações de PCR e RT-PCR (rosa), aos sítios de corte das enzimas utilizadas na digestão dos vetores e do inserto (amarelo) e ao cDNA de *PROPEP1* (cinza).

CGCACGCATGACGGTGC GGCTT GCGATGGTTTTCGGCATCCTCGGCGGAAAACCCCGCGTCGATCAGTTCTTGC
 CTGTATGCCTTCCGGTCAAACGTCCGATTCATTACCCTCCTTGC GG GATTGCCCGACTCACGCCGGGGCAA
 TGTGCCCTTATTCCCTGATTTGACCCGCCTGGTGCCTTGGTGTCCAGATAATCCACCTTATCGGCAATGAAGTC
 GGTCCTCGTAGACCGTCTGGCCGTCTTCTCGTACTTGGTATTCCGAATCTTGGCCCTGCACGAATACCAGCGAC
 CCTTGGCCAAATACTTGGCGTGGGCCTCGGCCTGAGAGCCAAAACACTTGATGCGGAAGAAGTCGGTGC GCT
 CCTGCTTGTGCGCGGCATCGTTGCGCCACATCTAGGTACTAAAACAATTCATCCAGTAAAATATAATATTTTA
 TTTTCTCCCAATCAGGCTTGATCCCCAGTAAGTCAAAAAATAGCTCGACATACTGTTCTTCCCCGATATCCTC
 CCTGATCGACCCGACGCAGAAGGCAATGTCATACCCTTGTCCGCCCTGCCGCTTCTCCCAAGATCAATAAAG
 CCACTTACTTTGCCATCTTTCACAAAGATGTTGCTGTCTCCAGGTGCGCGTGGGAAAAGACAAGTTCCTCTT
 CGGGCTTTTCCGTCTTTAAAAAATCATAACAGCTCGCGCGGATCTTTAAATGGAGTGTCTTCTTCCAGTTTTT
 GCAATCCACATCGGCCAGATCGTTATTTCAGTAAGTAATCCAATTCGGCTAAGCGGCTGTCTAAGCTATTCGTA
 TAGGGACAATCCGATATGTCGATGGAGTGAAGAGCCCTGATGCACTCCGCATACAGCTCGATAATCTTTTCAG
 GGCTTTGTTTCATCTTCATACTCTTCCGAGCAAAGGACGCCATCGGCCTCACTCATGAGCAGATTGCTCCAGCC
 ATCATGCCGTTCAAAGTGCAGGACCTTTGGAACAGGCAGCTTTCTTCCAGCCATAGCATCATGTCTTTTCC
 CGTTCACATCATAGGTGGTCCCTTTTATACCGGCTGTCCGTCATTTTTAAATATAGGTTTTTCATTTTTCTCCCA
 CCAGCTTATATACCTTAGCAGGAGACATTCCTTCCGTATCTTTTACGCAGCGGTATTTTTTCGATCAGTTTTTT
 CAATCCGGTGATATCTCATTTTTAGCCATTTATTATTTCTTCTCTTTTCTACAGTATTTAAAGATACCCC
 AAGAAGCTAATTATAACAAGACGAACCTCAATTCAGTGTTCCTTGCAATCTAAAACCTTAAATACCAGAAAAC
 AGCTTTTTCAAAGTTGTTTTCAAAGTTGGCGTATAACATAGTATCGACGGAGCCGATTTTGAAACCACAATTA
 TGGGTGATGCTGCCAACTTACTGATTTAGTGTATGATGGTGTTTTTGAGGTGCTCCAGTGGCTTCTGTGTCTA
 TCAGCTGTCCCTCCTGTTTCAGCTACTGACGGGTGGTGCCTAACGGCAAAGCACCGCCGGACATCAGCGCTA
 TCTCTGCTCTCACTGCCGTA AACATGGCAACTGCAGTTCACTTACACCGCTTCTCAACCCGGTACGCACCAG
 AAAATCATTGATATGGCCATGAATGGCGTTGGATGCCGGGCAACAGCCCGCATTATGGGCGTTGGCCTCAACA
