

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

GLEIDSON SILVA TEIXEIRA

“Análise da expressão de genes envolvidos na reciclagem de grupos metil e do grau de metilesterificação de homogalacturonano na parede celular de cacau (*Theobroma cacao* L.) durante a doença Vassoura-de-bruxa”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) GLEIDSON SILVA TEIXEIRA e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microorganismos.

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
Co-orientadora: Dra. Maria Carolina Scatolin do Rio

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Teixeira, Gleidson Silva

T235a

Análise da expressão de genes envolvidos na reciclagem de grupos metil e do grau de metilesterificação de homogalacturonano na parede celular de cacau (*Theobroma cacao* L.) durante a doença vassoura-de-bruxa / Viviane Drumond Rodrigues. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Maria Carolina Scatolin do Rio.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. S-adenosil-L-metionina. 2. Metilação. 3. Homogalacturonano. 4. Parede celular primária. 5. Vassoura-de-bruxa (Fitopatologia). I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães. II. Rio, Maria Carolina Scatolin do. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título. (rcdt/ib)

Título em inglês: Evaluation of methyl recycling-related genes expression and homogalacturonan methylesterification degree in cacao (*Theobroma cacao* L.) cell wall during witches'broom disease.

Palavras-chave em inglês: S-adenosyl-L-methionine; Methylation; Homogalacturonan; Cell wall primary; Witches'broom disease.

Área de concentração: Genética de Microrganismos.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Lázaro Eustáquio Pereira Peres, Carlos Augusto Colombo.

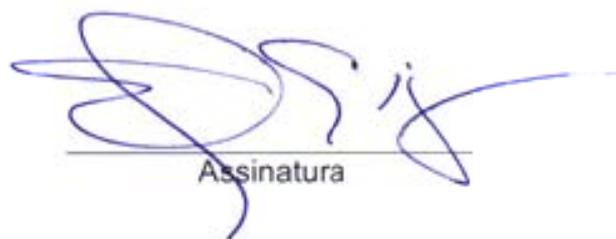
Data da defesa: 26/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 26 de fevereiro de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gonçalo A. G. Pereira
(Orientador)

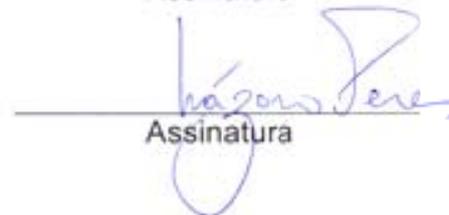


Assinatura

Profa. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Assinatura

Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres

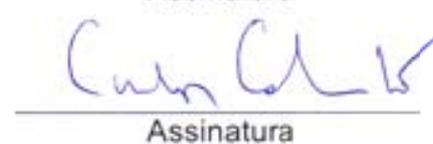


Assinatura

Dra. Odalys Garcia Cabrera

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Augusto Colombo



Assinatura

**Aos meus pais, Silvestre Teixeira e Maria das
Graças Teixeira, aos meus irmãos, Lelei e Kennia e
ao meu avô Audiley Silvério (*em memória*), dedico!**

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante os dois anos de Mestrado.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, sob a coordenação do Prof. Dr. Wanderley Dias da Silva.

Ao professor Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira pela orientação, confiança, oportunidade e por incentivar o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Maria Carolina Scatolin do Rio pela co-orientação, amizade e apoio incondicional.

Aos membros da pré-banca, Dr. Jorge Mondego e Dra. Odalys García Cabrera, pelas valiosas sugestões e questionamentos.

Aos doutores Jorge Mondego e Ana Carolina Deckmann, por colaborarem com ensinamentos essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos do Laboratório de Genômica e Expressão – LGE, pelo apoio e principalmente pelo carinho e amizade.

A todos os funcionários e amigos da Fazenda Almirante Cacau (Mars cocoa), especialmente à doutora Regina Cele, e aos amigos, Iara, Alcício e José Ailton, pela disponibilidade em supervisionar e colaborar com os experimentos em casa de vegetação.

Aos amigos do laboratório de Anatomia Vegetal do IB/UNICAMP, pela grande contribuição.

Ao professor Dr. Marcos Buckeridge e à doutora Patrícia Tonini do LAFIECO (Laboratório de Fisiologia Ecológica de Plantas) - USP, pela contribuição com os ensaios de imunolocalização.

De forma igualmente especial, aos meus grandes amigos, Juliano Bernardes, Bernardus Hulshof, André Yamashiro, Gustavo Jeuken, Robson Van Dijk, Charlie Van der Geest, Luiz Fernando, Danilo Volet, Paulo Bortolini, Arthur Welle, Marcos Grassi e Mário Balan, pelo carinho e amizade de todos.

E por último, a todos da minha família, especialmente aos meus pais, pelo incentivo e amor e, principalmente, por idealizarem comigo a conquista deste sonho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	ix
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	x
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	15
1.1. O cacaeiro e a doença Vassoura-de-bruxa.....	15
1.2. Ciclo de vida do <i>Moniliophthora perniciosa</i> e a doença Vassoura-de-bruxa.....	18
1.3. A parede celular vegetal: papel do domínio péctico homogalacturonano com diferentes graus de metilesterificação .	20
1.4. Reciclagem de grupos metil via SAM e reações de transmetilação	23
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1. Experimento em casa de vegetação.....	29
3.1.1.Cultivo de plântulas de <i>T. cacao</i> e inoculação com <i>M. perniciosa</i>	29
3.1.2.Coleta e fixação das amostras	30
3.2. Seleção e processamento das amostras.....	31
3.3. Síntese de sondas de RNA e hibridação	34
3.3.1.Busca pela sequências dos genes selecionados para o estudo..	34

3.3.2. Construção de <i>primers</i>	35
3.3.3. Extração de RNA de folhas de plântulas de cacau	36
3.3.4. Síntese de cDNA e amplificação por <i>PCR</i>	37
3.3.5. Clonagem	37
3.3.6. Sequenciamento	38
3.3.7. Linearização e transcrição <i>in vitro</i>	39
3.3.8. Hibridação <i>in situ</i>	40
3.4. Procedimentos para os ensaios de imunolocalização.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
7. ANEXOS.....	71

LISTA DE ABREVIACOES

ADK: Adenosina quinase

Ado: Adenosina

GalA: cido galacturônico

HG: Homogalacturonano

PME: Pectina metilesterases

PMT: Pectina metitrasferase

SAH: S-adenosil-L-homocisteína

SAHH: S-adenosil-L-homocisteína hidrolase

SAM: S-adenosil-L-metionina

SAMS: S-adenosil-L-metionina sintetase

SAM-MT: Metiltransferase dependente de SAM

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Cacaueiro (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	16
Figura 2: Sintomas da doença Vassoura-de-bruxa do cacaueiro	20
Figura 3: Representação esquemática da via de síntese e utilização de SAM	25
Figura 4: Procedimentos para a inoculação de plântulas de <i>T. cacao</i> com <i>M. pernicioso</i>	29
Figura 5: Seleção de amostras para montagem de lâminas	32
Figura 6: Progressão dos sintomas da Vassoura-de-bruxa em plântulas de <i>T. cacao</i> infectadas por <i>M. pernicioso</i>	36
Figura 7: Metodologia utilizada para a linearização dos vetores e síntese das sondas	39
Figura 8: Extração de RNA e amplificação por <i>PCR</i>	46
Figura 9: Confirmação da clonagem	47
Figura 10: Sondas sintetizadas por transcrição <i>in vitro</i>	49
Figura 11: Hibridação <i>in situ</i> do gene <i>SAMS</i> (14 DAI)	52
Figura 12: Hibridação <i>in situ</i> do gene <i>SAMS</i> (42 DAI)	53
Figura 13: Hibridação <i>in situ</i> do gene <i>PMT</i>	57
Figura 14: Imunolocalização de diferentes epítomos de Homogalacturonano	60
Tabela 1: Número de plântulas amostradas por ponto de coleta	31
Tabela 2: Sequência dos <i>primers</i> construídos para a amplificação dos genes selecionados para a hibridação <i>in situ</i>	36
Tabela 3: Confirmação da orientação do inserto em relação ao sítio de clonagem do vetor	49

RESUMO

A Vassoura-de-bruxa é uma das principais doenças que acometem o cacauero (*Theobroma cacao* L.). Ela é causada pelo fungo hemibiotrófico *Moniliophthora perniciosa*. Durante a fase biotrófica, o patógeno coloniza o espaço intercelular e estimula a formação de ramos hipertróficos/hiperplásicos denominados vassoura verde. No estágio avançado da doença, o fungo passa a colonizar também o interior das células e observa-se a morte do tecido originando a vassoura seca. Homogalacturonano (HG) é um domínio estrutural péctico que constitui a matriz da parede celular primária e define suas propriedades funcionais e estruturais. Durante sua síntese, HG é altamente metilesterificado pela ação de pectinas metiltransferases (PMT) que utilizam S-adenosil-L-metionina (SAM) como fonte de grupos metil. Após ser depositado na parede celular, o padrão de metilesterificações de HG é modelado por pectina metilesterases (PME). Alterações no padrão de metilesterificação de HG são relacionadas à má formação de tecidos, complicações durante o desenvolvimento vegetal e à resistência contra a degradação da parede celular por enzimas microbianas. Neste trabalho, a expressão tecido-específica de genes envolvidos nas reações de síntese de SAM e o grau de metilesterificação do HG foram analisadas em plântulas de *T. cacao* sadias e infectadas. *ESTs* (*expressed sequence tags*) de *T. cacao* foram utilizadas como molde para a síntese de sondas de RNA específicas para os genes: *glicosiltransferase*, *pectina metiltransferase*, *pectina metilesterase*, *S-adenosil-L-homocisteína hidrolase*, *adenosina quinase*, *S-adenosil-L-metionina sintetase* (SAMS). Além disso, os anticorpos monoclonais JIM5 e JIM7 foram utilizados na

imunolocalização de epítomos de HG com menor ou maior grau de metilesterificação. A detecção de transcritos de *SAMS* e *PMT* indicou que esses são diferentemente expressos em plântulas sadias e infectadas. Nas plântulas sadias, o sinal para o gene *SAMS* foi mais intenso nas amostras coletadas com 14 dias após a inoculação (DAI), comparado com as coletadas 42 DAI. Nas amostras infectadas o sinal não variou, entretanto, foi menos intenso comparado com o de plântulas sadias. A marcação de *PMT* foi evidente no ápice de plântulas sadias coletadas 42 DAI e ausente nas coletadas com 14 DAI. Interessantemente, a ocorrência foi inversa em plântulas infectadas. Epítomos de HG altamente metilesterificados foram detectados por JIM7 em ambas as amostras sadias e infectadas. Entretanto, com 42 DAI, a ligação de JIM7 foi detectada apenas em plântulas sadias, enquanto resíduos de HG pouco metilesterificados, reconhecidos por JIM5, foram observados nas amostras infectadas. Juntos, os resultados sugerem que 1) com 42 DAI, SAM disponível estaria sendo preferencialmente utilizado como precursor de outros compostos e não para a metilesterificação de pectinas e; 2) a alteração do grau de metilesterificação do HG em plantas infectadas pode ser resultado da menor disponibilidade de SAM, da menor expressão do gene que codifica a enzima PMT e/ou da atividade de PMEs, favorecendo assim, a degradação da parede celular por enzimas do fungo em um período onde a degradação da parede é essencial para progressão da doença.

ABSTRACT

The witches' broom disease is one of the major diseases affecting the cocoa (*Theobroma cacao* L.). It is caused by the hemibiotrophic *Moniliophthora perniciosa* fungus. During its biotrophic phase, the pathogen colonizes the intercellular space and stimulates the formation of hypertrophic/hyperplastic branches called green broom. In the advanced stage of the disease, the fungus starts also to colonize the interior of the cells and it is noted the death of tissue originating the dry broom. Homogalacturonan (HG) is a pectic structural domain that constitutes the primary cell wall matrix and defines its functional and structural proprieties. During its synthesis, HG is highly methylesterified by the action of pectin methyltransferases (PMT) which uses *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) as a source of methyl groups. After being deposited in the cell wall, the pattern of HG methylesterifications is modeled by pectin methylesterases (PME). Changes in the pattern of HG methylesterifications are related to poor tissue formation, complications during plant development and resistance to cell wall degradation by microbial enzymes. In this study, the tissue-specific expression of genes involved in the reaction of synthesis of SAM and the degree of HG methylesterification were analyzed in seedlings of healthy and infected *T. cacao*. ESTs (expressed sequence tags) of *T. cacao* were used as a template for the synthesis of specific RNA probes for the genes: glycoyltransferase, *pectin methyltransferase*, *pectin methylesterase*, *S*-adenosyl-L-homocysteine *hydrolase*, *adenosine kinase* and *S*-adenosyl-L-methionine *synthetase* (SAMS). Furthermore, the monoclonal antibodies JIM5 and JIM7 were used in the immunolocalization of HG epitopes with lesser or grater degrees of methylesterification. The detection of

transcripts of *SAMS* and *PMT* indicated that these are expressed differently in healthy and infected seedlings. In healthy seedlings, the signal of the *SAMS* gene was more intense than in samples collected 14 days after inoculation (DAI), compared to those collected 42 DAI. In the infected samples the signal did not change, however, it was less intense compared to healthy seedlings. The *PMT* staining was evident in the shoot apex of the healthy seedlings collected 42 DAI and missing in the ones collected 14 DAI. Interestingly, the occurrence was the inverse in infected seedlings. Highly methylesterified HG epitopes were detected by JIM7 in both healthy and infected samples. However, with 42 DAI, the JIM7 binding was detected only in healthy seedlings, while residues of less methylesterified HG, recognized by JIM5, were observed in the infected samples. Taken together, the results suggest that: 1) with 42 DAI, available SAM would be primarily used as a precursor to other compounds and not to methylesterification of pectins and; 2) the changes in the level of HG methylesterification in infected plants may be the result of the lower availability of SAM, lower expression of *PMT* and/or the activity of PMEs, thereby favoring the degradation of the cell wall by the fungus enzymes in a time where the degradation of the wall is essential to the progression of the disease.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. O cacau e a doença Vassoura-de-bruxa

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma planta pertencente à família Malvaceae e possui como centro de diversidade genética a bacia Amazônica. O *T. cacao* é uma planta diplóide e possui 20 cromossomos. Tradicionalmente, distinguem-se dois grupos: o “Criollo” e o “Forastero”, baseado em suas ocorrências e morfologia. Uma terceira variedade, o “Trinidário”, consiste do cruzamento entre “Criollo” e “Forastero” (Motamayor *et al.*, 2008).

Em florestas neotropicais, o cacau pode alcançar alturas maiores que 15 metros. Porém, em cultivos, sua altura varia entre 5 a 8 metros. O *T. cacao* é uma planta perene e seu fruto, o cacau, é quase que exclusivamente explorado para a produção de chocolate. Cada fruto possui em média 30 a 50 sementes ou amêndoas envolvidas por uma mucilagem adocicada. Os frutos se desenvolvem a partir da polinização de flores que ocorrem como almofadas florais sobre o caule principal e ramos maiores (Fig. 1) (Purdy and Schmidt, 1996).

As principais doenças que acometem o cacau são: 1) a Vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora (= *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer) (Aime and Phillips-Mora, 2005), a qual ocorre principalmente na América do Sul; 2) a Monilíase, causada pelo fungo *M. roreri*, encontrada no norte da América do Sul e Central; 3) a Podridão Parda, causada por diversas espécies de *Phytophthora* distribuídas por todos os trópicos e; 4) o Mal do Facão, causada pelo fungo *Ceratocystis* (Engelbrecht *et al.*, 2007; Evans, 2007).

