



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Celular**

**Resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de soja  
geneticamente modificadas para expressar o gene da oxalato  
descarboxilase de *Flammulina velutipes***

**Welcimar Gonçalves da Cunha**

**2010**

Welcimar Gonçalves da Cunha

Resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de soja  
geneticamente modificadas para expressar o gene da oxalato  
descarboxilase de *Flammulina velutipes*

Tese apresentada à Universidade de Brasília,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Molecular, para a  
obtenção do título de “Doutor”.

Orientador  
Dr. Francisco José Lima Aragão

Brasília  
Distrito Federal – Brasil  
2010

Aos meus pais Acimar Gonçalves da Cunha e Vera Lúcia Barbosa da Cunha, que na simplicidade e no amor investiram todas as suas forças para o bem maior de seus filhos.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Neste momento, externo os meus sinceros agradecimentos a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho.

Assim, sou grato ao nosso bom Deus, autor de toda vida e alimento do meu viver.

Aos meus pais Acimar Gonçalves da Cunha e Vera Lúcia Barbosa da Cunha, pelo amor, carinho, incentivo e confiança.

Aos meus irmãos Acimar Gonçalves da Cunha Junior e Gleicimar Gonçalves da Cunha, espelho do meu viver.

Ao meu amigo e orientador Francisco José Lima Aragão externo agradecimento especial pela sua dedicada orientação, disponibilidade e conselhos dados ao longo deste curso. Serei eternamente grato pelo incentivo prestado no momento em que eu fora chamado a assumir o desafio de ingressar na equipe de melhoramento da Pioneer Sementes. Jamais esquecerei suas palavras de apoio.

A todos aqueles que se doaram a minha formação profissional em especial aos professores Everaldo Anastácio Pereira, José Ricardo Peixoto, Magno Antonio Patto Ramalho, César Augusto Brasil Pinto, João Bosco dos Santos e Ângela de Fátima Barbosa Abreu. A Ana Cristina Miranda Brasileiro e a Érika Valeria Saliba Albuquerque que me ajudaram a dar os primeiros passos na área de transformação de plantas. Ao amigo, chefe e exemplo de dedicação e amor ao melhoramento de plantas Luis Cláudio Prado.

Ao Hugo, Maria Laine pelo apoio concedido a conclusão deste trabalho. A ajuda de vocês foi essencial.

A Renata Esteve Ribeiro, parceira ao longo dessa caminhada e que esteve sempre presente, principalmente nos momentos de maiores dificuldades. O seu amor tornou mais suave e especial essa conquista.

A UnB, Embrapa e CNPq.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular.

A todos os pesquisadores e funcionários da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A todos os amigos do laboratório de Transferência e Expressão de Genes.

A todos os amigos da Pioneer que me ajudaram e incentivaram a continuar a cursar o doutorado em Biologia Molecular.

Aos membros da banca, por dedicarem o seu tempo visando a melhoria deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	1
1 – INTRODUÇÃO .....	2
1.1 – <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary.....	2
1.2 – Mofo Branco da Soja .....	3
1.3 – O ácido oxálico e o seu papel durante o processo de infecção do fungo <i>S. sclerotiorum</i> .....	7
1.4 – Expressão de genes de oxalato oxidases e oxalato descarboxilases no desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ao fungo <i>S. sclerotiorum</i> .....	11
2 – OBJETIVOS.....	15
3 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	16
3.1 – Isolamento do gene <i>oxdc</i> do fungo <i>Flammulina velutipes</i> .....	16
3.2 – Clonagem do gene <i>oxdc</i> .....	17
3.3 – Transformação genética de soja com o vetor pBluKSPOXDCAHAS .....	19
3.4 – PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) para a detecção do gene <i>oxdc</i> .....	19
3.5 – Plantio da geração T <sub>0</sub> .....	20
3.6 – Plantio da geração T <sub>1</sub> .....	20
3.7 – Plantio da geração T <sub>2</sub> .....	21
3.8 – Inoculação das folhas destacadas utilizando <i>plugs</i> de micélio do fungo <i>S. sclerotiorum</i> .....	22
3.8.1 – Produção do inóculo.....	22
3.8.2 – Teste das folhas destacadas.....	22
3.9 – Análise genético-estatística para avaliar a reação das plantas ao fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	24
3.10 – Southern blot.....	25
3.11 – RT-PCR.....	25
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
4.1 – Isolamento do gene <i>oxdc</i> do fungo <i>Flammulina velutipes</i> .....	27
4.2 – Clonagem do gene <i>oxdc</i> .....	28
4.3 – Transformação genética de soja com o vetor pBlukSPOXDCAHAS, análise da PCR para a detecção do gene <i>oxdc</i> e obtenção da geração T <sub>2</sub> ..	29
4.4 – Inoculação de folhas destacadas das plantas T <sub>2</sub> utilizando discos de micélio do fungo <i>S. sclerotiorum</i> .....	31
5 – CONCLUSÕES .....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43
ANEXOS .....	53
ANEXO A.....	54
ANEXO B.....	76

## RESUMO

O mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, é hoje um dos principais problemas da cultura da soja e afeta diretamente a economia dos principais países produtores. A incidência desse patógeno acarreta em danos expressivos na produção e qualidade dos grãos, podendo atingir perdas em torno de 80%. O ácido oxálico, produzido pelo fungo durante o processo de infecção, é considerado o principal fator de patogenicidade do fungo *S. sclerotiorum*. A expressão de enzimas que degradam o ácido oxálico em plantas transgênicas tem sido utilizada em diversas culturas visando o desenvolvimento de cultivares resistentes. No presente trabalho, o gene *oxdc* que codifica para a enzima oxalato descarboxilase, isolado do fungo *Flammulina velutipes*, foi inserido via biobalística no genoma da soja. Dezesesseis eventos T<sub>2</sub> foram avaliados via inoculação de discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum* em folhas destacadas. A análise da curva de progresso da doença revelou que todos os eventos transgênicos apresentaram atraso no desenvolvimento dos sintomas quando comparados com o controle não transgênico. A área abaixo da curva de progresso da doença foi utilizada para sumarizar a severidade da doença em cada evento transgênico e no controle. O teste de Kruskal-Wallis revelou que houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre os tratamentos. Os eventos OXDC.9.21 e OXDC.8.18 tiveram os menores índices de severidade. Tais eventos apresentaram respectivamente, índices de severidade 96% e 93% menor que o apurado para o controle. Os resultados impetrados a partir da curva de progresso da doença e da severidade da doença utilizando o teste de inoculação da folha destacada com o fungo *S. sclerotiorum* sugerem que a expressão do gene da *oxdc* em soja confere aumento do nível de resistência das plantas ao patógeno.