 CGATTTTACGTCACCTAAAAA ACTCAGGCCGAGTCGGTAACCTCGCGCATAACAGCCGGGAGTGACGTCATC
 GTCTGCGCGGAAATGGACGAACAGTGGGGCTATGTCCGGGCTAAATCGCGCCAGCGCTGGCTGTTTTACGCGT
 ATGACAGTCTCCGGAAGACGGTTGTTGCGCACGTATTCGGTGAACGCACTATGGCGACGCTGGGGCGTCTTAT
 GAGCCTGCTGTCAACCTTTGACGTGGTGTATGATGACGGATGGCTGGCCGCTGTATGAATCCCGCCTGAAG
 GGAAAGCTGCACGTAATCAGCAAGCGATATACGCAGCGAATTGAGCGGCATAACCTGAATCTGAGGCAGCACC
 TGGCACGGCTGGGACGGAAGTCGCTGTCTGTTCTCAAATCGGTGGAGCTGCATGACAAAGTCATCGGGCATT
 TCTGAACATAAAACACTATCAATAAGTTGGAGTCATTACCCAATTATGATAGAATTTACAAGCTATAAGGTTA
 TTGTCTGGGTTTTCAAGCATTAGTCCATGCAAGTTTTTATGCTTTGCCATTCTATAGATATATTGATAAGCG
 CGCTGCCTATGCCTTGCCCCCTGAAATCCTTACATACGGCGATATCTTCTATATAAAAGATATATTATCTTAT
 CAGTATTGTCAATATATTCAAGGCAATCTGCCTCCTCATCCTCTTTCATCCTCTTTCGTTTGGTAGCTTTTTTAA
 ATATGGCGCTTCATAGAGTAATTCTGTAAAGGTCCAATTCTCGTTTTTCATACCTCGGTATAATCTTACCTATC
 ACCTCAAATGGTTTCGCTGGGTTTTATCGCACCCCCGAACACGAGCACGGCACCCCGCAGCCACTATGCCAAGAAT
 GCCCAAGGTA AAAAATGCGCGCCCCGCCATGAAGTCCGTGAATGCCCGACGGCCGAAGTGAAGGGCAGGCCG
 CCACCCAGGCCGCCGCCCTCACTGCCCGGCACCTGGTTCGCTGAATGTCGATGCCAGCACCTGCGGCACGTCAA
 TGCTTCCGGGCGTGC GCTCGGGCTGATCGCCATCCCGTTACTGCCCGATCCCGGCAATGGCAAGGACTGC
 CAGCGCTGCCATTTTTGGGGT GAGGCCGTTTCGCGGCCGAGGGGCGCAGCCCCCTGGGGGGATGGGAGGCCCGCG
 TTAGCGGGCCGGGAGGGTTTCGAGAAGGGGGGGCACCCCTTTCGGCGTGC GCGGTACGCGCACAGGGCGCAG
 CCTTGGTTAAAAACAAGTTTTATAAATATTGGTTTTAAAAGCAGGTTAAAAGACAGGTTAGCGGTGGCCGAAAA
 ACGGGCGGAAACCTTGCAATGCTGGATTTTCTGCCTGTGGACAGCCCCCTCAAATGTCAATAGGTGCGCCCC
 TCATCTGTCAGCACTCTGCCCTCAAGTGTCAAGGATCGCGCCCCCTCATCTGTGAGTAGTGC GCGCCCCCTCAAG
 TGTCAATACCGCAGGGCACTTATCCCCAGGCTTGTCCACATCATCTGTGGGAAACTCGCGTAAAATCAGGCGT
 TTTTCGCCGATTTGCGAGGCTGGCCAGCTCCACGTGCGCGGCCGAAATCGAGCCTGCCCTCATCTGTCAACGC
 CGCGCCGGGTGAGTGC GCGCCCCCTCAAGTGTCAACGTCCGCCCCCTCATCTGTGAGTGGGGCAAGTTTTCCGCG
 AGGTATCCACAACGCCGGCGCGCGGTGTCTCGCACACGGCTTCGACGGCGTTTTCTGGCGCGTTTTGCAGGGC