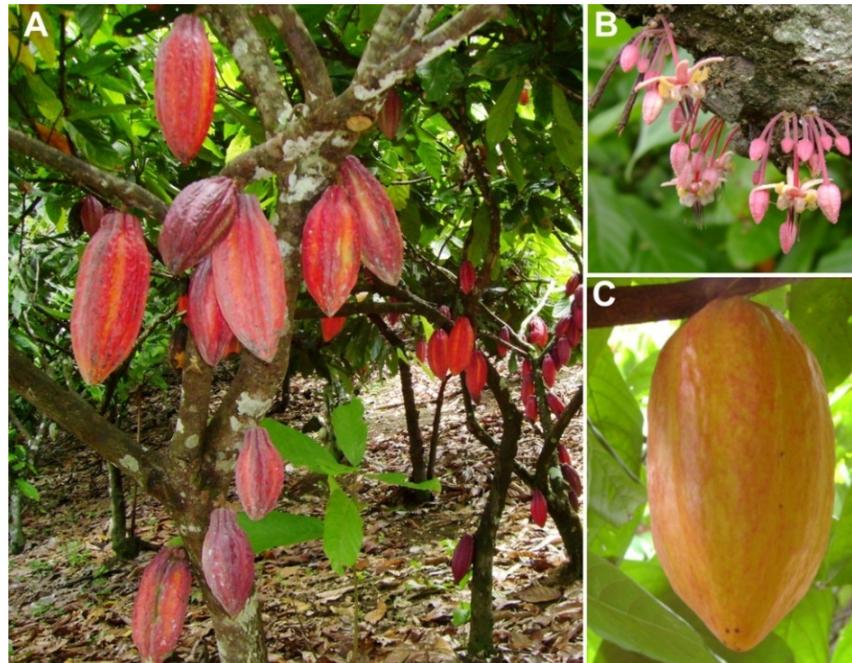


Figura 1: Cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) **A)** Cultivo de cacaueiros da variedade Ipiranga produzindo alta quantidade de frutos. **B)** Almofadas florais. **C)** Fruto maduro de *T. cacao*.

Atualmente a Vassoura-de-bruxa, é considerada uma das mais importantes fitopatologias do cacaueiro. Esta doença é responsável por grandes perdas na produção de cacau, provocando um expressivo impacto econômico nos países onde ela ocorre. No Brasil, a Vassoura-de-bruxa foi descrita pela primeira vez em 1989 no sul da Bahia (Pereira *et al.*, 1989); no entanto, a maior variabilidade genética de biótipos-C (que infecta especificamente o cacaueiro) encontrada em isolados amazônicos indica que a presença da doença no estado baiano é provavelmente resultado da introdução de *M. pernicioso* originário da Amazônia (Rincones *et al.*, 2006).

No início da década de 90, o Brasil foi o principal produtor de cacau das Américas (Purdy and Schmidt, 1996) e líder na exportação de cacau inteiro e seus derivados (pasta, manteiga e cacau em pó). No entanto, devido à introdução da doença

no sul da Bahia, maior região produtora, em menos de dez anos o Brasil registrou uma queda na produção de aproximadamente 45% (http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS/AGRICULTURA_E_NUMEROS_2005/03.01.02_1.XLS), diminuindo significativamente sua participação no mercado mundial de cacau. Com a crise estabelecida, a partir desse período, a produção de cacau brasileira tornou-se insuficiente para suprir a demanda interna, e o Brasil outrora principal exportador, passou a ser importador de cacau e seus derivados.

A crise na cacauicultura também gerou impactos sociais e ambientais que repercutem até os dias atuais. Somente no sul da Bahia, milhares de pessoas dependem direta ou indiretamente da cacauicultura como fonte de renda, e práticas ocorrentes como o abandono de fazendas tomadas pela doença geram inúmeros desempregos. Os impactos ambientais são causados pela substituição de lavouras de cacau por outras culturas, como café e pastos. Este processo causa a destruição de um sistema agroflorestral denominado “Cabruca”, onde cacauzeiros são plantados sob a sombra de árvores mais altas das matas originais. Deste modo, a preservação da Cabruca é importante para a conservação da mata atlântica (Rolim and Chiarello, 2004).

É evidente que a criação de um plano de controle para a doença Vassoura-de-bruxa é indispensável, mas a complexidade biológica da doença, associada à abundância de hospedeiros suscetíveis, longos períodos de clima favorável ao ciclo da doença e outros fatores, dificultam as tentativas de manejo dessa fitopatologia (Purdy and Schmidt, 1996). A poda sanitária (Lima *et al.*, 1991), o controle químico pelo uso de fungicidas (Bastos, 1989), o controle biológico (Pires and Luz, 1995) e o

desenvolvimento de clones resistentes (Pires and Luz, 1995) são as principais estratégias utilizadas. Dessas, a última parece ser a mais promissora, mas há uma preocupação quanto à possibilidade dessas variedades se tornarem suscetíveis, devido à introdução de novos biótipos provenientes da Amazônia, uma vez que estes possuem maior variabilidade genética do que isolados de *M. perniciosa* da Bahia (Rincones *et al.*, 2006).

Para compreender melhor a complexidade desta doença, em 2000 foi iniciado o Projeto Genoma Vassoura-de-bruxa (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>), que permitiu a identificação de vários genes importantes para o desenvolvimento da doença. Compreender os detalhes do papel destes genes, bem como as respostas da planta à presença do patógeno, é o principal desafio no momento, e envolve a dedicação de um grupo de pesquisadores especializados em genética molecular, biologia celular, fisiologia vegetal, bioquímica e anatomia vegetal. Espera-se que com o entendimento de tais mecanismos seja possível o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para o combate à doença Vassoura-de-bruxa.

1.2. Ciclo de vida do *Moniliophthora perniciosa* e a doença Vassoura-de-bruxa

O fungo basidiomiceto *M. perniciosa* exibe um ciclo de vida hemibiotrófico, devido à ocorrência de duas fases distintas: 1) fase biotrófica (parasítica), caracterizada por um micélio monocariótico e hifas intumescidas sem grampo de conexão; 2) fase

necrotrófica (saprofítica), caracterizada por um micélio dicariótico e hifas finas com grampos de conexão (Evans and Bastos, 1979; Hedger *et al.*, 1987).

A infecção típica se inicia quando basidiósporos (meio de propagação do patógeno) atingem a superfície de órgãos sadios ou lesados da planta, produzindo tubos de germinação monocarióticos que alcançam tecidos meristemáticos ativos como: gemas vegetativas, frutos em desenvolvimento e almofadas florais (Evans and Bastos, 1979; Sreenivasan and Dabydeen, 1989) (Fig. 2). Na primeira fase da doença, o fungo se encontra na fase biotrófica, o micélio monocariótico coloniza a região apoplástica (intercelular) do tecido infectado e estabelece uma relação parasítica com a planta, dependendo de nutrientes dos tecidos vegetais para seu desenvolvimento (Wei *et al.*, 2004). O tecido infectado responde à presença do fungo de forma localizada: no sítio de infecção ocorre perda da dominância apical, hipertrofia e hiperplasia celular, resultando no crescimento excessivo e desorganizado de ramos anormais e na formação de uma estrutura denominada vassoura verde (Evans and Bastos, 1979) (Fig. 2b).

M. pernicioso permanece na fase biotrófica por aproximadamente 6-9 semanas, em algum momento entre 35-61 dias após a infecção, ocorre a dicarionização do micélio, o fungo muda da fase biotrófica para a fase necrotrófica, micélios dicarióticos são encontrados colonizando ambos os espaços inter e intracelular (Penman *et al.*, 2000). Durante esta fase, acredita-se que o patógeno causa necrose e morte celular do tecido infectado, resultando na vassoura seca (Evans and Bastos, 1979) (Fig. 2c). O ciclo de vida do fungo se completa com a frutificação do micélio necrotrófico após a morte dos tecidos vegetais e a formação de basidiocarpos (Wheeler, 1985); nestes, em células específicas denominadas basídios, ocorrem cariogamia e meiose, resultando na

formação de novos esporos que serão liberados durante a noite devido à sua sensibilidade à radiação ultravioleta (Purdy and Schmidt, 1996). A ocorrência de períodos secos e úmidos intercalados é essencial para a formação de basidiósporos, o que torna a Bahia um ambiente muito propício para o desenvolvimento e propagação da Vassoura-de-bruxa.



Figura 2: Sintomas da doença Vassoura-de-bruxa do cacauero. A) Cacauero com vários ramos infectados **B)** Vassoura verde. **C)** Vassoura seca. **D)** Fruto maduro infectado. **E)** Amêndoas inviáveis por causa da infecção. **F)** Fruto partenocárpico, resultado da infecção de almofadas florais.

1.3. A parede celular vegetal: papel do domínio péctico homogalacturonano com diferentes graus de metilesterificação

A parede celular primária das células vegetais é uma estrutura altamente dinâmica e multifuncional que participa da regulação do volume e da determinação da

forma celular, bem como na interação com patógenos. Neste caso, a parede atua como primeira linha de defesa (barreira física) contra a invasão por microrganismos e na liberação de moléculas sinalizadoras, derivadas da degradação dos seus componentes por enzimas microbianas, que ativam cascatas de sinalização disparando o sistema de defesa da planta (Esquerré-Tugayé *et al.*, 2000; Ridley *et al.*, 2001).

Em sua constituição encontram-se vários polímeros incluindo celulose, hemicelulose e compostos fenólicos, todos ancorados em uma matriz de polissacarídeos pécticos (Ridley *et al.*, 2001). A matriz péctica é estruturalmente complexa e heterogênea, e contribui para a integridade física e *status* fisiológico da parede celular (Willats *et al.*, 1999). Polissacarídeos pécticos são definidos pela presença de uma cadeia principal de resíduos de ácido galacturônico (GalA), que pode ser substituído e modificado de várias formas. Três domínios estruturais distintos que podem estar ligados covalentemente compõem a matriz: homogalacturonano (HG), rhamnogalacturonano I e rhamnogalacturonano II. HG consiste em um polímero linear de resíduos de GalA, os quais são parcialmente metilesterificados no grupo carboxila do carbono C-6 (Ridley *et al.*, 2001; Willats *et al.*, 2002).

Em células vegetais, a síntese da cadeia principal do HG é iniciada na cisterna *cis* do complexo de *Golgi* e se estende na cisterna medial. Metiltransferases específicas catalisam a adição de grupos metil a resíduos de GalA na cisterna medial. Após a síntese, os novos polissacarídeos pécticos são exportados para o espaço apoplástico e integrados entre polissacarídeos existentes na parede (Goubet and Mohnen, 1999a; Goubet and Mohnen, 1999b; Ishikawa *et al.*, 2000; Zhang and Staehelin, 1992).

Postula-se que HG é depositado na parede celular em uma forma altamente metilesterificada (70-80%), no entanto, este pode ser subsequentemente desmetilesterificado. O padrão de desmetilesterificação de pectinas é determinado por enzimas que removem os grupos metil dos resíduos de GalA denominadas pectina metilesterases (PMEs). Resíduos de GalA desmetilesterificados por sua vez, são importantes para a formação de géis, através da ligação cruzada com íons Ca^{2+} . Dessa forma, propriedades físicas da matriz como a rigidez, a elasticidade, a capacidade de reter água e a porosidade dos géis são influenciadas pelo padrão e pelo número de resíduos de GalA metilesterificados do domínio HG (Willats *et al.*, 2002).

O grau de metilesterificação do HG também está relacionado com a resistência de plantas a fungos patogênicos. Lionetti e colaboradores (2007) demonstraram recentemente que a superexpressão de inibidores de PMEs em *Arabidopsis thaliana* diminui os sintomas causados pelo fungo ascomiceto *Botrytis cinerea*, possivelmente pela menor habilidade deste de crescer na presença de pectinas com maior grau de metilesterificação.

Microdomínios de HG com diferentes graus de metilesterificação apresentam padrões de distribuição nos tecidos vegetais. Willats e colaboradores (2001) demonstraram que HG altamente metilesterificado ocorre em toda a mucilagem da semente de *A. thaliana*, enquanto na região interior ocorrem também microdomínios de HG estabilizados por ligações cruzadas com cálcio. Este mesmo estudo indicou que a distribuição destes microdomínios segue um padrão na raiz, com a presença de blocos estruturais de HG desmetilesterificados em regiões de junções intercelulares, provavelmente envolvidos na adesão célula-célula. De acordo com Moffatt e

colaboradores (2001), o baixo nível de metilesterificação de pectinas do interior da mucilagem está diretamente relacionado à baixa atividade da enzima adenosina guinase (ADK). O menor grau de metilesterificação do HG foi atribuído ao acúmulo de S-adenosil-L-homocisteína (SAH) devido à inibição da enzima SAH hidrolase (SAHH), inibida por *feedback* pelo aumento da concentração de adenosina (Ado) que é substrato da ADK.

Um estudo realizado por Pereira e colaboradores (2006) comprovou que a atividade da enzima ADK está também relacionada com o grau de metilesterificação de polissacarídeos pécnicos da parede celular. Linhagens mutantes de *A. thaliana* deficientes na atividade da ADK apresentaram alta concentração de pectinas pouco metilesterificadas na parede celular, com distribuição diferenciada daquela observada em linhagens selvagens. Considerando que pectinas desmetilesterificadas possuem melhores propriedades de adesão, é possível que o baixo grau de metilesterificação das pectinas possa ser responsável pelo formato irregular e tortuoso das folhas de plantas com a atividade ADK diminuída analisadas neste estudo, sugerindo que a distribuição irregular destes microdomínios pécnicos interfere no processo normal de expansão celular.

1.4. Reciclagem de grupos metil via SAM e reações de transmetilação

A metilesterificação de pectinas, e de outros importantes componentes celulares como ácidos nucleicos e componentes da membrana celular, requerem S-adenosil-L-

metionina (SAM) como doador de grupos metil. SAM é também precursor para a síntese do hormônio vegetal etileno e de poliaminas. Após ser utilizado, SAM é regenerado e por isso, não é considerado uma fonte limitante em células vegetais (Fig. 3). É preciso que a concentração de SAM seja suficiente para suprir a exigência de grupos metil necessários para as diversas reações de transmetilação. Assim, alterações nas reações intermediárias à regeneração de SAM podem interferir na sua concentração ideal impedindo, por exemplo, que metilesterificações importantes ocorram (Fontecave *et al.*, 2004; Good *et al.*, 1994).

Metiltransferases dependentes de SAM (SAM-MTs) catalisam a transferência do grupo metil para o aceptor e geram uma molécula de SAH (Fig. 3). SAH é um inibidor competitivo de reações de SAM-MTs e, portanto, é rapidamente hidrolisado em Ado e homocisteína (Hcy) em uma reação reversível catalisada pela enzima SAHH. Em plantas, a principal via para o metabolismo de Ado é a fosforilação em AMP pela enzima ADK. Níveis elevados de Ado inibem a atividade de SAHH e com isso promovem o acúmulo de SAH. A síntese de novas moléculas de SAM se dá a partir da conversão de Hcy em metionina e subsequentemente em SAM, pela enzima SAM sintetase (SAMS) (Moffatt and Weretilnyk, 2001).

Pereira e colaboradores (2007) demonstraram que as atividades das enzimas SAMS e PEAMT (uma SAM-MT) e seus transcritos foram equivalentes à atividade das enzimas ADK e SAHH em *A. thaliana*, apresentando maior atividade em órgãos em desenvolvimento do que em órgãos maduros. Os resultados ilustram uma forma de expressão coordenada entre as enzimas envolvidas na reciclagem de grupos metil via SAM, e apontam para a maior necessidade de reações de transmetilações em tecidos

em desenvolvimento, nos quais predominam processos metabólicos envolvidos na divisão celular, como a formação de novos componentes da membrana plasmática e parede celular. Em resumo, a insuficiência de reações de transmetilação, pela inibição de metiltransferases ou pela alteração em alguma reação que precede a síntese de SAM, pode causar uma deficiência no desenvolvimento normal da planta (Good *et al.*, 1994).