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

De acordo com a atual classificação taxonômica, o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary pertence ao filo Ascomycota, classe Discomiceto, ordem Helotiales e família Sclerotiniaceae. Patógeno necrotrófico e polífago, tem como hospedeiros mais de 400 espécies incluindo culturas de importância econômica e diversas plantas daninhas (Boland & Hall, 1994). Disperso por todo o mundo, o fungo encontra condições ótimas de crescimento em temperaturas amenas (15 a 25 °C) e em ambientes com alta umidade. Em temperaturas abaixo de 0 °C e acima de 32 °C, o fungo apresenta baixa atividade (Purdy, 1979).

As perdas de produtividade causadas pelo fungo *S. sclerotiorum* variam de acordo com a incidência do patógeno, região, clima, cultura e variedade plantada. Segundo Purdy (1979), as perdas de produtividade podem chegar a 100%. O custo anual das perdas oriundas do ataque de *S. sclerotiorum* nos EUA tem excedido os US\$ 200 milhões (Bolton et al., 2006).

Os sintomas variam de acordo com o hospedeiro, parte afetada do hospedeiro e com as condições ambientais. Em geral, o desenvolvimento do patógeno inicia em tecidos necróticos. O sintoma mais comum e característico da doença é a formação de um aglomerado de micélios brancos com aspecto cotonoso sob a área afetada e o posterior desenvolvimento dos escleródios. Os escleródios desempenham papel de grande importância durante o ciclo reprodutivo do fungo. Além de responsáveis pela produção de inóculo



(germinação micelogênica e/ou carpogênica), os escleródios são estruturas primárias de sobrevivência do fungo. Na ausência do hospedeiro, a persistência dos escleródios no solo pode atingir mais de oito anos (Adams & Ayers, 1979). Em algumas culturas, como o girassol, soja e feijão, os escleródios atuam também como estruturas de disseminação do patógeno. Durante a colheita em áreas infestadas pelo patógeno, os escleródios são misturados às sementes e se o beneficiamento não for adequado estas estruturas poderão infectar um novo campo no plantio da próxima safra.

## **1.2 – Mofo Branco da Soja**

O mofo branco, causado pelo fungo *S. sclerotiorum*, é hoje um dos principais problemas da cultura da soja e afeta diretamente a economia dos principais países produtores (EUA, Brasil e Argentina). A incidência desse patógeno acarreta em danos expressivos na produção e qualidade dos grãos, podendo atingir perdas em torno de 80%. Segundo trabalhos realizados, utilizando diferentes genótipos, o aumento de 10% da incidência da doença acarreta em perdas de produtividade que variam de 83 a 335 Kg/ha (Chun et al., 1987; Hoffman et al., 1998; Yang et al., 1999; Danielson et al., 2004).

No Brasil, a doença ocorre predominantemente nas regiões produtoras do Sul e de terras altas (acima de 700 m) do Brasil Central. O monocultivo e a ausência de rotação com espécies não hospedeiras são as principais causas do aumento da área infestada no Brasil. Segundo estimativas apresentadas pelo pesquisador Luís Henrique Carregal P. da Silva no V Congresso Brasileiro de

Soja, realizado em maio de 2009, cerca de 45% da área plantada com soja no estado de Goiás encontra-se infestada pelo fungo *S. sclerotiorum*. No sudoeste goiano, principal pólo produtivo de soja do estado, cerca de 55% da área cultivada está infestada e em algumas fazendas tem-se verificado perdas de produtividade superiores a 60%.

Nos EUA, o principal foco da doença compreende os estados de Iowa, Illinois, Minnesota, Nebraska, Pensilvânia, Dakota do Sul e Wisconsin (Wrather & Koening, 2009). Historicamente, esses estados são responsáveis por aproximadamente 55% da produção de soja dos EUA. Em 2004, quando as condições climáticas foram favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, as perdas de produtividade causadas pelo mofo branco nos EUA foram superiores a 27 milhões de sacos (Wrather & Koening, 2009). Em preços atuais, o valor desse prejuízo equivale a aproximadamente US\$ 550 milhões.

A fase mais vulnerável da soja ao desenvolvimento do patógeno abrange os estádios de floração plena (R2) e início de formação das vagens (R3/R4). Nesse período, o dossel da planta cobre as entre linhas de plantio propiciando condições favoráveis de umidade e temperatura para os escleródios, presentes no solo, germinarem e produzirem os apotécios. Os apotécios, por sua vez, produzem os ascósporos que são liberados no ar. Os ascósporos, ao encontrarem tecidos senescentes, germinam e iniciam o processo de infecção da planta. Em geral, o processo de infecção inicia a partir das inflorescências e das axilas das folhas e ramos laterais. A Figura 1 resume de forma esquemática o ciclo de vida do mofo branco da soja, incluindo os processos de infecção via germinação carpogênica e micelogênica.