Continuação APÊNDICE 2. Seqüência de nucleotídeos do vetor pEGAD. Em destaque, as seqüências referentes à EGFP (verde), aos oligonucleotídeos iniciadores, 5A e EGAD, utilizados nas reações de PCR e RT-PCR (rosa), aos sítios de corte das enzimas utilizadas na digestão dos vetores e do inserto (amarelo) e ao cDNA de *PROPEP1* (cinza).

CATAGACGGCCGCCAGCCCAGCGGCGAGGGCAACCAGCCCAGGTGAGCGTCGCAAAGGCGCTCGGTCTTGCCCTT
GCTCGTGGTGATGTACTTCACCAGCTCCGCGAAGTCGCTCTTCTTGATGGAGCGCATGGGGACGTGCTTGGC
AATCACGCGCACCCCCGGCCGTTTTAGCGGCTAAAAAGTCATGGCTCTGCCCTCGGGCGGACCACGCCCAT
CATGACCTTGCCAAGCTCGTCCTGCTTCTCTTCGATCTTCGCCAGCAGGGCGAGGATCGTGGCATCACCGAAC
CGCGCCGTGCGCGGGTTCGTCGGTGAGCCAGAGTTTTAGCAGGCCGCCAGGGCGGCCAGGTGCGCATTGATGC
GGGCCAGCTCGCGGACGTGCTCATAGTCCACGACGCCCGTGATTTTTGTAGCCCTGGCCGACGGCCAGCAGGTA
GGCCGACAGGCTCATGCCGGCCGCCGCCCTTTTCTCAATCGCTCTTCGTTTCGTCTGGAAGGCAGTACACC
TTGATAGGTGGGCTGCCCTTCCCTGGTTGGCTTGGTTTTATCAGCCATCCGCTTGCCCTCATCTGTTACGCCGG
CGGTAGCCGGCCAGCCTCGCAGAGCAGGATTCCCGTTGAGCACCGCCAGGTGCGAATAAGGGACAGTGAAGAA
GGAACACCCGCTCGCGGGTGGGCCTACTTCACCTATCCTGCCCGGCTGACGCCGTTGGATACACCAAGGAAAG
TCTACACGAACCCTTTGGCAAATCCTGTATATCGTGCGAAAAAGGATGGATATACCGAAAAAATCGCTATAA
TGACCCCGAAGCAGGGTTATGCAGCGGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGG
TAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCC
TGTCGGGTTTTGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAA
AACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTGACATGTTCTTTTCTGCGT
TATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGAC
CGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAGAAGGCCGCCAGAGAGGCCGAGCGCGGCCGT
GAGGCTTGGACGCTAGGGCAGGGCATGAAAAAGCCGTAGCGGGCTGCTACGGGCGTCTGACGCGGTGGAAG
GGGGAGGGGATGTTGTCTACATGGCTCTGCTGTAGTGAGTGGGTTGCGCTCCGGCAGCGGTCTGATCAATCG
TCACCTTTTCTCGGTCTTCAACGTTTCTGACAACGAGCCTCCTTTTCCGCAATCCATCGACAATCACCGCGA
GTCCCTGCTCGAACGCTGCGTCCGGACCGGCTTCGTGCAAGGCGTCTATCGCGGCCCGCAACAGCGGCGAGAG
CGGAGCCTGTTCAACGGTGCCGCCGCGCTCGCCGGCATCGCTGTGCGCGGCTGCTCCTCAAGCACGGCCCCA
ACAGTGAAGTAGCTGATTGTCATCAGCGCATTGACGGCGTCCCCGGCCGAAAAACCCGCCTCGCAGAGGAAGC
GAAGCTGCGCGTCCGCCGTTTTCCATCTGCGGTGCGCCCGTTCGCGTCCGGCATGGATGCGCGCGCCATCGCG
GTAGGCGAGCAGCGCCTGCCTGAAGCTGCGGGCATTCCCGATCAGAAATGAGCGCCAGTCGTGCTCGGCTCTC
GGCACCGAATGCGTATGATTCTCCGCCAGCATGGCTTCGGCCAGTGCCTGAGCAGCGCCCGCTTGTTTCTGA
AGTGCCAGTAAAGCGCCGGCTGCTGAACCCCCAACCGTTCCGCCAGTTTGGCGTGTGCTCAGACCGTCTACGCC
GACCTCGTTCAACAGGTCCAGGGCGGCACGGATCACTGTATTGCGCTGCAACTTTGTGTCATGCTTGACACTTTA
TCACTGATAAACATAATATGTCCACCAACTTATCAGTGATAAAGAATCCGCGCGTTCAATCGGACAGCGGAG
GCTGGTCCGGAGGCCAGACGTGAAACCCAACATAACCCCTGATCGTAATTCTGAGCACTGTGCGCTCGACGCT
GTCGGCATCGGCCGTGATTATGCCGGTGCTGCCGGGCTCCTGCGCGATCTGGTTCACTCGAACGACGTCACCG
CCCCTATGGCATTCTGCTGGCGCTGTATGCGTTGGTGAATTTGCCTGCGCACCTGTGCTGGGCGCGCTGTC
GGATCGTTTTCGGGCGGCGCAATCTTGCTCGTCTCGCTGGCCGGCGCCAGATCTGGGGAACCCTGTGGTTGG
CATGCACATACAAATGGACGAACGGATAAACCTTTTACGCCCTTTTAAATATCCGATTATTCTAATAAACGC
TCTTTTCTCTTA

APÊNDICE 3. Seqüência de nucleotídeos do gene codificante do peptídeo *AtPep1*, *PROPEP1* e dos plasmídeos pEGAD e pGSA, obtidos pelo seqüenciamento.