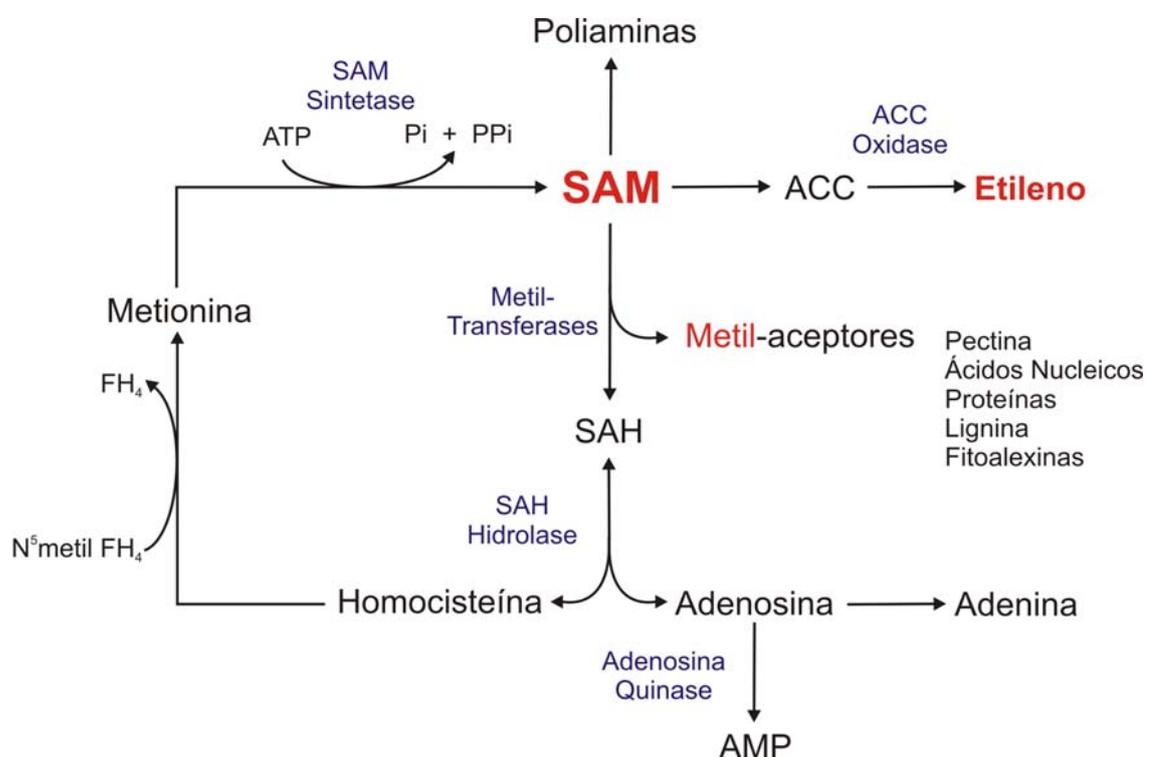


Figura 3: Representação esquemática da via de síntese e utilização de SAM. S-adenosil-L-metionina (SAM) é precursor para a síntese de poliaminas, etileno, e a principal fonte de grupos metil para inúmeras reações de transmetilação incluindo a metilação de ácidos nucléicos, compostos de defesa e metilesterificação de polissacarídeos pécticos.

Estudos prévios demonstraram que os níveis de expressão de enzimas envolvidas nas diversas reações ligadas a via de reciclagem de grupos metil também se alteram em resposta a estresse abiótico e biótico. Em alfafa, a elicitação da resposta de

fitoalexinas (um dos mecanismos de defesa vegetal) usando uma preparação da parede celular de levedura resultou em um aumento de seis vezes da atividade da enzima SAMS, e um aumento transitório concomitante da atividade da enzima SAHH (Edwards, 1996). Em outro estudo, o tratamento com elicitor fúngico induziu a expressão de mRNAs do gene *SAHH* em cultura de células e em folhas intactas de salsa (Kawalleck *et al.*, 1992).

Recentemente, dois estudos independentes com mutantes de *A. thaliana* sugerem a função de pectina metiltransferase (PMT) para o gene *QUA2* e *TSD2*; embora os mutantes tenham recebido nomes diferentes (*qua2* e *tsd2*), eles se referem ao mesmo *locus* gênico. Em ambos, o fenótipo mutante foi caracterizado principalmente pela ocorrência do domínio HG com o grau de metilesterificação alterado e desordens na formação de tecidos devido ao comprometimento da adesão intercelular (Krupkova *et al.*, 2007; Mouille *et al.*, 2007). Fenótipo semelhante foi observado em outro mutante de *A. thaliana* (*qua1*) descrito previamente por Bouton e colaboradores (2002). Neste, a parede celular apresentou uma redução de 25% no nível de GalA devido a deficiência na atividade de uma glicosiltransferase (GT), que catalisa a polimerização do domínio HG através da ligação glicosídica entre resíduos de GalA. Além da estreita relação fenotípica entre os mutantes *qua2/tsd2* e *qua1*, há também uma correlação do perfil transcricional entre eles, levando à hipótese destes genes atuarem de forma interdependente (Mouille *et al.*, 2007).

Considerando que durante a progressão da doença Vassoura-de-bruxa observa-se um crescimento desordenado e uma mudança radical na morfologia do ramo infectado e que, durante a transição de vassoura verde para vassoura seca, a

colonização do interior celular pelo fungo exija que a parede celular seja degradada, compreender os eventos que podem influenciar a formação da parede celular durante o desenvolvimento da Vassoura-de-bruxa, possibilitará o melhor entendimento de suas implicações nos sintomas típicos da doença, crescimento hipertrófico e anormal de ramos (vassouras), bem como seu papel na defesa contra a infecção por *M. perniciosus*, seja por resistência física ou sinalização.

2. OBJETIVOS

Neste trabalho foi proposto como objetivo geral, avaliar a expressão de genes da via de síntese de SAM e caracterizar o grau de metilesterificação do homogalacturonano em plântulas sadias e infectadas por *M. perniciosa*.

Como objetivos específicos foram propostos:

1) Analisar a expressão tecido-específica dos genes *SAHH*, *ADK* e *SAMS* envolvidos na reciclagem de grupos metil via SAM; *QUA2/TSD2* e *QUA1*, *pectina metiltransferase (PMT)* e *glicosiltransferase (GT)* com ações interdependentes e; *PME*, *pectina metilesterase*.

2) Caracterizar por imunolocalização, o grau de metilesterificação do HG através da detecção de resíduos de ácido galacturônico (GalA) metilesterificados e não metilesterificados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Experimento em casa de vegetação

3.1.1. Cultivo de plântulas de *T. cacao* e inoculação com *M. pernicioso*

O experimento em casa de vegetação foi realizado na Fazenda Almirante Cacau (Mars Cacau), localizada em Itajuípe (BA). Trinta e cinco dias após a germinação das sementes, as plântulas encontravam-se no ponto ideal para a inoculação, apresentando um meristema vegetativo ativo indicado pelo lançamento foliar com aproximadamente 1cm (Fig. 4a). Assim, aproximadamente 200 plântulas da variedade suscetível Catongo Blanco foram divididas em dois grupos: 1) inoculadas e 2) não-inoculadas (controle). Para estimular a abertura dos estômatos e assim propiciar o aumento da eficiência da inoculação, as plântulas do grupo das inoculadas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas antes da inoculação e por 48 horas após a inoculação (Fig. 4b). O meristema vegetativo das plântulas desse grupo foi inoculado com 30 μ l de suspensão de basidiósporos de *M. pernicioso* (1,0x10⁶ ml⁻¹ esporos; Frias *et al.*, 1995).



Figura 4: Procedimentos para a inoculação de plântulas de *T. cacao* com *M. pernicioso*. A) Lançamento foliar apontado pela seta, indicando a atividade do meristema vegetativo. Barra = 1cm B) Plântulas mantidas em câmara úmida para estimular a abertura dos estômatos e favorecer a infecção pelos esporos de *M. pernicioso*.

3.1.2. Coleta e fixação das amostras

Para se obter amostras representativas de todos os sintomas da doença, os ramos (ápice e caule) inoculados e não inoculados foram coletados com 2 ou 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 48, 56 e 63 dias após a inoculação (DAI). Da mesma forma, para padronizar o procedimento de coleta durante todos os pontos, foi coletado todo o caule acima do segundo par de internós. As amostras foram mantidas por pelo menos 48 horas na solução fixadora para preservar a integridade do tecido.

A cada coleta, as amostras destinadas a análise da expressão gênica por hibridação *in situ* foram fixadas em FAA (formaldeído: ácido acético: etanol 50% - 1:1:18 v/v) (Johansen, 1940), enquanto as amostras destinadas ao estudo do domínio homogalacturonano por imunolocalização foram preservadas em solução de *Karnovisky* (paraformaldeído 4%: glutaraldeído 1% em tampão fosfato 0,1M pH7,2: tampão fosfato 0,2M pH7,2 - 2:5:3 v/v) (Karnovisky, 1965). A tabela 1 resume o número de ramos amostrados por ponto de coleta e o número de amostras fixadas em cada solução.

Após período necessário para a fixação do material, as soluções fixadoras foram lavadas. Para FAA, as amostras foram mantidas em álcool etílico 50% por 12 horas e depois lavadas e mantidas em etanol 70%. Para solução de *Karnovisky*, as amostras foram lavadas com solução tampão (tampão fosfato 0,1M pH7,2: tampão fosfato 0,2M pH7,2), álcool etílico 30 e 50% e, em seguida, lavadas e mantidas em etanol 70%.

Tabela 1: Número de plântulas amostradas por ponto de coleta. Amostras fixadas em FAA foram utilizadas para hibridação *in situ*. Plântulas fixadas *Karnovsky* foram destinadas ao estudo do HG por imunolocalização.

Ponto de coleta (DAI)	Sadias		Infectadas		TOTAL
	FAA	K	FAA	K	
1 (2)	3	3	3	3	12
2 (7)	3	3	3	3	12
3 (14)	3	3	3	3	12
4 (21)	3	3	3	3	12
5 (28)	3	3	3	3	12
6 (35)	3	3	3	3	12
7 (42)	3	3	3	3	12
8 (49)	3	2	3	3	11
9 (56)	3	2	3	3	11
10 (63)	2	2	2	2	8
Total de amostras	29	27	29	29	114

3.2. Seleção e processamento das amostras

Nessa etapa, regiões específicas de cada ramo coletado foram selecionadas e identificadas apropriadamente. Para cada amostra, quando possível, oito fragmentos de aproximadamente 0,5cm foram selecionados: três da base da amostra (B), três da região mediana (M) e dois fragmentos do ápice (A) (Fig. 5).

Todo material selecionado foi desidratado em uma série crescente de ABT-EtOH (Álcool Butílico Terciário:Etanol) (70, 85, 95 e 100%), sendo mantido por pelo menos 4 horas em cada solução. Em seguida, as amostras foram mantidas por 4 horas em ABT 100%, essa etapa foi repetida por 3 vezes para desidratar completamente o material. Após a desidratação, as amostras foram incluídas em Paraplast[®] Plus (Merck). As amostras em ABT 100% foram invertidas em recipientes contendo Paraplast. Estes

foram mantidos em estufa à 60°C para a evaporação do álcool. Subsequentemente foram feitas três trocas de Paraplast em intervalos de 12 horas e, após a última troca, as amostras foram montadas em cubos de parafina sólida para posterior microtomia.

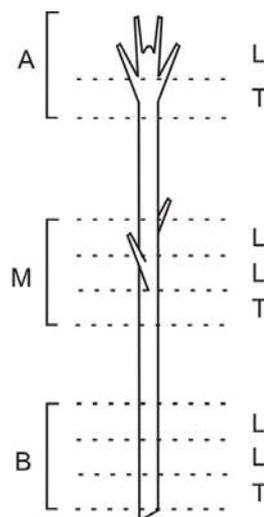


Figura 5: Seleção de amostras para montagem de lâminas. Desenho esquemático da seleção de fragmentos a partir de cada amostra fixada em FAA e em solução de *Karnovsky*. *L* indica fragmentos que foram seccionados longitudinalmente e *T* transversalmente. A: ápice; M: meio; B: base.

Inicialmente, para confirmar a infecção das plântulas inoculadas, principalmente nas coletadas nos primeiros pontos (1, 2 e 3) onde os sintomas de infecção não são muito evidentes, adotou-se a estratégia de processar às cegas todo o material e confirmar por microscopia a presença do fungo. Entretanto, acreditamos que devido à baixa densidade de hifas presentes no início da infecção (Penman *et al.*, 2000) e a perda do ponto de inoculação devido ao alongamento do ramo infectado, não foi possível confirmar a infecção por esse método (dados não apresentados). Por isso, os

experimentos seguiram com as amostras que já apresentavam sintomas quando coletadas (Fig. 6).

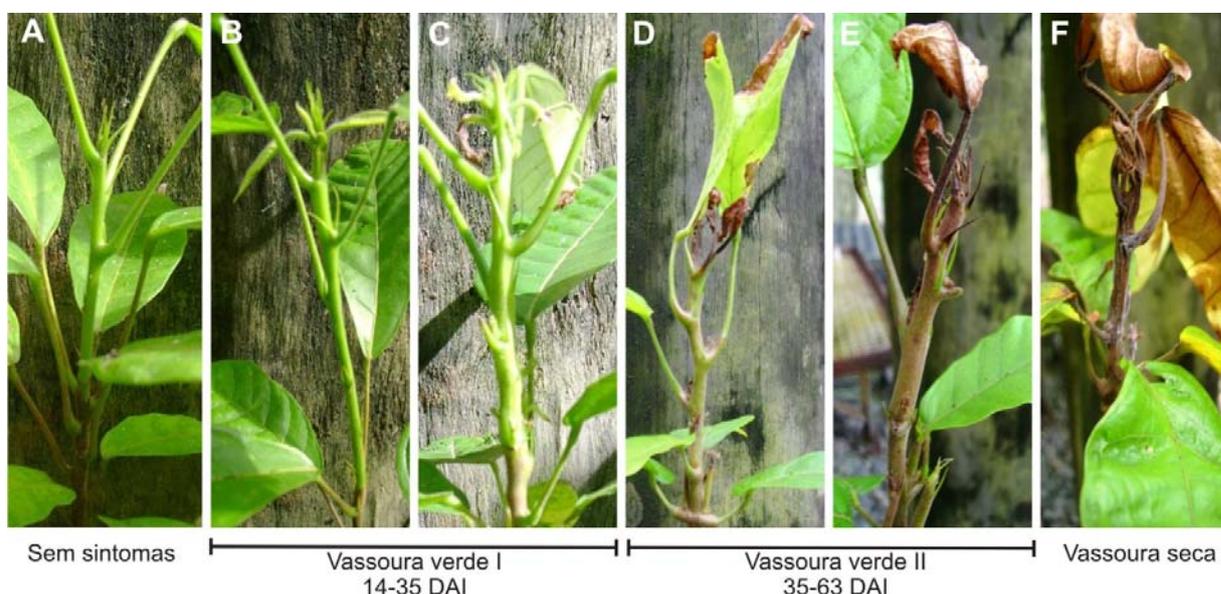


Figura 6: Progressão dos sintomas da Vassoura-de-bruxa em plântulas de *T. cacao* infectadas por *M. perniciosa*. A) Plântula assintomática. B-C) Vassoura verde I, ausência de necrose do ramo infectado. D-E) Vassoura verde II, presença de pontos de necrose distais em relação o ponto de inoculação do ramo. F) Vassoura-seca, morte do ramo infectado.

Fragmentos do caule e ápices de amostras coletadas com 14, 42 e 63 DAI foram seccionados em micrótomo rotativo. Cinco secções transversais com 10 μ m de espessura do caule e três cortes longitudinais com 12 μ m de espessura do ápice foram distendidos, em placa aquecedora a 55°C, sobre lâminas carregadas eletricamente (ProbeOn Plus[®] - Fisher), ideais para hibridação *in situ* e imunolocalização.