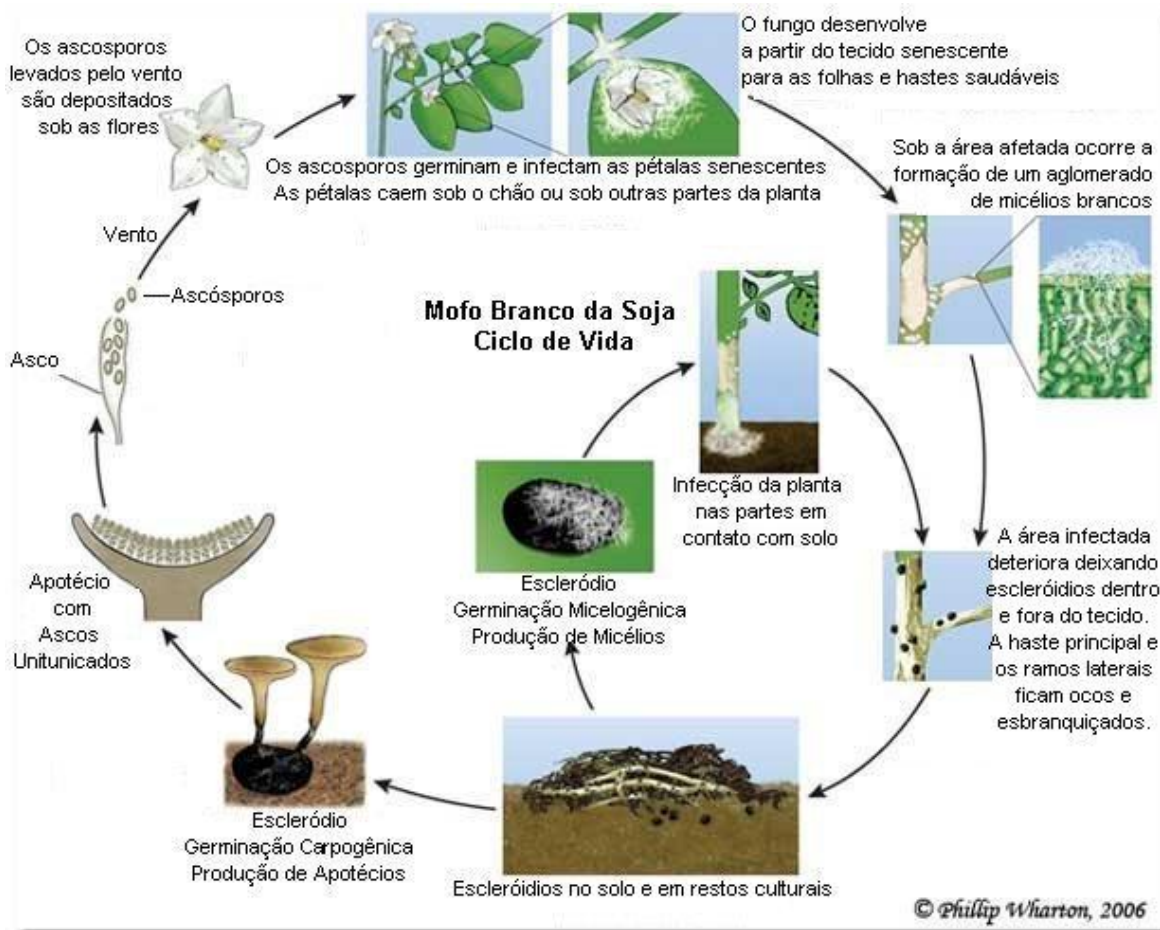


Figura 1. Esquema do ciclo de vida do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causador do mofo branco da soja. Adaptado de Wharton & Kirk (2007).

O controle da doença está concentrado principalmente em práticas agronômicas como o plantio de cultivares resistentes ao acamamento, maior espaçamento entre linhas, redução da população de plantas, plantio direto, rotação com culturas não hospedeiras e aplicação de fungicidas. Contudo, em condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, tais práticas têm se mostrado pouco eficientes. O uso de fungicidas é de baixa eficiência porque o período inicial de infecção do patógeno ocorre quando a planta encontra-se na fase reprodutiva. Nesse estágio, as entre linhas de plantio estão cobertas

pelo dossel da planta e as folhas dificultam a distribuição do produto na área de ação do patógeno. Adicionalmente, o uso de fungicidas para o controle do mofo branco aumenta demasiadamente os custos de produção, reduzindo assim o lucro do agricultor. Desta forma, a alternativa economicamente viável para o controle é o desenvolvimento de variedades resistentes ao patógeno.

Entretanto, a resistência genética ao hospedeiro é complexa e de baixa herdabilidade e está restrita a genótipos que apresentam apenas resistência parcial (Kim & Diers, 2000; Arahana et al., 2001; Guo et al., 2008; Vuong et al., 2008). Por sua vez, a resistência parcial desses materiais pode ser devida tanto à resistência fisiológica como a características da planta que propiciam condições menos favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (mecanismos de escape). Os mecanismos de escape estão relacionados às características de acamamento, arquitetura do dossel, altura da planta, período de floração e maturação relativa (Kim & Diers, 2000). Trabalhos realizados visando a identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loc*) revelaram que alguns dos marcadores identificados estavam associados com os mecanismos de escape da doença (Kim & Diers, 2000). A influência dos mecanismos de escape e do ambiente no desenvolvimento do patógeno interfere diretamente no trabalho de avaliação a campo da resistência fisiológica e dificulta o desenvolvimento de materiais resistentes ao mofo branco (Arahana et al., 2001; Vuong et al., 2004).

Devido às dificuldades existentes no desenvolvimento de genótipos resistentes ao mofo branco utilizando-se de avaliações a campo, a comunidade científica tem buscado constantemente o uso de novos métodos ou técnicas controladas que permitam a identificação de materiais resistentes (Chun et al.,

1987, Wegulo et al., 1998; Kim et al., 2000; Kull et al., 2003; Chen & Wang, 2005). Os métodos mais comumente testados são: inoculação de cotilédones ou folhas destacadas utilizando *plugs* de micélio, inoculação de pecíolos excisados e teste de tolerância ao ácido oxálico. O conhecimento aprofundado desses novos métodos de avaliação tem auxiliado no conhecimento do controle genético da doença, no desenvolvimento de marcadores moleculares e na seleção de materiais com maiores níveis de resistência ao fungo *S. sclerotiorum*. Contudo, até o presente momento, não há registros de cultivares resistentes no mercado.

### **1.3 – O ácido oxálico e o seu papel durante o processo de infecção do fungo *S. sclerotiorum***

Diversos trabalhos realizados ao longo do último século associaram a produção do ácido oxálico (AO) com a patogenicidade de algumas das espécies de *Sclerotinia* (Higgins, 1927; Bateman & Beer, 1965; Maxwell & Lumsden, 1970; Kritzman et al., 1977; Noyes & Hancock, 1981; Marciano et al., 1983; Magro et al., 1984; Stone & Armentrout, 1985; Godoy et al., 1990; Pierson & Rhodes, 1992; Dutton & Evans, 1996). As principais evidências do envolvimento do AO no processo de infecção do fungo *Sclerotinia* spp. são:

- a) Presença de AO em tecidos infectados (Marciano et al., 1983; Godoy et al., 1990; Ferrar & Walker, 1993).
- b) Correlação positiva entre o nível de AO e a severidade da doença (Bateman & Beer, 1965; Maxwell & Lumsden, 1970; Noyes & Hancock, 1981; Magro et al., 1984).