Clone	Seqüência (5' – 3")
<i>PROPEP1</i>	ATGGAGAAATCAGATAGACGAAGCGAAGAAAGTCACCTATGGATTCTCTTCAGTGCCTCGA CCAAACCCTCAGAGCTATCTTGAAATGCCTTGGTCTTTTTTCATCAAGATTCTCCGACAACGT CCTCTCCCGGAAC TTCGAAACAGCCGAAGGAGGAAAAAGAAGACGTTACCATGGAAAAGGAG GAGGTCGTTGTGACGAGTAGAGCCACAAAGGTCAAGGCAAAGCAAAGGGGAAGGAGAAAGT TAGCTCAGGCCGTCTGGCCAACATAATTAG
pEGAD	CTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGAGCTGCGGCCGCTGCCGCTGCGGCAGCGCCGAA TTCCCCGGGCTCGAGAAGCTTGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCTCGAGGA
pGSA	ATCTCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAA GAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGACATCTCCACTGACGTAAG GGATGACGCACAATCCCACCTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTT ATTTGGAGAGGACACGCTCGAGTATAAGAGCTCATTTTTTACAACAATTACCAACAACAACAA ACAACAAACAACATTACAATTACATTTACAATTACCATGGCGCGCCACTAGTCCCTAGAGTC CTGCTTTAATGAGATATGCGAGACGCCTATGATCGCATGATATTTGCTTTCAATTCTGTTGT GCACGTTGTAAAAAACCTGAGCATGTGTAGCTCAGATCCTTACCGCC

APÊNDICE 4. Resumo dos dados obtidos da expressão relativa de *PROPEP1*. Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP), obtidos da amplificação em tempo real dos mRNAs de *PROPEP1* e *Gapdh*, das plantas transformadas T2 não inoculadas ou inoculadas com *P. graminicola* (isolado 12) e *P. deliense* (isolado 17) e expressão dos diferentes eventos de transformação.

AMOSTRAS	QUANTIFICAÇÃO RELATIVA									
	<i>PROPEP1</i>			<i>Gapdh</i>			ΔCt^a	s*	$\Delta\Delta Ct^b$	Expressão ^c
	Ct	Média	DP	Ct	Média	DP				
pEGAD-AtPep03-C	13,8456			17,4383						
pEGAD-AtPep03-C	13,9473	13,8542	0,0892	17,4900	17,4641	0,0365	- 3,6100	± 0,0964	-10,3094	1.268,8889
pEGAD-AtPep03-C	13,7696			-						
pEGAD-AtPep03-12	16,2546			21,0033						
pEGAD-AtPep03-12	16,1604	16,2108	0,0474	20,8272	20,8952	0,0946	- 4,6845	± 0,1059	-11,3838	2.672,2390
pEGAD-AtPep03-12	16,2173			20,8552						
pEGAD-AtPep03-17	10,5592			16,0729						
pEGAD-AtPep03-17	10,6619	10,6951	0,1552	15,9525	16,0260	0,0644	- 5,3309	± 0,1681	-12,0302	4.182,7421
pEGAD-AtPep03-17	10,8643			16,0526						
pEGAD-AtPep04-C	16,3740			18,3821						
pEGAD-AtPep04-C	16,5351	16,5503	0,1844	18,5854	18,5627	0,1704	- 2,0125	± 0,2511	- 8,7118	419,2983
pEGAD-AtPep04-C	16,7418			18,7208						
pEGAD-AtPep04-12	19,4635			21,7249						
pEGAD-AtPep04-12	19,2801	19,3485	0,1002	21,5697	21,5260	0,2238	- 2,1776	± 0,2453	- 8,8770	470,1465
pEGAD-AtPep04-12	19,3018			21,2836						
pEGAD-AtPep04-17	16,8383			19,0000						
pEGAD-AtPep04-17	16,7027	16,7123	0,1215	18,8011	18,8780	0,1068	- 2,1657	± 0,1618	- 8,8651	466,2845
pEGAD-AtPep04-17	16,7027			18,8328						
pEGAD02-C	23,6257			16,9363						
pEGAD02-C	23,3469	23,6338	0,2910	16,8641	16,9344	0,0694	6,6994	± 0,2992	0,0000	1,0000
pEGAD02-C	23,9288			17,0029						
pEGAD02-12	24,0000			18,1855						
pEGAD02-12	24,1373	24,0687	0,0971	18,1850	18,2347	0,0857	5,8339	± 0,1295	-0,8655	1,8219
pEGAD02-12	-			18,3337						
pEGAD02-17	22,6599			15,3900						
pEGAD02-17	23,6594	23,1597	0,7068	15,2380	15,3140	0,1074	7,8457	± 0,7149	1,1463	0,4518