3.3. Síntese de sondas de RNA e hibridação

3.3.1. Busca pela sequências dos genes selecionados para o estudo

Para identificar as sequências utilizadas como moldes para a síntese de sondas de RNA, foram feitas buscas no banco de dados de *ESTs* (*Expressed Sequenced Tags*) de *T. cacao* (www.lge.ibi.unicamp.br/cacau).

Através da busca por palavras-chave, foram encontradas sequências referentes aos genes: *PME*, *SAHH*, *ADK* e *SAMS*, previamente definidos nos objetivos deste trabalho. Adicionalmente, foram identificadas sequências referentes aos genes: *Caffeic acid 3-O-Methyltransferase* (*CAFF-MT*) e *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase* (*ACC-OX*) que catalisam respectivamente a metilesterificação durante a síntese de lignina e a reação final para a síntese de etileno.

Por não haver nenhum gene descrito como uma metiltransferase específica para de pectinas (PMTs), a sequência predita como pectina metiltransferase hipotética nos mutantes *tsd2* e *qua2* de *A. thaliana* (Krupkova *et al.*, 2007; Mouille *et al.*, 2007) foi utilizada no alinhamento (BLASTx) contra o banco de *ESTs* do cacau. A mesma estratégia foi utilizada para encontrar a sequência do gene *glicosiltransferase* (mutante de *Arabidopsis* - *qua1*) (Bouton *et al.*, 2002), descrito previamente por Mouille e colaboradores (2007) como uma enzima de ação interdependente à PMTs durante a síntese de pectinas.

Mais de um *read* foram encontrados para cada gene. Entretanto, apenas os *reads* depositados como *PME*, *ADK* e *SAMS* formaram *contigs*. Para estes, a sequência consenso foi utilizada para o alinhamento (BLASTx) com sequências depositadas no

NCBI. Para os genes *GT*, *PMT*, *SAHH*, *CAFF-MT* e *ACC-OX*, cujo *reads* não formaram *contigs*, foram utilizadas as sequências de melhor qualidade baseada no *e-value* (BLASTn) e na melhor qualidade do cromatograma.

A sequência de aminoácidos obtida a partir das *ESTs* encontradas foram utilizadas no alinhamento por BLASTp contra sequências do NCBI para verificar o domínio protéico que cada sequência representa e dessa forma foi confirmada a identidade funcional das mesmas (dados não apresentados).

3.3.2. Construção de *primers*

Regiões adequadas das seqüências obtidas no banco de *ESTs* do cacau foram selecionadas para a construção dos *primers*. O desenho foi conduzido utilizando o programa de análise de seqüências nucleotídicas *Gene Runner* e os *primers* foram posicionados de forma a amplificarem um fragmento com aproximadamente 200 nucleotídeos, tamanho ideal para estudos de hibridação *in situ*, conforme sugerido por (Jackson, 1991) (Tab. 2).

Tabela 2: Sequência dos primers construídos para a amplificação dos genes selecionados para a hibridação *in situ*. Inclui os genes envolvidos na reciclagem de grupos metil via SAM; *pectina metiltransferase*, *glicosiltransferase* e *pectina metilesterase*. *pb*: tamanho do fragmento a ser amplificado.

Gene	Função/Referências	Primers	pb
<i>Glicosil-transferase (QUA1)</i> *	Polimerização do domínio HG (Bouton <i>et al.</i> , 2002).	F 5'-TTCTTTTACCGTTTCTCTCAG-3' R 5'-GAAGAGTACCCAATTTCCACA-3'	200
<i>Pectina metil-transferase (QUA2/TSD2)</i> **	Metil-esterificação de pectinas (Krupkova <i>et al.</i> , 2007; Mouille <i>et al.</i> , 2007)	F 5'-CGACACAGCTCCTCTAATTGAA-3' R 5'-TGAATTTGAATACCAAGAACTTT-3'	193
<i>Pectina metil-esterase (PME)</i>	Desmetilesterificação do domínio HG (Willats <i>et al.</i> , 2000).	F 5'-ATCCTGCTCAATCAACTGGTCT-3' R 5'-TTTCAATCCAACATCACCACCTC-3'	215
<i>S-adenosil-L-homocisteína hidrolase (SAHH)</i>	Hidrólise de SAH em Ado e Hcy (Moffatt and Weretilnyk, 2001).	F 5'-CTGTCACCAAGAGCAAGTTTGA-3' R 5'-CATAAGAGCCTGAAGTGCACAG-3'	215
<i>Adenosina Kinase (ADK)</i>	Fosforilação de Ado a AMP (Moffatt and Weretilnyk, 2001).	F 5'-GACTGATGATGTTGCGGAGATA-3' R 5'-AATTGTGAAAGAAAGCCTCCAA-3'	219
<i>S-adenosil-L-metionina sintase (SAMS)</i>	Converte metionina em SAM (Moffatt and Weretilnyk, 2001).	F 5'-CTGTGAAACATGCACCAAGACT-3' R 5'-GGACACCCTGGGCAATATC-3'	200
<i>Caffeic acid 3-O-Methyltransferase (CaffMt)</i>	Metilação de lignina (Boudet, 1998).	F 5'-GACCTGTTGAAAATCATGGC-3' R 5'-TTTGCAGACAGGACCAAGACTA-3'	213
<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (Accox)</i>	Converte ACC em etileno (Bleecker and Kende, 2000).	F 5'-GTCAGCAACTACCCTCCATG-3' R 5'-GGTGATCACCTCAACTTGG-3'	201

* Sequência identificada a partir do mutante *qua1* de *A. thaliana*

** Proteína hipotética. Sequência identificada a partir do mutante *qua2/tsd2* de *A. thaliana*

3.3.3. Extração de RNA de folhas de plântulas de cacau

A extração de RNA foi conduzida a partir de uma adaptação do protocolo descrito por (Azevedo *et al.*, 2003). Folhas jovens de *T. cacao* (500mg) foram maceradas e ressuspendido em 10mL de tampão de extração pré-aquecido a 42°C (100mM de Tris HCl pH 8,0; 30mM de EDTA pH 8,0; 2M NaCl; 2% CTAB (p/v); 2% PVP (p/v); 3% β-mercaptoetanol e 2mg/mL de Proteinase K). Para maior eficiência da ruptura celular foi utilizado um homogeneizador de tecidos do tipo *potter* (*Tissue Homogenizer - Thomas Scientific*). O homogeneizado foi incubado a 50°C por 45min e re-homogeneizações foram feitas a cada dez minutos. Clorofórmio e álcool isoamílico

(24:1v) foram utilizados para a precipitação dos componentes orgânicos. A fase aquosa obtida foi incubada com 1/4v de LiCl 10M a -20° C *overnight* para precipitação do RNA. A amostra foi centrifugada a 15.000g por 35 minutos a 4°C, em seguida o *pellet* foi lavado com LiCl 2M e ressuspendido em 50µL de H₂O-DEPC. Para aumentar a pureza da extração, a amostra foi aquecida a 65°C e transferida imediatamente para o gelo, de forma a precipitar polissacarídeos. Após 10 minutos a amostra foi novamente centrifugada a 18.000g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para novos tubos e estes foram armazenados a -80°C.

3.3.4. Síntese de cDNA e amplificação por PCR

2µg de RNA de folhas de cacauero foram utilizados para a transcrição reversa com *Superscript II* (Invitrogen). Foi feito um tratamento inicial com DNase (Invitrogen) para eliminar contaminação com DNA genômico. Na reação de síntese foram utilizados 0,25µg de *Oligo dT*, e 0,05µg/µL de pdN6 (*Random primer*) para aumentar a extensão das fitas sintetizadas. A partir do cDNA, a amplificação dos fragmentos foi testada utilizando os *primers* desenhados previamente.

3.3.5. Clonagem

A enzima *T4 DNA ligase* (Promega, EUA) foi utilizada na reação de ligação do produto de PCR ao vetor de clonagem pGEM[®]-T Easy (Promega, EUA). Bactérias da espécie *Escherichia coli* da linhagem DH10B foram transformadas com o vetor/inserto

por eletroporação e ressuspendidas em 1 mL de LB. Após 50 minutos a 37°C 200 µL do meio foi plaqueado em meio seletivo contendo 100mg/mL de ampicilina e 35 µl XGal (20mg/µL) para a identificação de colônias que integraram o plasmídeo contendo o inserto. A confirmação da clonagem foi feita inicialmente através da digestão do plasmídeo com a endonuclease de restrição *EcoRI* (Invitrogen) e, quando necessário, por *PCR* utilizando os *primers* específicos para cada gene.

3.3.6. Sequenciamento

O inserto de cada clone foi seqüenciado no MegaBACE™ para definir a orientação das fitas *sense* e *antisense* em relação aos sítios de iniciação das RNAs polimerase T7 e SP6. O produto de *PCR* de cada colônia foi tratado com ExoSap (USB) e utilizado na reação de sequenciamento feita de acordo com as instruções do DYEnamic™ ET dye terminator Kit (GE). As seqüências obtidas foram alinhadas com as seqüências presentes no NCBI por BLASTx e o *frame* (positivo ou negativo) de cada alinhamento foi considerada para a confirmação do sentido de cada seqüência.

Para cada clone foram montadas seis reações, três delas utilizando o *primer* pUC/M13 *forward* (para o seqüenciamento do inserto no sentido direto) e as outras três utilizando o *primer* pUC/M13 *reverse* (para o seqüenciamento do inserto no sentido reverso).

3.3.7. Linearização e transcrição *in vitro*

Para sintetizar as sondas por transcrição *in vitro*, os plasmídeos foram linearizados com enzimas de restrição apropriadas, possuindo apenas um sítio de restrição *upstream* ou *downstream* ao sítio de clonagem do vetor. As enzimas *Sall* (Fermentas); *NcoI* (Fermentas) e *ApaI* (GIBco) foram selecionadas para a linearização *upstream* e *downstream* respectivamente (Fig 7).

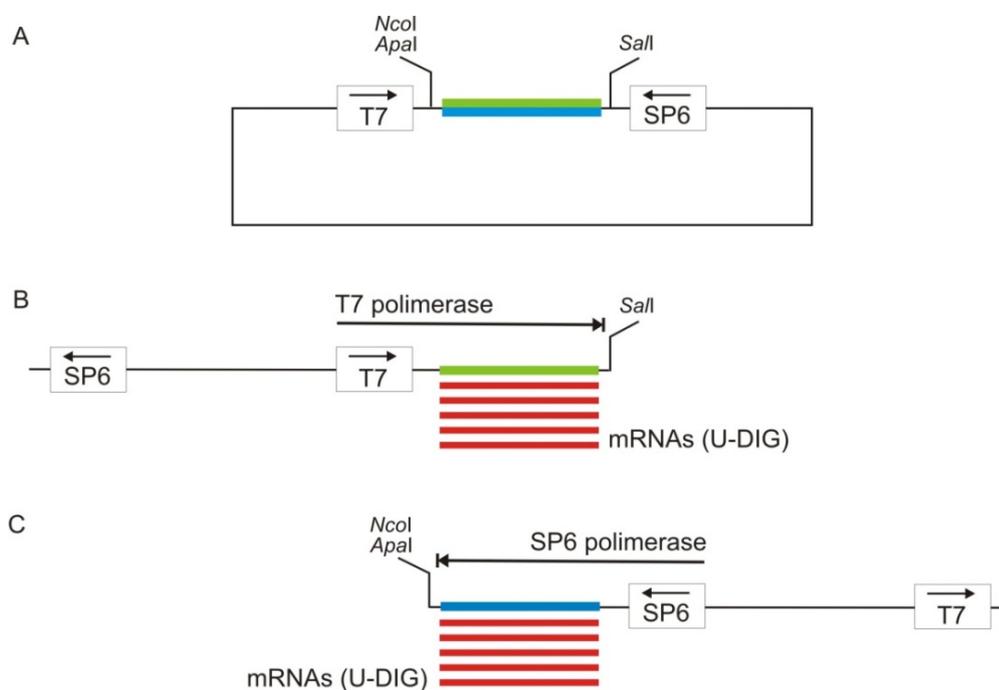


Figura 7: Metodologia utilizada para a linearização dos vetores e síntese das sondas. A) Representação esquemática do vetor de clonagem pGEM[®]-T Easy destacando os sítios de restrição para as enzimas *NcoI*, *ApaI* e *Sall*; e promotores para as RNAs polimerase T7 e SP6. **B)** Linearização com *Sall* para a transcrição do inserto no sentido direto com T7. **C)** Linearização com *NcoI* ou *ApaI* para a transcrição da fita complementar (sentido reverso) do inserto com SP6. *Setas*: sentido da transcrição; *caixa verde e azul*: DNA dupla fita.

Para a transcrição, foi utilizado o DIG RNA *labeling kit* (SP6/T7) (Roche). Com as RNAs polimerases T7 e SP6 sintetiza-se *in vitro* sondas de RNAs contendo uracilas marcadas com digoxigenina (DIG-UTP). Este sistema permite a detecção do sinal a partir da atividade da fosfatase alcalina associada a anticorpos Anti-DIG (Roche) aplicados pós-hibridação. Após a síntese, as sondas foram tratadas com DNase, precipitadas e ressuspendidas em 50 μ L de formamida 50%.

3.3.8. Hibridação *in situ*

Pré-hibridação

Lâminas contendo secções do ápice e do caule de amostras coletadas 14, 42 e 63 DAI foram mantidas 2x por 10 minutos em Xilol PA (Synth) para remoção do Paraplast utilizado na inclusão das amostras. Em seguida, o material foi hidratado em uma série crescente de etanol. Após, as lâminas foram mantidas por 15 minutos em HCl (0,2 M) e em seguida lavado com água tratada com DEPC. Para quebrar ligações peptídicas e aumentar a permeabilidade dos tecidos aumentando assim a exposição dos ácidos nucleicos às sondas, as lâminas foram incubadas por 30 minutos a 37°C em tampão de digestão contendo Proteinase K (100mM Tris HCl pH 8,0; 50mM EDTA; 1 μ g/mL Proteinase K). Em seguida, lâminas foram lavadas com solução de PBS 1X (1.3 M NaCl; 70mM Na₂HPO₄; 30 mM NaH₂PO₄) e, em seguida, incubadas por 2 minutos em PBS/Glicina (0,2% Glicina (p/v) 1X PBS) para bloquear a atividade da Proteinase. Novamente o material foi lavado em 1X PBS e novamente fixados em Paraformaldeído:PBS (Paraformaldeído 4% (p/v); 1X PBS). Duas novas lavagens em

1X PBS antecederam a incubação de 30 minutos em TEA (0,1M Trietanolamina; 0,1% Anidrido Acético [v/v]), importante para neutralizar íons livre e prevenir hibridações inespecíficas. Após o passo de neutralização, as lâminas foram lavadas 2x por 2 minutos em 1X PBS e finalmente desidratadas em uma série crescente de etanol. Depois de completamente secas as lâminas foram utilizadas na hibridação.

A solução de hibridação (50% Formamida; 10% Dextran-Sulfato; 1X Solução de Denhardt; 100µg/mL tRNA [pré-aquecido a 85°C]; 300mM NaCl; 10mM TRIS-HCl pH 7.5; 1mM EDTA pH 8,0; 10 mM Tampão Fosfato pH 6,8) foi preparada e pré-aquecida a 55°C. Um volume equivalente a 500ng (ideal para marcação de genes medianamente expressos) das sondas *sense* e *antisense* específicas para cada gene foi pré-aquecido a 55°C e adicionado à solução de hibridação.

Aplicação da sonda

Além de serem eletricamente carregadas, o que evita que os cortes desprendam da lâmina durante o tratamento com Proteinase K, as lâminas ProbeOn plus também permitem que a aplicação de soluções diretamente sobre os cortes seja feita aos pares (tipo *sandwich*), reduzindo pela metade a quantidade de solução e sonda a serem aplicados. Assim, as lâminas dos diferentes pontos de coleta que foram hibridadas com a mesma sonda foram agrupadas aos pares. 200µL de solução de hibridação/sonda foram aplicados em cada *sandwich* e estes foram incubados por aproximadamente 14-16 horas (*overnight*) a 55°C.