- c) Desenvolvimento de sintomas semelhantes aos causados pelo patógeno após a aplicação de AO ou filtrados de cultivo do fungo contendo AO (Bateman & Beer, 1965; Noyes & Hancock, 1981; Marciano et al., 1983).
- d) Plantas que apresentam tolerância ao AO são também mais tolerantes ao fungo (Noyes & Hancock, 1981; Tu, 1985; Wegulo et al., 1998; Kolkman & Kelly, 2000);

Além das evidências citadas acima, o envolvimento do AO no processo de infecção do hospedeiro pode ser comprovado pelo trabalho de Godoy et al. (1990). Eles verificaram que mutantes de *S. sclerotiorum* incapazes de sintetizar AO foram não patogênicos ao feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), mesmo tendo mantido todo o aparato de produção de enzimas que atuam na degradação da parede celular.

O mecanismo de ação do AO durante o processo de infecção do hospedeiro ainda não está completamente esclarecido. Contudo, diversas teorias têm sido propostas e testadas com o intuito de elucidar o papel do AO na interação patógeno hospedeiro e auxiliar no desenvolvimento de cultivares resistentes ao fungo *Sclerotinia* spp. Adicionando as novas descobertas à revisão apresentada por Bolton et al. (2006), o resumo dos principais mecanismos de ação do AO pode ser descrito da seguinte maneira:

- a) No início do processo de infecção, o AO acumula nos tecidos infectados e o aumento da concentração ocorre com o avanço da colonização do hospedeiro (Bateman & Beer, 1965). À medida que aumenta a concentração de AO, o pH extracelular diminui para valores em torno de 4-

5. A redução do pH extracelular a níveis abaixo de 5 aumenta a atividade das enzimas que atuam na degradação da parede celular (CWDEs – *Cell-Wall Degrading Enzymes*) (Bateman & Beer, 1965; Maxwell & Lumsden, 1970; Marciano et al., 1983; Magro et al., 1984). Durante a interação com o hospedeiro, o fungo *S. sclerotiorum* secreta um conjunto de CWDEs (pectinases,  $\beta$ -1,3 glucanase, glicosidases, celulases, xilanases e cutinases) com o intuito de facilitar a penetração e a colonização (Hancock, 1966; Lumsden, 1969; Riou et al., 1991).
- b) O contínuo acúmulo de AO conduz a redução do pH extracelular à valores abaixo do nível ótimo de atividade das CWDEs. Contudo, a redução do pH a níveis abaixo de 4 inibe a atividade das proteínas inibidoras de poligalacturonases (PGIPs – *Polygalacturonase-Inhibiting Protein*) produzidas pela planta (Favaron et al., 2004). As poligalacturonases (PG) são importantes pectinases produzidas pelo fungo que atuam na degradação da parede celular.
- c) O AO pode afetar a regulação da transcrição de genes responsivos a alteração do pH e necessários para a patogênese e desenvolvimento do fungo *S. sclerotiorum* tais como *pac1* (responsável pela ativação ou repressão de genes em resposta ao pH extracelular) e *smk1* (requerido para o desenvolvimento dos escleródios) (Rollins & Dickman, 2001; Rollins, 2003; Chen et al., 2004).
- d) O AO inibe a atividade da polifenoloxidase produzida pela planta, limitando assim a produção dos compostos fenólicos que protegem a oxidação das

substâncias pécticas da parede celular (Marciano et al., 1983; Magro et al., 1984).

- e) O AO seqüestra os íons  $\text{Ca}^{2+}$  da parede celular, permitindo que as PG hidrolisem os pectatos (composto oriundo da reação entre o ácido péctico com  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  responsável pelo aumento da rigidez da lamela média e das outras camadas da parede celular), alterando assim a integridade da parede celular do hospedeiro (Bateman & Beer, 1965; Kurian & Stelzig, 1979). Além disso, as respostas de defesa da planta dependentes de íons  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser comprometidas (Bateman & Beer, 1965).
- f) O AO promove a abertura dos estômatos induzindo a desidratação ou murchamento foliar durante o processo de infecção do fungo *S. sclerotiorum*. O AO manipula a função das células guarda induzindo a abertura estomática por meio do acúmulo de solutos e pela inibição do ácido abscísico (ABA) que promove o fechamento dos estômatos (Guimarães & Stotz, 2004).
- g) O AO atua como uma toxina móvel e a redução do pH decorrente do seu acúmulo leva à perda de rigidez do tecido infectado (Noyes & Hancock, 1981).
- h) Nas fases iniciais do processo de infecção, em pH relativamente elevado (pH > 5), o AO induz a explosão oxidativa, resposta de defesa da planta que dispara a morte celular programada (PCD – *Programmed Cell Death*) que conduz à reação de hipersensibilidade (HR - *Hypersensitive Response*) (Kim et al., 2008; Walz et al., 2008b). Esta resposta é fruto da produção de espécies ativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*), tais como



$H_2O_2$ ,  $O_2^-$ , e  $OH^-$ . Apesar de ser um eficiente mecanismo de defesa da planta à patógenos biotróficos, a HR favorece o processo de desenvolvimento de fungos necrotróficos, como *S. sclerotiorum* e *Botrytis cinerea*, durante o processo de infecção e colonização do hospedeiro (Govrin & Levine, 2000; Dickman et al. 2001; Thomma et al., 2001; Wang et al., 2008). Com o acúmulo de AO, o pH é reduzido e a interação é acompanhada pela supressão de ROS e da PCD, possibilitando maior penetração do patógeno no tecido vegetal (Cessna et al., 2000; Kim et al., 2008; Walz et al., 2008b).