a- $\Delta Ct = \mu$ de *PROPEP1* - μ de *Gapdh*, b- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ dos diferentes eventos de transformação - ΔCt de pEGAD02-C, c- Aumento da expressão de *PROPEP1* relativo ao calibrador $2^{-\Delta\Delta Ct}$, s* (desvio padrão) = $\sqrt{s_{AtPep1}^2 + s_{Gapdh}^2}$ (Livak & Schmittgen, 2001)

APÊNDICE 5. Resumo dos dados obtidos da expressão relativa de PDF1.2. Ciclo limiar (Ct), médias, desvio padrão (DP), obtidos da amplificação em tempo real dos mRNAs de PDF1.2 e Gapdh, das plantas transformadas T2 não inoculadas ou inoculadas com *P. graminicola* (isolado 12) e *P. deliense* (isolado 17) e expressão dos diferentes eventos de transformação.

AMOSTRAS	QUANTIFICAÇÃO RELATIVA									
	PDF1.2			Gapdh			ΔCt^a	s*	$\Delta\Delta Ct^b$	Expressão ^c
	Ct	Média	DP	Ct	Média	DP				
pEGAD-AtPep03-C	31,5441			18,1944						
pEGAD-AtPep03-C	31,1645	31,3543	0,2684	18,3425	18,3265	0,1248	13,0278	$\pm 0,2960$	3,0135	0,1238
pEGAD-AtPep03-C				18,4425						
pEGAD-AtPep03-12	30,0678			21,3679						
pEGAD-AtPep03-12	31,2605	30,7783	0,6283	21,4412	21,3538	0,0953	9,4245	$\pm 0,6355$	-0,5898	1,5050
pEGAD-AtPep03-12	31,0066			21,2522						
pEGAD-AtPep03-17	17,0236			17,654						
pEGAD-AtPep03-17	16,8521	16,9524	0,0894	17,7272	17,6525	0,0755	-0,7001	$\pm 0,1170$	-10,7144	1.680,1799
pEGAD-AtPep03-17	16,9815			17,5763						
pEGAD-AtPep04-C	30,3284			19,0439						
pEGAD-AtPep04-C	30,1621	30,1292	0,2176	18,9694	19,0362	0,0633	11,0930	$\pm 0,2266$	1,0787	0,4735
pEGAD-AtPep04-C	29,897			19,0952						
pEGAD-AtPep04-12	27,956			22,0762						
pEGAD-AtPep04-12	27,683	27,8195	0,1930	22,0524	22,0869	0,0409	5,7326	$\pm 0,1973$	-4,2817	19,4496
pEGAD-AtPep04-12				22,132						
pEGAD-AtPep04-17	24			20						
pEGAD-AtPep04-17	25,3167	24,6584	0,9310	19,8413	19,8722	0,1155	4,7861	$\pm 0,9382$	-5,2282	37,4835
pEGAD-AtPep04-17				19,7754						
pEGAD02-C	27,8506			17,5848						
pEGAD02-C	27,5498	27,6433	0,1798	17,7046	17,6290	0,2119	10,0143	$\pm 0,1915$	0,0000	1,0000
pEGAD02-C	27,5295			17,5976						
pEGAD02-12	25,1386			19,2744						
pEGAD02-12	25,1747	25,1903	0,0611	19,3602	19,3323	0,1248	5,8580	$\pm 0,0791$	-4,1563	17,8312
pEGAD02-12	25,2577			19,3625						
pEGAD02-17	27,7972			16,105						
pEGAD02-17	27,6566			16,5015						
pEGAD02-17	27,5653	27,6730	0,1168	16,4328	16,3464	0,0953	11,3266	$\pm 0,2420$	1,3123	0,4027

a- $\Delta Ct = \mu$ de PDF1.2 - μ de Gapdh, b- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ dos diferentes eventos de transformação - ΔCt de pEGAD02-C, c- Aumento da expressão de PDF1.2 relativo ao calibrador $2^{-\Delta\Delta Ct}$, s* (desvio padrão) = $\sqrt{s_{AtPep1}^2 + s_{Gapdh}^2}$ (Livak & Schmittgen, 2001)