Pós-hibridação

Após o tempo necessário para a hibridação, as lâminas foram mantidas por aproximadamente 2 horas a 55°C em 0,2X SSC (3M NaCl; 300mM NaCitrate) sob leve agitação até todos os *sandwiches* serem desfeitos. Após essa etapa, as lâminas foram incubadas duas vezes por uma hora em nova solução de 0,2X SSC e em seguida lavadas duas vezes por 5 minutos em 1X TBS (1,0M Tris HCl; 1,5M NaCl). Após essas lavagens, as lâminas foram mantidas em tampão de bloqueio (Tampão Maleato pH 7,5 [0,1M Maleato; 0,15M NaCl]; 10% *Blocking Reagent* (p/v) [Roche]), passo importante em hibridações não-radioativas para diminuir o *background* da marcação. Após o bloqueio, as lâminas foram lavadas em 1X TBS.

Para visualizar o resultado da hibridação foi utilizado um anticorpo anti-DIG conjugado com fosfatase alcalina (*Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments*; Roche). Anti-DIG foi diluído 500 vezes em 0,5% (p/v) de BSA e 1X TBS e, então, 180µL da solução contendo o anticorpo foram aplicados em cada *sandwich*. As lâminas permaneceram incubadas com o anticorpo por 2 horas. Em seguida os *sandwiches* foram desfeitos em 1X TBS e todas as lâminas foram lavadas três vezes em 1X TBS por 2 minutos cada. Após essas lavagens as amostras foram incubadas por 10 minutos em tampão de detecção (0,1M Tris pH 9,5; 0,1M NaCl; 0,05M MgCl₂) e depois de secas foram aplicados 150µL de BCIP/NBT (Sigma) em cada lâmina. As lâminas foram temporariamente montadas com lamínulas e mantidas no escuro por 3 dias para revelação do sinal. Microscópio óptico (Olympus BX51) foi utilizado para a análise do

material, e os resultados foram registrados por câmera fotográfica digital acoplada ao mesmo.

3.4. Procedimentos para os ensaios de imunolocalização

Para os ensaios de imunolocalização foram empregados procedimentos adaptados a partir de protocolos descritos por Beltz e Burd (1989); Buckeridge e Reid (1994); Freud (1970); Orfila e Knox (2000); Richter (1981) e; Tonini e colaboradores (2006).

A seleção dos anticorpos primários a serem utilizados foi baseada na literatura. Para identificação de resíduos de ácido galacturônico (GalA) não metilesterificados foi selecionado o anticorpo monoclonal JIM5 (PlantProbe – Leeds), que reconhece pelo menos 4 e idealmente mais resíduos de GalA não metilesterificados. Para a detecção de resíduos de ácido galacturônico (GalA) metilesterificados foi utilizado o anticorpo JIM7 (PlantProbe – Leeds), o qual reconhece 3 ou 4 grupos metilester contínuos (Knox *et al.*, 1990, Willats *et al.*, 2000a).

As lâminas selecionadas para a imunolocalização, contendo secções com 10-12µm do caule e do ápice de amostras coletas 14 e 42 DAI, foram hidratadas e incubadas em solução de bloqueio contendo 3% de leite integral em tampão fosfato de potássio salino (KPBS) 0,01 M pH 7,1S por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, após lavagem com KPBS, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários (JIM5 e JIM7), diluídos 1:5 vezes em PBS, por 3 horas. As secções foram novamente lavadas com KPBS por três vezes por 5 minutos cada. Para visualização da

ligação dos anticorpos aos seus epítomos específicos, foi realizada incubação com anticorpo secundário (anti-rato) conjugado com a fluoresceína FITC, durante 1h, no escuro, a temperatura ambiente. As lâminas foram montadas em PBS e imediatamente observadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX51) para a análise do material. Os resultados relevantes foram registrados por câmera fotográfica digital acoplada ao microscópio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um passo imprescindível para a síntese das sondas para a hibridação *in situ* foi a obtenção de RNA total. Em plantas, mas mais proeminentemente em *T. cacao*, a extração de RNA é dificultada pela alta concentração de carboidratos que compõem a mucilagem e a parede celular. Três métodos de obtenção de RNA de tecidos ricos em carboidratos foram testados para a extração de RNA de folha e caule de *T. cacao*. Em dois deles, Asif e colaboradores (2000) e Chaidamsari (2005), a quantidade de RNA isolada foi muito baixa, provavelmente pela ineficiência na quebra da parede celular durante a maceração, diminuindo o acesso do tampão de extração ao RNA intracelular favorecendo sua degradação (dados não apresentados).

O terceiro método, uma adaptação do protocolo descrito por Azevedo e colaboradores (2003), apresentou resultados satisfatórios. Os pontos considerados essenciais à obtenção de RNA de boa qualidade foram: 1) maceração em nitrogênio líquido seguida por ressuspensão em tampão de extração utilizando homogeneizador de tecidos do tipo *potter* (*Tissue Homogenizer - Thomas Scientific*) e; 2) a utilização de proteinase K na composição do tampão de extração. O resultado é apresentado na figura 8a.

Este RNA foi utilizado para isolar os genes de interesse ao presente estudo. Após a transcrição reversa, o cDNA sintetizado foi utilizado como molde para a amplificação dos genes usando pares de *primers* gene-específicos. A Figura 8b apresenta os resultados da amplificação.

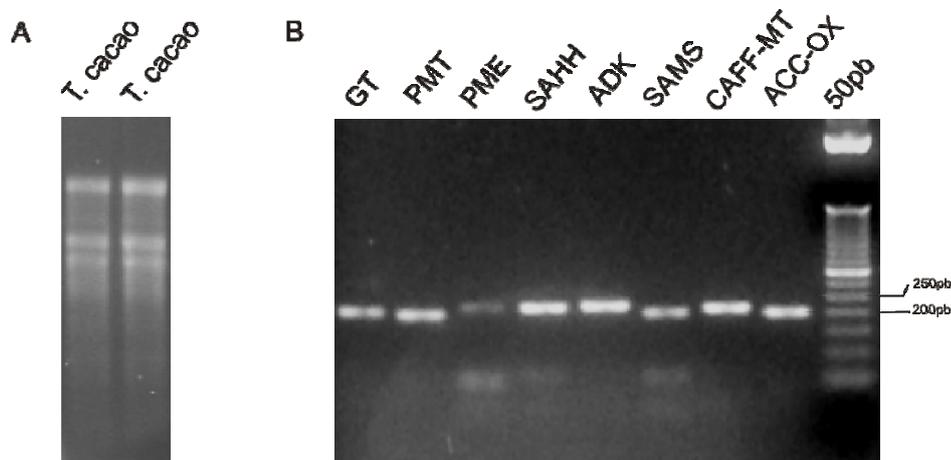


Figura 8: Extração de RNA e amplificação por PCR. A) Gel desnaturante de agarose para verificação da qualidade e integridade do RNA total obtido de folhas de *Theobroma cacao*. B) Gel de agarose 2% para verificar a amplificação das seqüências em estudos através dos *primers* desenhados a partir de *ESTs* de *T. cacao*.

Caffeic acid 3-O-Methyltransferase (CAFF-MT) e *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase* (ACC-OX) são enzimas que usam SAM direta ou indiretamente. Elas catalisam, respectivamente, a metilesterificação de lignina e a reação final pra síntese de etileno. Devido às implicações da lignificação da parede celular e dos efeitos do etileno no desenvolvimento da Vassoura-de-bruxa (Scarpari *et al.*, 2005), estes dois genes foram incluídos no trabalho para análises futuras.

O plasmídeo pGEM[®]-T Easy foi utilizado na clonagem dos fragmentos de cada gene uma vez que, além de ser um sistema apropriado para a clonagem de produtos de *PCR*, a presença do sítio de iniciação das RNAs polimerase T7 e SP6 flanqueando o sítio de clonagem permite a transcrição *in vitro* do inserto no sentido direto e reverso, possibilitando assim, a síntese de sondas *sense* e *antisense* da seqüência clonada.

A partir da digestão com a enzima de restrição *EcoRI* e posterior análise do tamanho das bandas formadas, foi confirmado a clonagem de todas as seqüências

exceto a dos genes *PME* (ausência do inserto) e *ADK* (tamanho da banda menor do que o esperado) (Fig. 9a). Uma análise detalhada da seqüência de *ADK* (região da *EST* que foi amplificada) apontou uma região (GATTTC) semelhante ao palíndromo reconhecido pela *EcoRI* (GAATTC). É possível que durante a *PCR* possa ter ocorrido a substituição de uma timina por uma adenina, gerando um sítio de restrição *EcoRI* na seqüência amplificada e, assim, um fragmento de aproximadamente 180pb (e não o esperado de 219) após a digestão. Novas colônias de *PME* e *ADK* foram selecionadas. Por fim, a clonagem *PME* e *ADK* foi confirmada por *PCR* de colônia (Fig. 9b) e por *PCR* do plasmídeo (Fig. 9c).

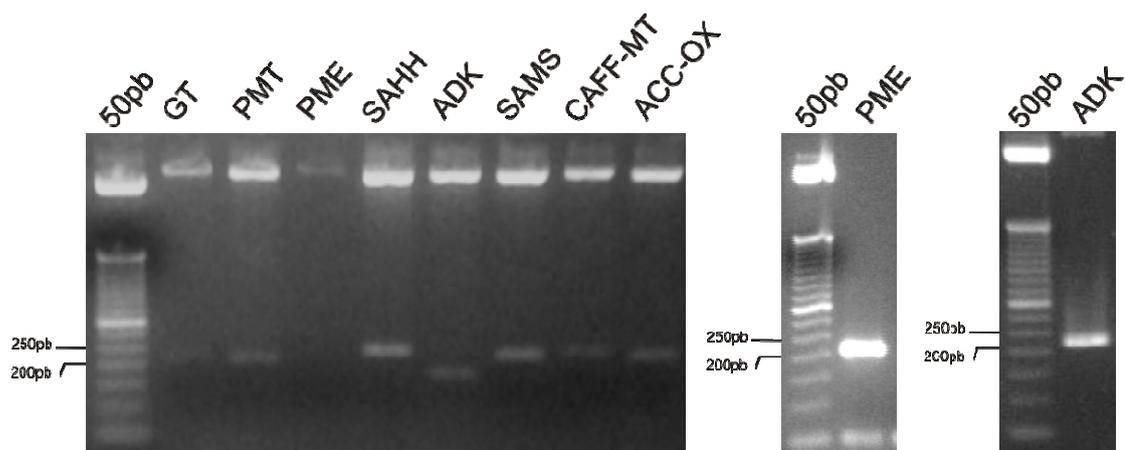


Figura 9: Confirmação da clonagem. **A)** gel de agarose para a confirmação da clonagem por digestão com *EcoRI*. **B)** resultado da *PCR* de colônia para o clone *PME* e **C)** *PCR* utilizando como molde o plasmídeo contendo o inserto referente ao gene *ADK*.

Após a confirmação da presença dos insertos, a orientação destes em relação ao sítio de clonagem foi analisada através do sequenciamento. Nesta etapa, o objetivo foi mapear a direção das fitas *sense* e *antisense*. As seqüências, *forward* e *reverse*, de melhor qualidade de cada clone foram selecionadas e alinhadas por BLASTx. *Frame* positivo para as seqüências derivadas da reação de sequenciamento com pUC/M13

forward indica que a sequência analisada é a *sense*. No mesmo caso, o *frame* negativo indica que a fita é *antisense*. O contrário vale para as sequências resultantes do sequenciamento com *primer* pUC/M13 *reverse*.

Somente após a verificação da disposição do inserto foi possível deduzir quais sondas seriam sintetizadas com T7 (transcrição do inserto no sentido direto) e com SP6 (transcrição do inserto no sentido reverso) (Tab. 3) O passo seguinte foi definir as enzimas de restrição utilizadas para a linearização do plasmídeo. Para a transcrição com T7 e SP6 é necessário que as enzimas tenham apenas um sítio de clivagem *upstream* e *downstream* ao sítio de clonagem respectivamente. Todas as sequências foram analisadas através da ferramenta *online* WebCutter 2.0 ([HTTP://rna.lundberg.gu.se/cutter2/](http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/)) e a partir desta análise as enzimas que apresentaram sítios de restrição na sequência clonada foram excluídas (resultado não apresentado). Para a transcrição *in vitro* é importante também evitar o emprego de enzimas de restrição com clivagens que gerem extremidades 3' *overhang*, pois esta extremidade pode ser reconhecida como um *primer* pela RNA polimerase comprometendo a síntese da sonda. Considerando esses três fatores a enzima *Sall* foi selecionada para a restrição *upstream* e as endonucleases *Apal* (apenas para *PME*) e *NcoI* para a clivagem *downstream*. A exceção para *PME* foi devido a presença de um sítio de restrição de *NcoI*.

Sondas *sense* e *antisense* foram sintetizadas utilizando como molde os fragmentos clonados referentes aos genes *GT*, *PMT*, *PME*, *SAHH*, *ADK* e *SAMS*. Para verificar a integridade das sondas, 5 μ L de cada uma foram aplicados em gel

desnaturante. Todas as sondas apresentaram o tamanho esperado de aproximadamente 350 ribonucleotídeos, considerando nesse caso, o tamanho do inserto e posição dos promotores T7 e SP6 (Fig. 10).

Tabela 3: Confirmação da orientação do inserto em relação ao sítio de clonagem do vetor. S: fita sense; AS: fita antisense; F: primer puc/M13 forward; R: primer puc/M13 reverse.

Gene	Primer* (pUC/M13)	Frame (BLASTx)	RNA polimerase	Fita transcrita
GT	F	+	T7	S
	R	-	SP6	AS
PMT	F	+	T7	S
	R	-	SP6	AS
PME	F	-	T7	AS
	R	+	SP6	S
SAHH	F	-	T7	AS
	R	+	SP6	S
ADK	F	+	T7	S
	R	-	SP6	AS
SAMS	F	-	T7	AS
	R	+	SP6	S
CAFF-MT	F	-	T7	AS
	R	+	SP6	S
ACC-OX	F	+	T7	S
	R	-	SP6	AS

*Primers utilizados na reação de sequenciamento.

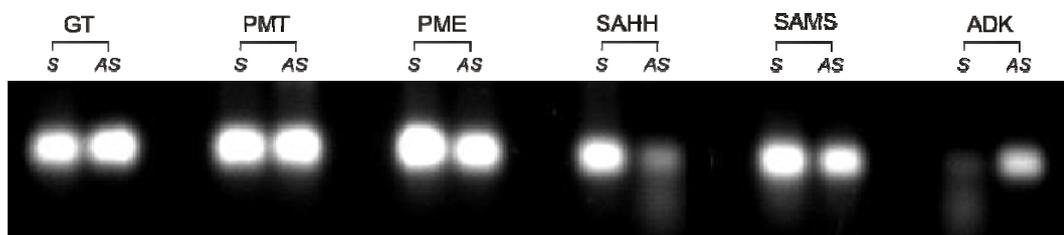


Figura 10: Sondas sintetizadas por transcrição *in vitro*. Gel desnaturante de agarose para verificação da integridade das sondas utilizadas na hibridação. S: sonda sense; AS: sonda antisense.

Cada par de sondas foi utilizado na hibridação *in situ* de amostras de *T. cacao* sadio e infectado, sendo a sonda *sense* utilizada sempre como controle da sonda *antisense*. A ocorrência do sinal cor púrpura representa a presença de transcritos do gene estudado indicando indiretamente a expressão do mesmo. Lâminas contendo cortes do ápice e do caule de amostras coletadas 14, 42 e 63 DAI foram hibridadas independentemente com as sondas S e AS previamente sintetizadas, entretanto, o sinal foi detectado apenas na hibridação dos genes *SAMS* e *PMT* de amostras coletadas 14 e 42 DAI, e estes resultados são apresentados e discutidos a seguir.