#### **1.4 – Expressão de genes de oxalato oxidases e oxalato descarboxilases no desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ao fungo *S. sclerotiorum***

As evidências do envolvimento do AO no processo de infecção e o maior entendimento do seu papel na interação patógeno hospedeiro conduziu a sociedade científica ao estudo de novas estratégias que auxiliem no desenvolvimento de cultivares resistentes ao fungo *S. sclerotiorum*. Dentre tais estratégias, o uso da engenharia genética ganhou destaque e, na última década, diversos trabalhos foram publicados apresentando resultados obtidos com plantas transgênicas capazes de degradar o AO produzido pelo fungo (Kesarwani et al., 2000; Donaldson et al., 2001; Cober et al., 2003; Hu et al., 2003; Livingstone et al., 2005; Dias et al., 2006; Dong et al., 2008; Walz et al., 2008a; Walz et al., 2008b). As duas principais alternativas utilizadas para o desenvolvimento de

plantas transgênicas capazes de degradar o AO consistem na introdução do gene *oxo*, que codifica para a enzima oxalato oxidase (OXO) e do gene *oxdc* que codifica para a enzima oxalato descarboxilase (OXDC).

A OXO converte o AO na presença de oxigênio ( $O_2$ ) em duas moléculas de gás carbônico ( $CO_2$ ) e uma de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O  $H_2O_2$  possui um papel chave no sistema de defesa da planta, pois além de atuar como indutor de genes de proteção celular e da reação de hipersensibilidade (Levine et al., 1994; Tenhaken et al., 1995), participa do cruzamento oxidativo (*cross-linking*) de proteínas da parede celular formando, com a matriz de polissacarídeos, um grande polímero de várias glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, reforçando estruturalmente a parede celular (Resende et al., 2003). O  $H_2O_2$  também atua como importante substrato das peroxidases e, por conseguinte, dispara a química de lignificação da parede celular tornando-a mais rígida e resistente à degradação por enzimas secretadas pelos patógenos (Resende et al., 2003). Vale ressaltar que a morte celular (HR) induzida pelo  $H_2O_2$  atua como um mecanismo eficiente de defesa da planta à patógenos biotróficos, mas favorece o processo de desenvolvimento de fungos necrotróficos, como *S. sclerotiorum* (Govrin & Levine, 2000; Thomma et al., 2001; Wang et al., 2008).

Plantas transgênicas de tabaco e *Arabidopsis thaliana* incapazes de incitar a HR mostraram maior resistência à *S. sclerotiorum* (Govrin & Levin, 2000; Dickman et al. 2001). Além disso, o peróxido de hidrogênio presente em altas concentrações na célula pode ser tóxico e causar a morte celular. Plantas transgênicas de girassol que apresentaram altos níveis de expressão da enzima

OXO desenvolveram sintomas de clorose e necrose nas folhas e estes sintomas foram associados à produção excessiva de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hu et al., 2003). Contudo, a expressão de genes que codificam para a OXO tem sido utilizada com sucesso em diferentes culturas (soja, girassol, canola, amendoim e tomate) visando o desenvolvimento de materiais resistentes a *Sclerotinia* spp. (Donaldson et al., 2001; Cober et al., 2003; Hu et al., 2003; Livingstone et al., 2005; Dong et al., 2008; Walz et al., 2008a).

Em soja, plantas transgênicas expressando o gene de germe de trigo que codifica para a OXO apresentaram redução do progresso da doença, quando comparadas com o controle, em testes realizados utilizando os métodos de inoculação de cotilédones e inoculação da haste com o fungo *S. sclerotiorum* (Donaldson et al., 2001). Posteriormente, uma das linhagens obtidas por Donaldson et al. (2001) foi avaliada em testes realizados a campo e os resultados obtidos demonstraram que o material apresentava resistência parcial ao mofo branco da soja, com índices de severidade inferior a testemunha irmã não transgênica (Cober et al., 2003).

A OXDC cataboliza o AO produzindo ácido fórmico (ácido orgânico não tóxico) e CO<sub>2</sub>. As vantagens atribuídas a OXDC referem-se à especificidade ao AO, o não requerimento de cofatores e a alta atividade da enzima em pH ácido ou neutro (3,0 a 7,0) (Mehta & Datta, 1991; Kesarwani et al., 2000). Como a OXDC é ativa em pH baixo e a maioria dos oxalatos encontra-se em vacúolos de células vegetais, é concebível que esta enzima possa ser direcionada a essa organela para gerar plantas transgênicas livres de oxalato. Além disso, a ação da OXDC

não produz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicional no sistema, podendo apresentar-se como alternativa à OXO no desenvolvimento de plantas com maior nível de resistência a patógenos necrotróficos.

Plantas transgênicas de tomate, fumo e alface transformadas com o gene da OXDC apresentaram maior nível de resistência ao fungo *S. sclerotiorum*, quando comparadas com o controle, em testes realizados utilizando folhas destacadas (Kesarwani et al.,2000; Dias et al., 2006; Walz et al., 2008b). Dias et al. (2006) e Walz et al. (2008b) mostraram que o nível de resistência ao fungo *S. sclerotiorum* está correlacionado ao nível de transcritos e atividade da enzima OXDC.

## 2 – OBJETIVOS

Considerando a importância do AO no processo de infecção, os resultados obtidos com plantas transgênicas que expressam genes que degradam o AO e as vantagens atribuídas a OXDC, o presente trabalho tem por objetivo principal a introdução e expressão do gene *oxdc* em plantas de soja visando o desenvolvimento de eventos transgênicos resistentes ao fungo *S. sclerotiorum*.

### 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 – Isolamento do gene *oxdc* do fungo *Flammulina velutipes*

Os procedimentos realizados para o isolamento do gene *oxdc* do fungo *Flammulina velutipes* foram previamente descritos por Dias et al. (2006) e serão apresentados neste capítulo para melhor entendimento do trabalho.

Micélios do fungo *F. velutipes* (isolado: IJF 140502 – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) foram cultivados a 25 °C em meio de cultivo líquido (Mehta & Datta, 1991) e, após 25 dias de cultivo, 12,5mM de ácido oxálico foram acrescentados ao meio para indução da enzima oxalato descarboxilase (OXDC). A extração do RNA total foi realizada depois de 12 horas de cultivo em meio contendo ácido oxálico utilizando o kit Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen) a partir de 250mg de tecido do fungo, segundo o protocolo sugerido pelo fabricante.