Transcritos de SAMS e PMT foram diferentemente detectados em plântulas sadias e infectadas:

Transcritos do gene *SAMS* foram amplamente detectados nas amostras de plântulas sadias e infectadas (Figuras 11 e 12). A distribuição do sinal cor púrpura que indica indiretamente a expressão desse gene foi bastante similar entre as amostras, ocorrendo nos tecidos do ápice vegetativo e do caule. Nas secções do ápice, a marcação foi evidenciada nas células do procâmbio e do meristema fundamental. Entre os tecidos do caule, transcritos foram detectados nas células parenquimáticas da medula e do córtex, nas fibras e no xilema. A detecção de transcritos de *SAMS* em diversos tecidos é esperada, uma vez que a expressão deste gene é considerada constitutiva (Tabor and Tabor, 1984) e necessária para catalisar a síntese de SAM, um composto essencial para as células vivas, que atua como fonte de grupos metil para as

reações de transmetilação e como precursor para a síntese de etileno e poliaminas (Fontecave *et al.*, 2004; Moffatt and Weretilnyk, 2001; Roje, 2006).

A intensidade do sinal detectado variou de acordo com os tecidos nas diferentes amostras. Nas plântulas não inoculadas coletadas 14 DAI, a intensidade do sinal foi maior nos tecidos meristemáticos e no xilema (Fig. 11b e k) em comparação com a marcação observada nas células da medula e do córtex (Fig. 11h e n). De forma similar, nas amostras de ambos os tratamentos coletadas 42 DAI a detecção de transcritos foi maior nos tecidos meristemáticos do que no caule (Fig. 12). Apenas nas plântulas inoculadas coletadas 14 DAI a intensidade do sinal foi semelhante entre os tecidos do ápice e do caule (Fig. 11).

De uma forma geral, estes resultados sugerem uma maior necessidade de SAM durante o período inicial de desenvolvimento da plântula e, posteriormente, durante a formação e estabelecimento do tecido vascular. Nos tecidos meristemáticos, onde há uma alta taxa de atividade celular, é presumível que SAM precise estar disponível em maiores concentrações para que as reações dependentes de SAM, como a metilesterificação de componentes da parede celular, ácidos nucleicos e proteínas, ocorram de acordo com as exigências do tecido. No tecido vascular, é possível que a maior disponibilidade de SAM observada nas plântulas de cacau esteja relacionada com a lignificação dos elementos de vaso do xilema.

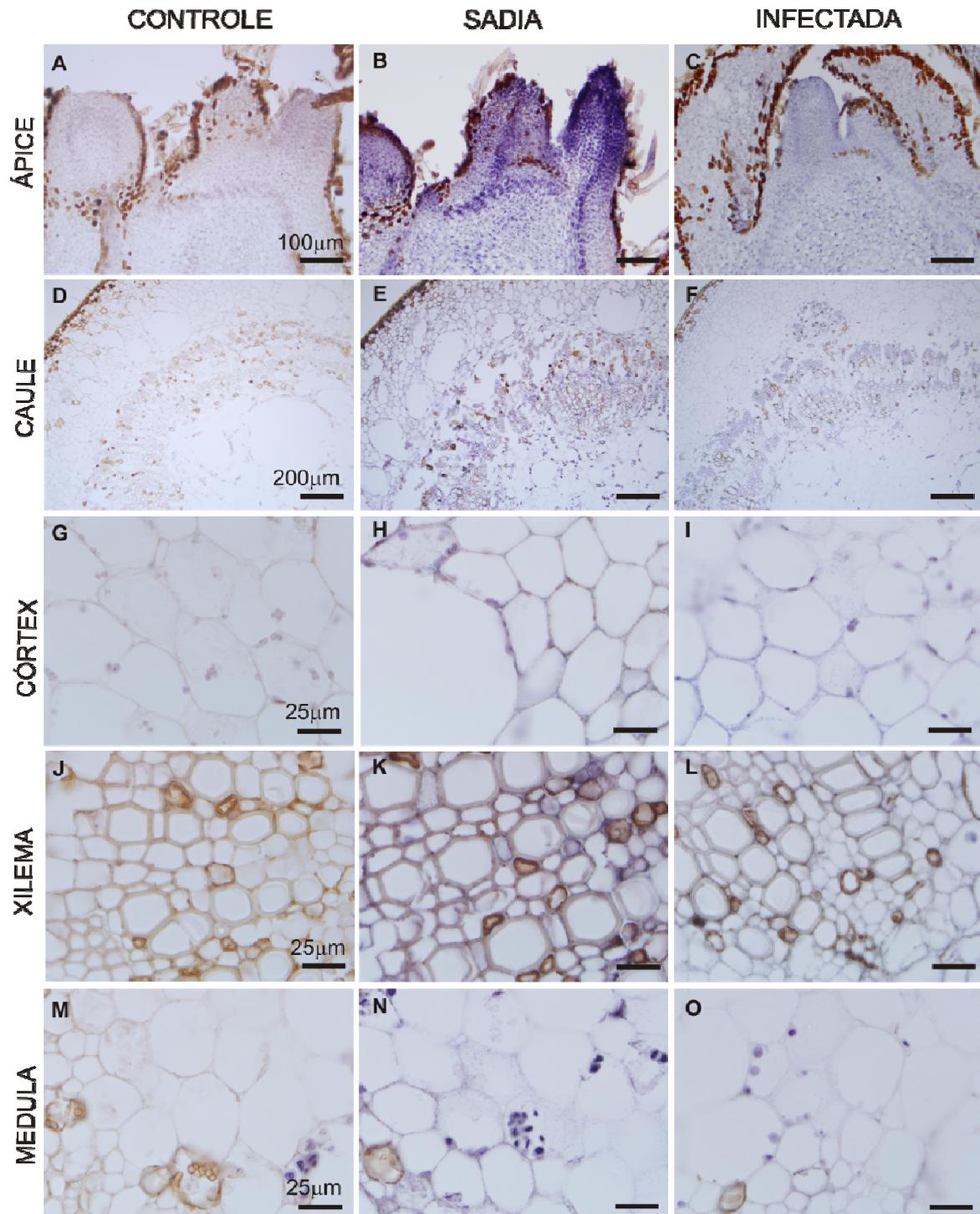


Figura 11: Hibridação *in situ* do gene *SAMS*. Amostras de *T. cacao* sadias e infectadas com *M. pernicioso* coletadas 14 DAI. **A-C)** secções longitudinais do ápice vegetativo. **D-O)** secções transversais do caule na região próxima ao ponto de infecção. O precipitado púrpuro indica a detecção de transcritos de *SAMS*. **CONTROLE:** Hibridação com a sonda *SAMS sense*.

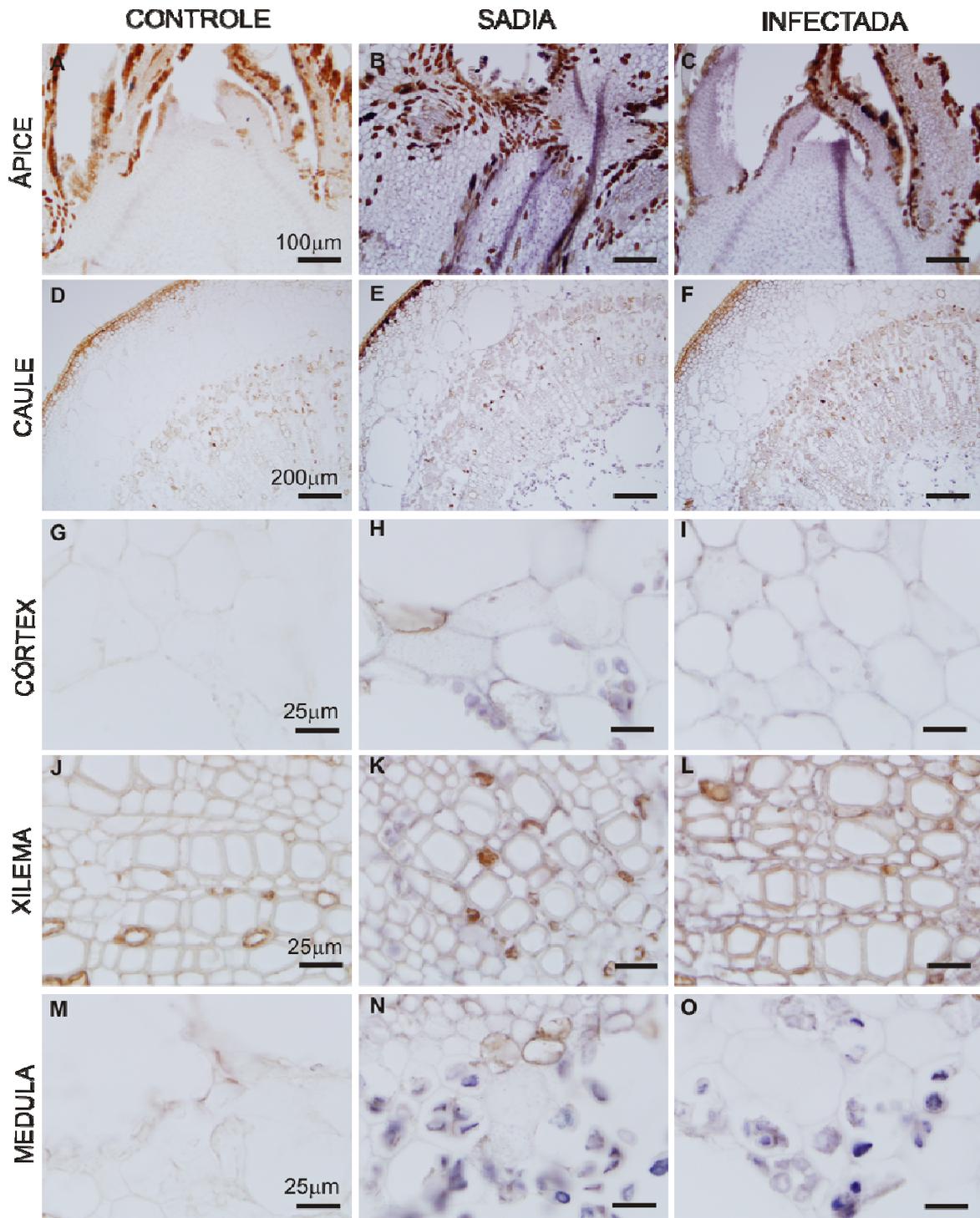


Figura 12: Hibridação *in situ* do gene *SAMS*. Amostras de *T. cacao* sadias e infectadas com *M. pernicioso* coletadas 42 DAi. **A-C)** secções longitudinais do ápice vegetativo. **D-O)** secções transversais do caule na região próxima ao ponto de infecção. O precipitado púrpuro indica a detecção de transcritos de *SAMS*. CONTROLE: Hibridação com a sonda *SAMS sense*.

Embora seja considerado um gene constitutivo, alguns trabalhos demonstraram que *SAMS* é preferencialmente expresso em alguns tecidos. Peleman e colaboradores (1989) demonstraram que a isoforma *sam-1* é 10 a 20 vezes mais expressa no caule e na raiz de *Arabidopsis* quando comparado com folhas, inflorescências e semente. Além disso, por análise histológica, demonstraram que plantas transgênicas expressando a construção *sam-1:β-glucuronidase* (GUS) apresentaram uma alta atividade de GUS nos tecidos que sofrem lignificação.

Em outro estudo, a mutação do gene *SAMS3* de *Arabidopsis*, o qual é também preferencialmente expresso nos tecidos vasculares, provocou uma alta redução na concentração de SAM, um aumento na concentração de metionina livre e, interessante, uma redução do conteúdo de lignina nessas plantas, aumentando os indícios da importância de *SAMS* na biossíntese de lignina (Wei *et al.*, 2004).

Quando as amostras dos dois grupos analisados neste trabalho são comparadas entre si, é interessante notar que a intensidade do sinal varia também entre plântulas de cacau saudáveis e infectadas com *M. perniciosus*. Embora de forma indireta, tais observações sugerem que a expressão *SAMS* é diferencialmente regulada em resposta à infecção. Com 14DAI, a intensidade do sinal detectado no ápice e no xilema das amostras não inoculadas é consideravelmente maior do que nos mesmos tecidos nas amostras inoculadas (Fig. 11b-c; k-l). Nas células da medula e do córtex, embora a diferença seja menos expressiva, o sinal é também mais intenso nas amostras não inoculadas quando comparado com as inoculadas (Fig. 11h-i; n-o). Com 42 DAI amostras não inoculadas e inoculadas apresentaram praticamente a mesma intensidade de marcação nos tecidos analisados (Fig. 12).

Alguns trabalhos descrevem que a expressão de *SAMS* é induzida em resposta a estresses abióticos, como estresse salino (Tabuchi *et al.*, 2005) e bióticos, como o tratamento de cultura de células com elicitores fúngicos, ativando neste caso, a resposta de defesa das células (Edwards, 1996; Kawalleck *et al.*, 1992). Recentemente, Bhuiyan e colaboradores (2007) demonstraram que em Trigo (*Triticum monococcum*) inoculado com o fungo *Blumeria graminis* f. sp. tritici (*Bgt*), a expressão dos genes que codificam *SAMS*, *SAHH*, Metionina Sintetase e 5,10-metilno-tetrahydrofolato redutase foi altamente induzida no início da infecção. A indução ocorreu de forma específica em células da epiderme (tecido preferencialmente colonizado pelo patógeno) e foi diretamente relacionada com a formação de parede celular de aposição, sugerindo que as vias para geração de SAM são transcricionalmente reguladas para as respostas de defesa. Neste mesmo trabalho, os autores demonstraram que os níveis transcritos de *SAM decarboxilase*, *ACC oxidase*, *Caffeic acid 3-O-metiltransferase* foram aumentados após a infecção e mostraram um padrão de expressão similar ao dos genes envolvidos nas vias de síntese de SAM, revelando possíveis fontes de transferência de grupos metil preferencialmente em direção a biossíntese de poliaminas, lignina e etileno. Isso sugere que gerar quantidades suficientes de SAM no estágio inicial da doença é crucial para a atenuação de múltiplos estresses.

Embora as premissas direcionem as hipóteses para uma esperada indução da expressão de *SAMS* nas amostras de plântulas inoculadas com *M. perniciosa*, os resultados obtidos mostraram, de forma indireta, que na fase considerada inicial da doença, ou fase de estabelecimento da infecção, não há indução da expressão de *SAMS*. Aos 14DAI, as plântulas infectadas pelo fungo ainda não demonstram nenhum

sintoma estrutural da doença e não há também sinais de resposta hipersensitiva (HR), indicando que provavelmente no início da doença o fungo seja capaz de infectar a planta silenciosamente, sem ativar os sistemas de defesa desta. Por outro lado, a maior expressão de *SAMS* durante a infecção por patógenos (Bhuiyan *et al.*, 2007) ou sua ativação por elicitores fúngicos, observada por Edwards (1996) e Kawalleck e colaboradores (1992), ocorreu no intervalo de apenas algumas horas após o início dos tratamentos. Assim, a análise detalhada da expressão gênica de plântulas infectadas por *M. perniciosus* imediatamente após a inoculação dos esporos e durante algumas horas subsequentes é necessária para elucidar a dinâmica da expressão de *SAMS* em relação ao estabelecimento da doença vassoura de bruxa.

Na hibridação *in situ* do gene *Pectina Metiltransferase (PMT)*, transcritos foram detectados apenas nos tecidos do ápice vegetativo (Fig. 13). A detecção do sinal em tecidos meristemáticos condiz com os resultados apresentados por Krupkova e colaboradores (2007), onde foi demonstrado pela expressão do gene repórter *GUS*, que a expressão da *Pectina Metiltransferase* predita por eles é principalmente detectada no meristema caulinar de plantas jovens.

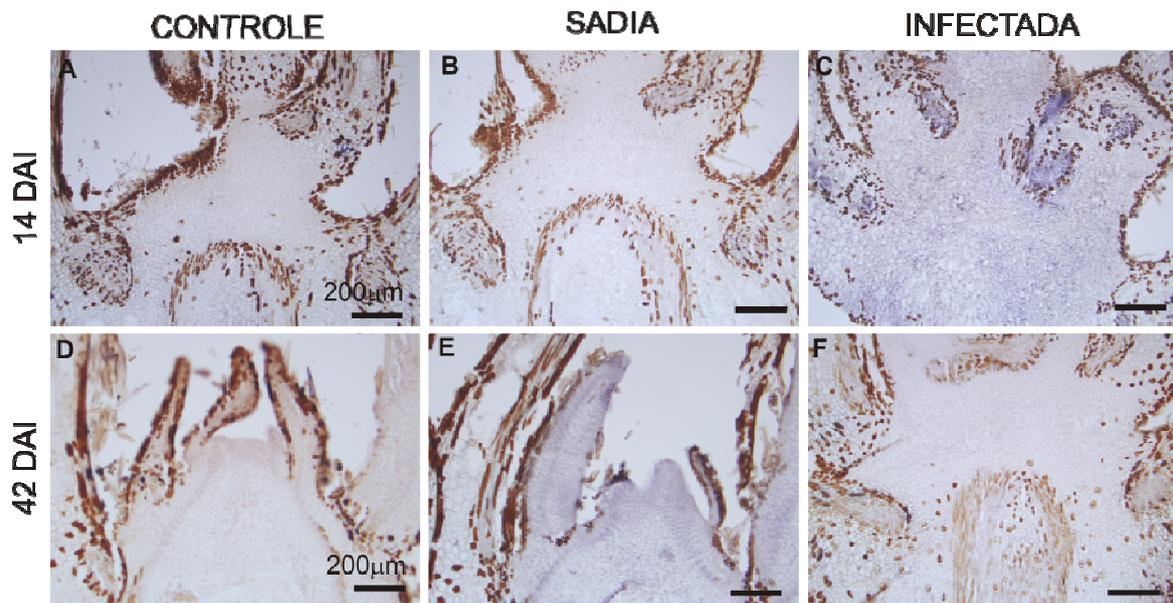


Figura 13: Hibridação *in situ* do gene *PMT*. Secções longitudinais do ápice vegetativo de amostras de *T. cacao* saudáveis e infectadas com *M. pernicioso*. **A-C)** amostras coletadas 14 DAI. **E-F)** secções longitudinais do ápice vegetativo. O precipitado púrpuro indica a detecção de transcritos de *PMT*. . CONTROLE: Hibridação com a sonda *PMT sense*.

Em plantas superiores, a parede celular proporciona sustentação mecânica, define a forma celular, participa da comunicação intercelular e protege de ataques por patógenos (Persson *et al.*, 2007). O grau de metilesterificações e desmetilesterificações do Homogalacturonano, o principal polissacarídeo péctico encontrado na parede celular primária, influencia a formação de géis pécticos e altera as propriedades de adesão da parede (Willats *et al.*, 2002). A enzima *Pectina Metiltransferase*, a qual possui a sequência gênica hipotética predita através do estudo de dois mutantes de *Arabidopsis* com distúrbios no desenvolvimento (*tsd2* e *qua2*), é responsável pela adição de grupos metil aos resíduos de ácido galacturônico (GalA) durante a síntese de pectinas. Com esse estudo, os autores demonstraram que a atividade deste gene é essencial para um desenvolvimento coordenado em

Arabidopsis, uma vez que os mutantes para esse gene apresentam deformidades estruturais (Frank *et al.*, 2002; Krupkova *et al.*, 2007; Mouille *et al.*, 2007).

A ocorrência do sinal referente à expressão indireta de *PMT* foi diferente entre as amostras obtidas de plântulas de cacau inoculadas e não inoculadas por *M. pernicioso*. Nas amostras coletadas 14 DAI, transcritos de *PMT* foram detectados apenas nas plântulas infectadas (Fig. 13a-c), enquanto nas amostras coletadas 42 DAI, a detecção do sinal foi inversa, ocorrendo apenas nas não-infectadas (Fig. 13d-e).

Em alguns casos de plântulas de cacau infectadas por *M. pernicioso*, passados apenas 14 dias após a inoculação, é possível identificar o início do aparecimento de um intumescimento discreto do ramo infectado (Fig. 6b). Esse intumescimento seria resultado da hipertrofia e hiperplasia celular causada em resposta à presença do patógeno (Evans and Bastos, 1979). Neste período, a detecção de transcritos de *PMT* apenas em plântulas infectadas sugere que a atividade desse gene pode estar relacionada com o início do desenvolvimento do sintoma observado, devido a uma maior demanda de síntese de pectina para compor a parede celular em formação durante a expansão e proliferação celular da região sintomática.

Com 42 DAI, plântulas infectadas apresentam de forma expressiva os sintomas de hipertrofia e/ou hiperplasia onde os ramos infectados já são considerados vassouras verdes (Fig. 6d). É importante notar que nesse período também há atividade de *PMT*, representada pelo sinal detectado nas amostras não inoculadas. Provavelmente neste período, a expressão de *PMT* é induzida em plântulas sadias, considerando a ausência de sinal nas coletadas 14 DAI. Considerando que: 1) não há variação na expressão de *SAMS* nesse período, indicada pela similaridade da intensidade do sinal detectado em

ambas as amostras (Fig. 12b-c); 2) sob condições estressantes, como em uma infecção por patógenos, a indução de SAMS (não observada) é essencial para suprir a exigência de SAM utilizado como precursor para a síntese de compostos de defesa; 3) durante períodos em que há limitações de SAM, as células vegetais priorizam o uso de grupos metil (Moffatt and Weretilnyk, 2001); os resultados sugerem que nessa etapa da infecção, SAM disponível estaria preferencialmente sendo utilizado como precursor de outros compostos e não para a metilesterificação de pectinas. A exemplo disso, Scarpari e colaboradores (2005) demonstraram em um experimento similar, que plântulas de *T. cacao* infectadas por *M. perniciosa* apresentaram um aumento significativo na síntese de etileno entre 21 e 61 DAI.

O grau de metilesterificação de HG é alterado durante a progressão da VB:

Os anticorpos monoclonais JIM5 e JIM7 foram utilizados para caracterizar o grau de metilesterificação do domínio péptico homogalacturonano (HG) em plântulas saudáveis e infectadas. JIM5 liga-se a epítomos de HG parcialmente metilesterificados e resíduos de ácido galacturônico (GalA) não metilesterificados, indicando um grau de metilesterificação entre 0 e 40%. Enquanto JIM7 liga-se a epítomos de HG parcialmente metilesterificados e reconhece resíduos de GalA metilesterificados contínuos, indicando um grau de metilesterificação de 15 a 80% (Orfila and Knox, 2000; Willats *et al.*, 2000).

A ligação de JIM5 e JIM7 foi detectada nos tecidos do meristema vegetativo e do caule em ambos os grupos de plântulas saudáveis e infectadas, porém, a afinidade por

JIM5 ou JIM7 nas células da medula, tecido preferencialmente colonizado pelo fungo, revelou um padrão distinto de metilesterificação de homogalacturonano neste tecido.

Nas amostras coletadas 14 DAI, a ligação de JIM5 não foi detectada em ambas as amostras sadias e infectadas. Entretanto, GalA metilesterificados foram fortemente reconhecidos por JIM7 ao longo de toda a parede celular das células da medula nas duas amostras (Fig. 14a-b; e-f). Homogalacturonano com um grau de metilesterificação de 15 a 40% é reconhecido inespecificamente por JIM5 e JIM7. Dessa forma, a ligação apenas de JIM7 indica que em plântulas sadias e infectadas coletadas 14 DAI, o homogalacturonano encontra-se altamente metilesterificado.

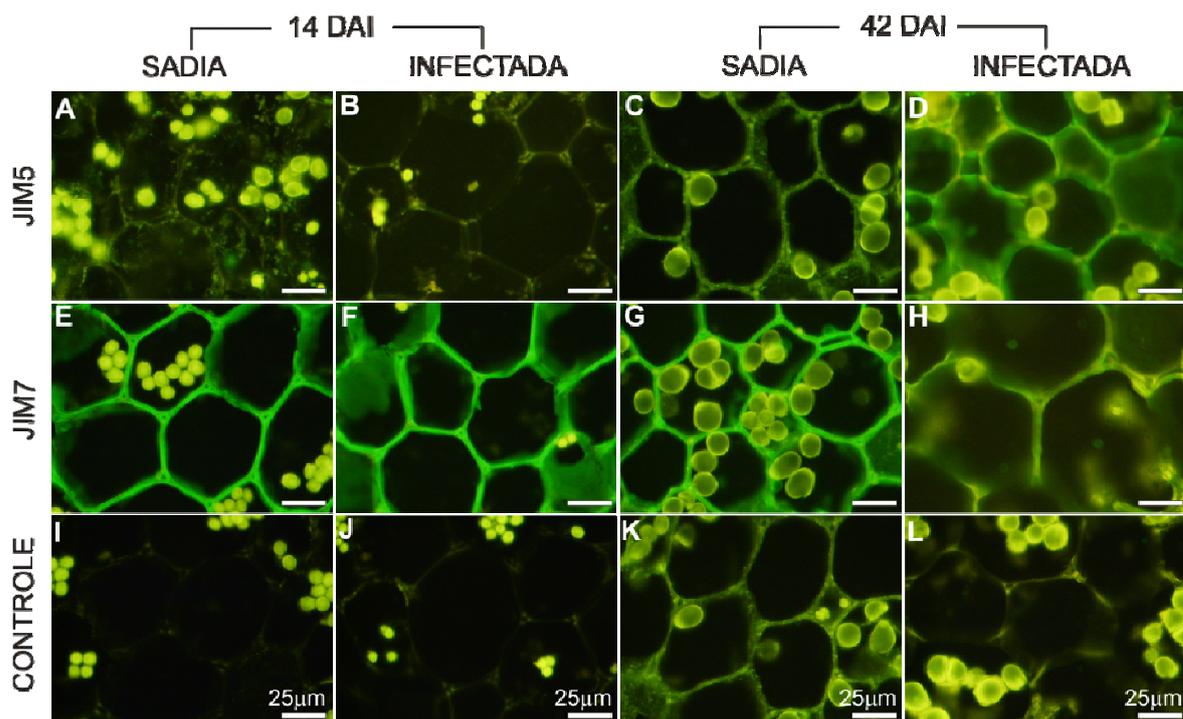


Figura 14: Imunolocalização de diferentes epítomos de Homogalacturonano. Tecido medular em secções transversais do caule próximas ao ponto de inoculação. Amostras de *T. cacao* sadias e infectadas coletadas 14 (A-B, E-F, I e J) e 42 DAI (C-D,F,H,K e L). **JIM5:** reconhece resíduos de GalA não metilesterificados enquanto **JIM7** liga-se a resíduos de GalA metilesterificados.

Homogalacturonano é depositado na parede celular sob uma forma altamente metilesterificada e, subsequentemente, resíduos de GalA são coordenadamente desmetilesterificados pela ação de *Pectina Metilesterases (PMEs)*. Em plantas, *PMEs* estão envolvidas direta e indiretamente em diversos processos fisiológicos durante o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo. Alguns destes processos incluem a participação de *PMEs* durante a extensão e aumento da parede celular, alongamento da raiz e no crescimento dos internós do caule (Revisado por Peaucelle *et al.*, 2008).

Adicionalmente, a ação de *PMEs* torna o homogalacturonano mais suscetível à degradação por *endopoligalacturonases* promovendo o afrouxamento da parede (Brummell and Harpster, 2001; Wakabayashi *et al.*, 2003). A partir do sequenciamento genômico do fungo *M. perniciosa*, foi identificado um arsenal de genes que codificam enzimas envolvidas na degradação de pectinas, incluindo *poligalacturonases* e *PMEs* (Mondego *et al.*, 2008). É provável que a ação de *PMEs* produzidas por *M. perniciosa* facilite o acesso de suas *poligalacturonases* à matriz pectica, promovendo sua degradação. Entretanto, com 14 DAI o fungo é encontrado colonizando apenas o espaço intercelular do tecido infectado, sugerindo que nessa fase da doença ainda não há degradação da parede.

Por outro lado, aos 42 DAI, o grau de metilesterificação da parede das células da medula de plântulas infectadas é diferente do observado em plântulas saudáveis. Amostras não infectadas apresentaram alta afinidade por JIM7 e praticamente ausência de epítomos de JIM5 (Fig. 13c-d). Em contraste, plântulas infectadas apresentaram muito pouca ligação de JIM7 e um forte reconhecimento de epítomos de JIM5 distribuído

ao longo da parede celular, indicando que nessas amostras o grau de metilesterificação de HG é interessantemente baixo.

Após o estabelecimento da doença, o fungo muda da fase biotrófica para a fase necrotrófica, passando a colonizar também o interior das células. Concomitantemente, surgem pontos de necrose na vassoura verde e após um período de aproximadamente 20 dias o ramo seca completamente, gerando a vassoura seca. Ainda não é bem conhecido se a mudança de fase do fungo é causa ou consequência da morte do tecido infectado. No entanto, é plausível afirmar que durante essa fase da doença o fungo degrada a parede celular para invadir as células e colonizar novos tecidos e/ou, como um fungo necrotrófico, obter nutrientes a partir das células mortas.

Considerando essas situações, os resultados da imunolocalização sugerem que aos 42 DAI, período no qual o fungo estaria prestes a mudar de fase, o baixo grau de metilesterificação em plantas infectadas poderia ser resultado da atividade de *PMEs*, utilizando a atividade de desmetilesterificação destas enzimas para facilitar o posterior ataque de outras enzimas que degradam a parede celular. Recentemente, foi demonstrado em *Arabidopsis* que o crescimento do fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* é dificultado em plantas onde inibidores de *PME* foram superexpressados, possivelmente pela dificuldade de *PGs* acessarem a parede celular (Lionetti *et al.*, 2007).

Por outro lado, a baixa metilesterificação de HG também pode ser resultado da menor atividade de *PMT* durante a síntese de pectinas nesse estágio da doença, como discutido acima. Isto, de certa forma, também favoreceria a degradação da parede celular durante a mudança de fase do fungo e, adicionalmente, poderia estar relacionado com o desenvolvimento anormal observado nos ramos infectados.

A análise da parede celular dos mutantes *tsd2* e *qua2* de *Arabidopsis* mostrou que estes sofrem alterações nas propriedades das pectinas. Nestes, a adesão celular é reduzida, comprometendo a expansão celular e sinalização entre células adjacentes (Ridley *et al.*, 2001). Além disso, os autores consideraram que a deficiência na metilesterificação de homogalacturonano altera a constituição de oligossacarídeos derivados da degradação de pectinas, modificando assim o papel desses oligogalacturonídeos na ativação de respostas de defesa ou durante o desenvolvimento, influenciando, por exemplo, o alongamento celular (Ridley *et al.*, 2001).

Este é o primeiro trabalho que avaliou características da parede celular e da expressão de genes relacionados aos processos de metilesterificação em plântulas de cacau durante o estabelecimento da doença Vassoura-de-bruxa. Os resultados obtidos foram relevantes ao estudo da doença, especialmente em relação à provável não indução da expressão de *SAMS* em plântulas infectadas, à expressão diferencial de *PMT* em meristemas de plantas saudáveis e infectadas ao longo da doença e, finalmente, à diferença no padrão de metilesterificação do homogalacturonano observado na parede celular de plantas com 42 DAI. Interessantemente, nesse estágio da doença, os sintomas externos já estão estabelecidos e, portanto, encontram correspondência com as características celulares dos ramos infectados. Esses resultados apontam para a importância da continuidade de estudos detalhados sobre as modificações estruturais que ocorrem na parede celular do cacau durante a doença, relacionados à avaliação da expressão de genes envolvidos na degradação dessa parede e consequente colonização dos tecidos pelo fungo.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos permitem concluir que, em plântulas de cacau infectadas por *M. perniciosa*, há uma redução do grau de metilesterificação do domínio péctico homogalacturonano no momento em que a degradação da parede celular é fundamental para progressão da doença. Esse resultado levanta a seguinte questão: a baixa metilesterificação observada é causada pela menor atividade de *pectina metiltransferases (PMTs)* ou é consequência da desmetilesterificação catalisada por *pectina metilesterases (PMEs)*?