A síntese do cDNA a partir do RNA total foi realizada utilizando a transcriptase reversa SuperScript II<sup>®</sup> (Invitrogen), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

A reação de RT-PCR foi processada em termociclador utilizando 50µL de solução composta de 40ng de cDNA, 60mM de Tris-SO<sub>4</sub> (pH 8.9), 18mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2mM de MgSO<sub>4</sub>, 250nM de cada dNTP, 200nM de cada primer e 5U da enzima taq DNA polymerase Platinum High Fidelity (Invitrogen). A mistura foi submetida à reação de desnaturação inicial (94 °C por 2min) e a 35 ciclos de

amplificação (94 °C por 30s, 55 °C por 30s, 68 °C por 2min) seguidos de um ciclo de alongação final de 10min a 68 °C. Os *primers* 5'TCTAGATGTTCAACAACCTTCCAACG3' e 5'GGATCCTCAGTTCACAGGACCAAC3' foram utilizados para amplificar uma seqüência de 1.344pb que corresponde à seqüência codificante do gene *oxdc*.

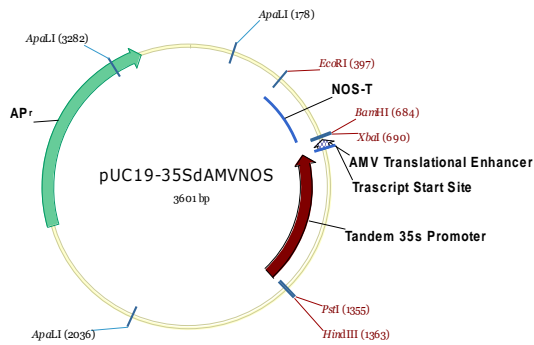
### 3.2 – Clonagem do gene *oxdc*

A região codificante do gene *oxdc* foi clonada no vetor pCR2.1 TOPO (Invitrogen) gerando o vetor pTOPOOXDC e, logo em seguida, seqüenciada em seqüenciador automático utilizando os primers universais M13 e T7.

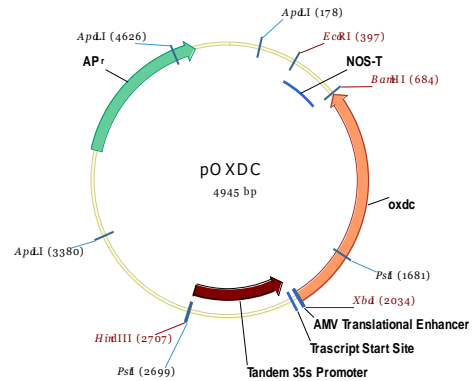
Para a construção do vetor de expressão pOXDC, a seqüência codificante do gene *oxdc* (1.344pb) foi clonada no vetor pUC19-35SdAMVNOS entre os sítios de *Bam*HI e *Xba*I sob o controle de duas cópias em *tandem* do promotor 35S RNA do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV35S) e uma seqüência *enhancer* do vírus do mosaico da alfafa (AMV) (Figura 2).

O cassete de expressão (2.310pb) foi então removido do vetor pOXDC com as enzimas *Eco*R1 e *Hind*III e clonado no vetor pBluKSP (Fermentas), dando origem ao vetor pBluKSPOXDC (5.256pb) (Figura 2).

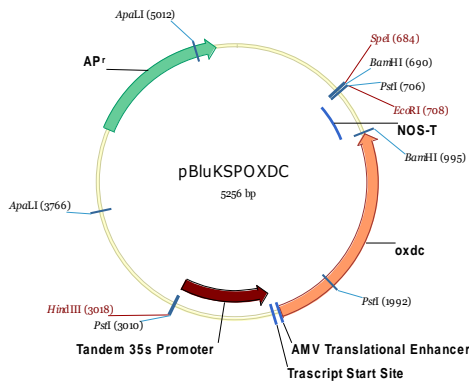
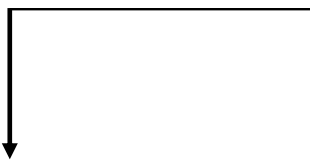
Por fim, o cassete de expressão contendo o gene mutante *ahas*, isolado de *Arabidopsis thaliana* e que confere resistência ao herbicida imazapir (herbicida do grupo das imidazolinonas) foi retirado do vetor pAC321 (Rech et al., 2008) com a enzima *Xba*I e inserida no sítio de *Spe*I do vetor pBluKSPOXDC dando origem ao vetor pBluKSPOXDCAHAS (10.968pb) (Figura 2).



1 - Clonagem do gene *oxdc* no sítio de *Bam*HI e *Xba*I



2 - Clonagem do cassete 35SdAMV-OXDC-NOS no sítio de *Eco*RI e *Hind*III



3 - Clonagem do gene *ahas* no sítio de *Spe*I

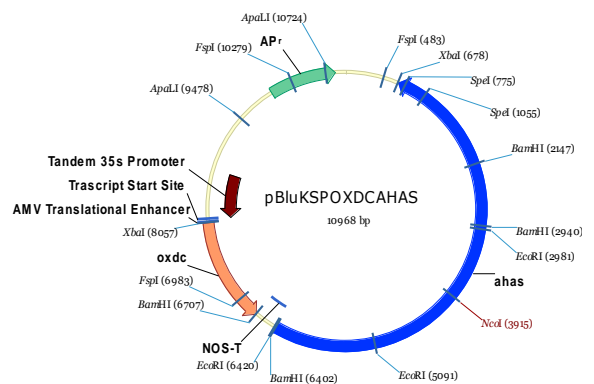


Figura 2. Estratégia para a construção do vetor pBluKSPOXDCAHAS (10.968pb). O gene *oxdc* foi isolado do fungo *Flamulina velutipes* e o gene mutante *ahas* do vetor pAC321.



### 3.3 – Transformação genética de soja com o vetor pBluKSPOXDCAHAS

O vetor pBluKSPOXDCAHAS foi utilizado para transformar via biobalística células meristemáticas de 1152 embriões zigóticos extraídos de sementes esterilizadas da variedade BR-16.

A esterilização das sementes, a extração e posicionamento dos embriões zigóticos, a preparação de partículas, o bombardeamento com o vetor pBluKSPOXDCAHAS, a indução de multibrotação e a regeneração em meio seletivo (MS + sacarose 3% + imazapir 500nM + agar 0,6%) dos brotos transgênicos foi realizada conforme o protocolo descrito por Aragão et al. (2000) e Rech et al. (2008).