A partir dessa questão, propomos como perspectivas para a continuação deste trabalho:

1) O estudo da expressão de *S*-adenosil-L-metionina Sintetase (*SAMS*) e de outros genes em que a atividade interfere na via de síntese de SAM e seu uso como precursor biológico ou fonte de grupos metil, para então, a partir dessas análises, tentar compreender a dinâmica do uso de SAM durante a doença vassoura de bruxa.

2) A análise dos diferentes padrões de desmetilesterificações de homogalacturonano gerados por *PMEs* da planta e do fungo e, dessa forma, tentar compreender melhor o papel dessas duas enzimas durante a doença.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aime MC and Phillips-Mora W.** 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* **97**, 1012-1022.
- Asif MH, Puneet D and Pravendra N.** 2000. A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant Molecular Biology Reporter* **18**, 109-115.
- Azevedo H, Lino-Neto T and Tavares RM.** 2003. An improved method for high quality RNA isolation from needles of adult maritime pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **21**, 333-338.
- Bastos CN.** 1989. Avaliação de fungicidas sistêmicos no controle da vassoura-de-bruxa do cacauero. *Agrotropica* **1**, 128-132.
- Beltz BS and Burd GD.** 1989. Immunocytochemical techniques: Principles and Practice.
- Bhuiyan NH, Liu W, Liu G, Selvaraj G, Wei Y and King J.** 2007. Transcriptional regulation of genes involved in the pathways of biosynthesis and supply of methyl units in response to powdery mildew attack and abiotic stresses in wheat. *Plant Mol Biol* **64**, 305-318.
- Bleecker AB and Kende H.** 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 1-18.
- Boudet AM.** 1998. A new view of lignification. *Trends in plant science* **3**, 67-71.
- Bouton S, Leboeuf E, Mouille G, Leydecker MT, Talbotec J, Granier F, Lahaye M, Hofte H and Truong HN.** 2002. QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 2577-2590.
- Brummell DA and Harpster MH.** 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol Biol* **47**, 311-340.
- Buckeridge MS and Reid JS.** 1994. Purification and properties of a novel beta-galactosidase or exo-(1-->4)-beta-D-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. *Planta* **192**, 502-511.
- Chaidamsari T.** 2005. Biotechnology for cocoa pod borer resistense in cocoa.

- Edwards R.** 1996. S-adenoyl-l-methionine metabolism in alfafa cell cultures following treatment with fungal elicitors. *Phytochemistry* **43**, 1163-1169.
- Engelbrecht CJ, Harrington TC and Alfenas A.** 2007. Ceratocystis wilt of cacao-a disease of increasing importance. *Phytopathology* **97**, 1648-1649.
- Esquerré-Tugayé MT, Boudart G and Dumas B.** 2000. Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins and oligosacharides partipate in the molecular dialogue between palntas and pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 157-163.
- Evans HC and Bastos CN.** 1979. Uma avaliação do ciclo de vida da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacaeiro. *Fitopatologia Brasileira* **4**, 104.
- Evans HC.** 2007. Cacao diseases-the trilogy revisited. *Phytopathology* **97**, 1640-1643.
- Fontecave M, Atta M and Mulliez E.** 2004. S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem Sci* **29**, 243-249.
- Frank M, Guivarc'h A, Krupkova E, Lorenz-Meyer I, Chriqui D and Schmulling T.** 2002. Tumorous shoot development (TSD) genes are required for co-ordinated plant shoot development. *Plant J* **29**, 73-85.
- Freund H.** 1970. Handbuch der mikroskopie in der technik. Frankfurt
- Frias GA, Purdy LH and Schmidt RA.** 1995. An inoculation method for evaluating resistance of cacao to *Crinipellis pernicioso*. *Plant Disease* **79**, 787-791.
- Good X, Kellogg JA, Wagnoer W, Langhoff D, Mastsumura W and Bestwick RK.** 1994. Reduced ethylene syntesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase. *Plant Molecular Biology* **26**, 781-790.
- Goubet F and Mohnen D.** 1999a. Solubilization and partial characterization of homogalacturonan-methyltransferase from microsomal membranes of suspension-cultured tobacco cells. *Plant Physiol* **121**, 281-290.
- Goubet F and Mohnen D.** 1999b. Subcellular localization and topology of homogalacturonan methyltransferase in suspension-cultured Nicotiana tabacum cells. *Planta* **209**, 112-117.
- Hedger JN, Pickering V and Aragundi J.** 1987. Variability of populations of the witche's broom disease of cocoa *Crinipellis pernicioso*. *Trans. Br. Mycol. Soc* **88**, 533-546.
- Ishikawa M, Kuroyama H, Takeuchi Y and Tsumuraya Y.** 2000. Characterization of pectin methyltransferase from soybean hypocotyls. *Planta* **210**, 782-791.

- Jackson D.** 1991. In-situ hybridisation in plants. *Molecular Plant Pathology: A Practical Approach*. Oxford University Press.
- Johansen DA.** 1940. Plant microtechnique. New York
- Karnovisky MJ.** 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**, 137-139.
- Kawalleck P, Plesch G, Hahlbrock K and Somssich IE.** 1992. Induction by fungal elicitor of S-adenosyl-L-methionine synthetase and S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase mRNAs in cultured cells and leaves of *Petroselinum crispum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4713-4717.
- Krupkova E, Immerzeel P, Pauly M and Schmulling T.** 2007. The TUMOROUS SHOOT DEVELOPMENT2 gene of Arabidopsis encoding a putative methyltransferase is required for cell adhesion and co-ordinated plant development. *Plant J* **50**, 735-750.
- Lima EL, Barros EV, Araújo JG and Thiébaud JT.** 1991. Frequência da poda fitossanitária no controle da vassoura-de-bruxa do cacauero. *Agrotropica* **3**,
- Lionetti V, Raiola A, Camardella L, Giovane A, Obel N, Pauly M, Favaron F, Cervone F and Bellincampi D.** 2007. Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in Arabidopsis restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* **143**, 1871-1880.
- Moffatt BA and Weretilnyk EA.** 2001. Sustaining S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase activity in plant cells. *Physiol Plant* **113**, 435-442.
- Mondego JM, Carazzolle MF, Costa GG, Formighieri EF, Parizzi LP, Rincones J, Cotomacci C, Carraro DM, Cunha AF, Carrer H, Vidal RO, Estrela RC, Garcia O, Thomazella DP, de Oliveira BV, Pires AB, Rio MC, Araujo MR, de Moraes MH, Castro LA, Gramacho KP, Goncalves MS, Neto JP, Neto AG, Barbosa LV, Guiltinan MJ, Bailey BA, Meinhardt LW, Cascardo JC and Pereira GA.** 2008. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. *BMC Genomics* **9**, 548.
- Motamayor JC, Lachenaud P, da Silva EMJW, Looor R, Kuhn DN, Brown JS and Schnell RJ.** 2008. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS ONE* **3**, e3311.
- Mouille G, Ralet MC, Cavelier C, Eland C, Effroy D, Hematy K, McCartney L, Truong HN, Gaudon V, Thibault JF, Marchant A and Hofte H.** 2007. Homogalacturonan synthesis in Arabidopsis thaliana requires a Golgi-localized protein with a putative methyltransferase domain. *Plant J* **50**, 605-614.

- Orfila C and Knox JP.** 2000. Spatial regulation of pectic polysaccharides in relation to pit fields in cell walls of tomato fruit pericarp. *Plant Physiol* **122**, 775-781.
- Peaucelle A, Louvet R, Johansen JN, Hofte H, Laufs P, Pelloux J and Mouille G.** 2008. Arabidopsis phyllotaxis is controlled by the methyl-esterification status of cell-wall pectins. *Curr Biol* **18**, 1943-1948.
- Peleman J, Boerjan W, Engler G, Seurinck J, Botterman J, Alliotte T, Van Montagu M and Inze D.** 1989. Strong cellular preference in the expression of a housekeeping gene of Arabidopsis thaliana encoding S-adenosylmethionine synthetase. *Plant Cell* **1**, 81-93.
- Penman D, Britton G, Hardwick K, Collin HA and Isaac S.** 2000. Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Mycological Research* **104**, 671-675.
- Pereira JL, Ram A, Figueiredo JM and de Almeida LC.** 1989. La primera aparición de la "escoba de bruja" en la principal área productora de cacao del Brasil. *Turrialba* **39**, 459-461.
- Pereira LA, Schoor S, Goubet F, Dupree P and Moffatt BA.** 2006. Deficiency of adenosine kinase activity affects the degree of pectin methyl-esterification in cell walls of Arabidopsis thaliana. *Planta* **224**, 1401-1414.
- Pereira LA, Todorova M, Cai X, Makaroff CA, Emery RJ and Moffatt BA.** 2007. Methyl recycling activities are co-ordinately regulated during plant development. *J Exp Bot* **58**, 1083-1098.
- Persson S, Caffall KH, Freshour G, Hilley MT, Bauer S, Poindexter P, Hahn MG, Mohnen D and Somerville C.** 2007. The Arabidopsis irregular xylem8 mutant is deficient in glucuronoxylan and homogalacturonan, which are essential for secondary cell wall integrity. *Plant Cell* **19**, 237-255.
- Pires JL and Luz EDMN.** 1995. Resistência à vassoura-de-bruxa na espécie *Theobroma cacao*. *Fitopatologia Brasileira* **20**, 303.
- Purdy LH and Schmidt RA.** 1996. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 573-594.
- Richter HG.** 1981. Wood and bark anatomy of Lauraceae. I. Aniba Aublet. *IAWA Bulletin n.s.* **2**, 79-87.
- Ridley BL, O'Neill MA and Mohnen D.** 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**, 929-967.

- Rincones J, Mazotti GD, Griffith GW, Pomela A, Figueira A, Leal GA, Queiroz MV, Pereira JF, Azevedo RA, Pereira GAG and Meinhardt LW.** 2006. Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* from various plant hosts in South America. *Mycological Research* **110**, 821-832.
- Roje S.** 2006. S-Adenosyl-L-methionine: beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry* **67**, 1686-1698.
- Rolim SG and Chiarello AG.** 2004. Slow death of Atlantic forest trees in cocoa agroecology in southeastern Brazil. *Biodiversity and Conservation* **13**, 2679-2694.
- Scarpari LM, Meinhardt LW, Mazzafera P, Pomella AWV, Schiavinato MA, Cascardo JCM and Pereira GAG.** 2005. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. *Journal of Experimental Botany* **56**, 865-877.
- Sreenivasan TN and Dabydeen S.** 1989. Modes of penetration of young cocoa leaves by *Crinipellis pernicioso*. *Plant Disease* **73**, 478-481.
- Tabor CW and Tabor H.** 1984. Methionine adenosyltransferase (S-adenosylmethionine synthetase) and S-adenosylmethionine decarboxylase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **56**, 251-282.
- Tabuchi T, Kawaguchi Y, Azuma T, Nanmori T and Yasuda T.** 2005. Similar regulation patterns of choline monoxygenase, phosphoethanolamine N-methyltransferase and S-adenosyl-L-methionine synthetase in leaves of the halophyte *Atriplex nummularia* L. *Plant Cell Physiol* **46**, 505-513.
- Tonini PP, Lisboa CGS, Silva CO, Mazzoni-Viveiros SC and Buckeridge MS.** 2006. Testa is involved in the control of storage mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., a tropical legume tree from of the Atlantic Forest. Trees: structure and function (on-line).
- Wakabayashi K, Hoson T and Huber DJ.** 2003. Methyl de-esterification as a major factor regulating the extent of pectin depolymerization during fruit ripening: a comparison of the action of avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) polygalacturonases. *J Plant Physiol* **160**, 667-673.
- Wei Y, Shen W, Dauk M, Wang F, Selvaraj G and Zou J.** 2004. Targeted gene disruption of glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Colletotrichum gloeosporioides* reveals evidence that glycerol is a significant transferred nutrient from host plant to fungal pathogen. *J Biol Chem* **279**, 429-435.

- Wheeler BEJ.** 1985. The growth of *Crinipellis pernicioso* in living and dead cocoa tissue. *Symp. Ser. Br. Mycol. Soc.* **10**,
- Willats WG, Steele-King CG, Marcus SE and Knox JP.** 1999. Side chains of pectic polysaccharides are regulated in relation to cell proliferation and cell differentiation. *Plant J* **20**, 619-628.
- Willats WG, Limberg G, Buchholt HC, van Alebeek GJ, Benen J, Christensen TM, Visser J, Voragen A, Mikkelsen JD and Knox JP.** 2000. Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydr Res* **327**, 309-320.
- Willats WG, Orfila C, Limberg G, Buchholt HC, van Alebeek GJ, Voragen AG, Marcus SE, Christensen TM, Mikkelsen JD, Murray BS and Knox JP.** 2001. Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls. Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion. *J Biol Chem* **276**, 19404-19413.
- Willats WGT, Steele-King CG, Marcus SE and Knox P.** 2002. Antibody techniques. *Molecular Plant Biology - A Practical Approach*. Oxford
- Zhang GF and Staehelin LA.** 1992. Immunocytochemical Analysis of High-Pressure Frozen- and Freeze-Substituted Sycamore Maple Suspension Culture Cells. *Plant Physiol* **99**, 1070-1083.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada “Análise da expressão de genes envolvidos na reciclagem de grupos metil e do grau de metilesterificação de homogalacturonano na parede celular de cacau (*Theobroma cacao* L.) durante a doença Vassoura-de-bruxa”:

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(x) está inserido no **Projeto CIBio/IB/UNICAMP** (Protocolo nº 2001/03), intitulado Rede Genômica do Estado da Bahia – Projeto genoma de *Crinipellis pernicioso*, fungo causador da doença vassoura-de-bruxa em *Theobroma cacao*;

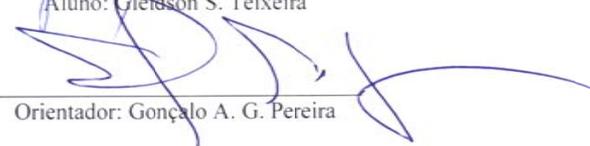
() tem autorização da **Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP** (Protocolo nº _____);

() tem autorização do **Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP** (Protocolo nº _____);

() tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.

Especificar:


Aluno: Gleidson S. Teixeira


Orientador: Gonçalo A. G. Pereira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Nome: 

Profa. Dra. HELENA COUTINHO F. DE OLIVEIRA
Presidente
Comissão Interna de Biossegurança
CIBIO/IB/UNICAMP



UNICAMP

Of. CIBio/IB 09/2008

Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
03 de setembro de 2008.

Prof. Dr. GONÇALO AMARANTE GUIMARÃES PEREIRA
Departamento de Genética e Evolução
Instituto de Biologia - Unicamp

Prezado Professor:

Conforme solicitado, seguem cópias dos Ofícios CIBio/IB 003/2001 e 005/2004, referente aprovação dos projetos CIBio 2001/03 e CIBio 2004/02:

CIBio2001/03 (17/07/2001; ad referendum)	12/06/01	Rede genômica do estado da Bahia - Projeto genoma de <i>Crinipellis pernicioso</i> , fungo causador da doença vassoura-de-bruxa do cacau.	07/09/2002
CIBio 2004/02 (05/05/2004)	05/2004	Modificação de linhagens industriais de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para o aumento da produtividade e floculação condicional	01/09/2004

Atenciosamente,

Prof. Dra. Helena C. F. de Oliveira
Presidente da CIBio/IB-Unicamp