### 3.4 – PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para a detecção do gene *oxdc*

A análise molecular visando a detecção do gene *oxdc* foi realizada utilizando o DNA extraído de discos foliares, segundo metodologia de Doyle & Doyle (1987).

Para cada amostra analisada, 2µL de DNA (≈20ng) foram adicionados à solução contendo 17,6µL de H<sub>2</sub>O; 2,5µL de tampão 10X; 0,8µL de dNTP (4µM); 0,6µL de MgCl<sub>2</sub> (50µM); 0,5µL de cada *primer* (10µM); e 0,5µL de Taq polimerase (10U/µL). Os *primers* OXDC371 (5´CTCGGCAGCAGAATGAGGTC3´) e OXDC873 (5´TCGGCTCGACAGAGGAGAAG3´) utilizados na reação amplificam uma seqüência de 522pb contida na região codificante do gene *oxdc*.

As condições de tempo e temperatura da PCR para a detecção do gene *oxdc* encontram-se na Tabela 1.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% usando tampão TBE 0,5X e voltagem ajustada para 5 V/cm.

Tabela 1. Condições de tempo e temperatura da PCR utilizada para a detecção do gene *oxdc*.

Etapas	Temperatura	Tempo
1 - Desnaturação inicial	95°C	5min
2 – Desnaturação	95°C	1min
3 - Anelamento dos <i>primers</i>	57°C	1min
4 - Alongamento das fitas de DNA	72°C	2min
5 - Amplificação (Repetir 35 vezes as etapas 2, 3 e 4)		
6 - Extensão final	72°C	5min

### 3.5 – Plantio da geração T<sub>0</sub>

As plantas regenerantes em meio seletivo e positivas segundo as análises moleculares (PCR) foram aclimatadas em vasos contendo solo fértil e alocadas em casa de vegetação. As sementes de cada planta da geração T<sub>0</sub> foram coletadas, identificadas e armazenadas em sacos de papel para o posterior plantio da geração T<sub>1</sub>. Cada planta T<sub>0</sub> foi considerada um evento distinto.

### 3.6 – Plantio da geração T<sub>1</sub>

As sementes obtidas de cada evento T<sub>0</sub> foram plantadas em copos plásticos de 350ml contendo solo fértil. Discos foliares das plantas em estágio vegetativo VC (Fehr et al., 1971) foram coletados para a extração de DNA e

posterior análise via PCR. A análise para a detecção do gene *oxdc* foi realizada conforme descrito no item 3.4.

As plantas positivas segundo a análise molecular (PCR) foram transferidas para vasos contendo solo fértil. Os vasos foram alocados em casa de vegetação.

As sementes de cada planta da geração T<sub>1</sub> foram coletadas separadamente e identificadas para o plantio da geração T<sub>2</sub>. Cada planta foi considerada um evento distinto.

### **3.7 – Plantio da geração T<sub>2</sub>**

Vinte e quatro sementes de 16 eventos T<sub>1</sub> (OXDC.1.01; OXDC.1.02; OXDC.2.03; OXDC.2.04; OXDC.3.05; OXDC.3.06; OXDC.4.07 OXDC.4.08;; OXDC.5.09; OXDC.5.10; OXDC.6.11; OXDC.6.12; OXDC.7.16; OXDC.7.17; OXDC.8.18 e OXDC.9.21) foram plantadas em copos plásticos de 350ml contendo solo fértil.

Discos foliares das plantas em estágio vegetativo VC (Fehr et al., 1971) foram coletados para a extração de DNA e posterior análise via PCR. A análise para a detecção do gene *oxdc* foi realizada conforme descrito no item 3.4.

Quinze plantas positivas, segundo a análise de PCR, de cada evento foram transferidas para vasos contendo solo fértil. Os vasos foram alocados em casa de vegetação com fotoperíodo de 14 horas, umidade relativa maior que 80% e intensidade luminosa de  $350\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

O teste para verificar a reação das plantas T<sub>2</sub> ao fungo *S. sclerotiorum* foi realizado conforme descrito no item 3.8.

### **3.8 – Inoculação das folhas destacadas utilizando *plugs* de micélio do fungo *S. sclerotiorum***

#### **3.8.1 – Produção do inóculo**

Escleródio oriundo de um campo de soja infectado com mofo branco foi cultivado em placa de Petry com meio BDA (Batata Dextrose Agar). Visando o desenvolvimento de micélios, a placa contendo os escleródios foi mantida em temperatura ambiente sob a bancada do laboratório.

Para a produção do inóculo utilizado no teste das folhas destacadas, um disco de micélio de 5mm de diâmetro foi retirado da borda do halo formado pelo crescimento do fungo e colocado no centro de uma nova placa contendo meio BDA. Ao todo 20 placas foram produzidas para realizar o teste. As placas foram transferidas para sala de cultivo com temperatura ambiente de 20 °C e retiradas após 48 horas para a realização do teste das folhas destacadas.

#### **3.8.2 – Teste das folhas destacadas**

O experimento foi realizado utilizando trifólios retirados de plantas sadias T<sub>2</sub> e que apresentavam o mesmo estágio de desenvolvimento (V3). A Tabela 2 resume o número de plantas amostradas de cada evento. O terceiro trifólio de cada planta foi retirado junto à haste principal e imediatamente depositado em uma vasilha com água para o transporte até o laboratório.

Tabela 2. Número de plantas (trifólios) amostradas de cada evento *oxdc* na geração T<sub>2</sub> para o teste de inoculação da folha destacada com o fungo *S. sclerotiorum*. Cada trifólio foi considerado uma repetição.

Evento	Número de Plantas
OXDC.1.01	10
OXDC.1.02	9
OXDC.2.03	10
OXDC.2.04	6
OXDC.3.05	10
OXDC.3.06	10
OXDC.4.07	10
OXDC.4.08	10
OXDC.5.09	10
OXDC.5.10	4
OXDC.6.11	10
OXDC.6.12	10
OXDC.7.16	8
OXDC.7.17	6
OXDC.8.18	9
OXDC.9.21	10
BR-16 (Controle)	10

No laboratório, as amostras foliares foram posicionadas em placa de Petri sob 3 folhas umedecidas de papel de filtro. Discos de micélio de 5mm de diâmetro foram retirados das margens do halo formado pelo crescimento do fungo *S. sclerotiorum* em meio BDA e posicionados na superfície adaxial da folha ao lado da nervura central. Somente a folha do meio de cada trifólio foi inoculada com o *plug* de micélio. As placas contendo os trifólios inoculados foram transferidas para sala de cultivo e mantidas no escuro com temperatura ambiente de 20 °C.

As folhas inoculadas foram fotografadas após 42, 66 e 90 horas de cultivo. As imagens foram usadas para medir a área afetada em cada estágio com o auxílio do programa v1.0.1 QUANT (Vale et al., 2003).

### 3.9 – Análise genético-estatística para avaliar a reação das plantas ao fungo *Sclerotinia sclerotiorum*

Para a avaliação da reação das plantas ao fungo *S. sclerotiorum*, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado conforme o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij} = m + t_i + e_{ij}$$

em que:

$Y_{ij}$ : valor observado na unidade experimental de repetição  $j$  que recebeu o tratamento  $i$ , sendo  $j = 1, 2, \dots, j_i$  e  $i = 1, 2, \dots, 17$ ;

$m$ : média geral do experimento;

$t_i$ : efeito do tratamento  $i$ , sendo  $i = 1, 2, \dots, 17$ ;

$e_{ij}$ : erro experimental associado à observação  $Y_{ij}$ , assumindo que os erros são independentes e normalmente distribuídos, com média zero e variância homogênea  $\sigma_e^2$ .

A severidade da doença nos eventos *oxdc* e no controle (BR-16) foi determinada por meio do cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AUDPC - *Area Under the Disease Progress Curve*), obtida a partir da estimativa da média das AUDPC em cada repetição de acordo com a fórmula abaixo, proposta por Shaner e Finney (1977):

$$AUDPC = \sum_{i=1}^n [(x_i + x_{i-1}) / 2](t_i - t_{i-1})$$

em que:

$n$ : número de avaliações no tempo;

$x_i$  : é a severidade da doença medida pelo programa QUANT V.1.0.1 (Vale et al., 2003) no tempo  $i$ , sendo  $i = 42, 66$  e  $90$ ;

$t_i$  : é o tempo em que foi realizada a avaliação  $i$ , sendo  $i = 42, 66$  e  $90$ .

Os dados obtidos a partir do cálculo da AUDPC de cada repetição foram analisados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952).

### **3.10 – Southern blot**

O DNA genômico utilizado para a análise de Southern foi isolado de acordo com Dellaporta et al. (1983). As análises de Southern foram realizadas como descrito por Sambrook et al. (1989). O DNA genômico (15 $\mu$ g), digerido com *EcoRI*, foi separado em gel de agarose 1%, transferido para uma membrana de nylon (Hybond) e hibridizado com a sonda marcada com  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]-dCTP (3000 Ci mol<sup>-1</sup>) usando o kit Random Primer DNA Labelling (Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante. A sonda foi obtida a partir do isolamento e purificação do fragmento de 1.350pb oriundo da digestão do vetor pBluKSPOXDCAHAS com *Bam*HI e *Xba*I. A sonda corresponde à seqüência codificante do gene *oxdc*. O fragmento de 1.350pb foi isolado de um gel de agarose 1% e purificado utilizando o kit Wizard SV Gel Clean-Up System (Promega).

### **3.11 – RT-PCR**

A RT-PCR foi realizada utilizando o RNA total extraído de folhas do controle BR-16 (repetição 1) e das plantas transgênicas OXDC.6.11.7 (repetição 7 do evento OXDC.6.11) e OXDC.9.21.2 (repetição 2 do evento OXDC.9.21). O RNA total foi extraído das folhas usando o kit Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen). O DNA genômico remanescente nas amostras foi eliminado com o uso de DNase. A síntese do cDNA a partir do RNA total foi realizada utilizando a transcriptase reversa SuperScript II<sup>®</sup> (Invitrogen), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. As reações de PCR foram realizadas como descrito no item 3.4 com ≈25ng de cDNA. Os *primers* OXDC371 e OXDC873 foram utilizados para amplificar a seqüência de 522pb contida na região codificante do gene *oxdc*. Como controle interno, os *primers* rRNA1 (5'-AACGGCTACCACATCCAAGG-3') e rRNA2C (5'-TCATTACTCCGATCCCGAAG-3') foram utilizados para amplificar uma seqüência do gene *18S rRNA*. A intensidade relativa das bandas foi determinada utilizando o escâner do gel de PCR para análise da intensidade de banda com o programa Quantity One<sup>®</sup> v4.6.3. A quantificação relativa foi feita comparando as intensidades das bandas do *oxdc* e *18S rRNA*.



## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 – Isolamento do gene *oxdc* do fungo *Flammulina velutipes*

O gene *oxdc* de 1.344pb que codifica para a enzima oxalato descarboxilase apresentou 99,26% de identidade quando comparado com outra seqüência do gene, previamente listada no GenBank (acesso: AF2000683), também isolada do fungo *F. velutipes*. As diferenças encontradas ocorreram em apenas 10 bases, contudo a seqüência de aminoácidos não foi alterada. A seqüência de 1.344pb (Figura 3) foi depositada no GenBank com o número de acesso AY238332.

```
1   atgttcaaca acttccaacg tctgctcact gtcatocttc tctccggttt taccgctgga
61  gtgccttttg cgtccaccac gacgggaact ggaactgcca ccggtacctc aaccgcccga
121 gagcccagcg cgactgtacc ctttgccagc actgatccca accccgtgct ctggaatgag
181 accagtgacc cagcgcttgt aaagccagag aggaaccagc ttggtgcgac aatccaagga
241 ccggataatc tgcctataga ctttcagaat ccggacttgc tcgccccacc gactactgat
301 catggctttg tcggtaatgc gaagtggcca ttcagcttca gcaagcagcg actgcagacg
361 ggtggctggg ctcggcagca gaatgaggtc gttttgcctc tcgcgactaa tctcgcttgc
421 acaaatatgc gtcttgaagc aggcgctatc agggagttgc attggcacia gaacgctgag
481 tgggcatatg ttctgaaggg gtctacccaa atctcagctg tcgataacga agggcgcaat
541 tatatttcca ccgtcggccc cgggtgattg tggattttcc caccaggcat tcctcactcg
601 ctccaagcga cagctgatga tccagaaggc tcagagtcca tcttgggtgt tgattcaggc
661 gccttcaatg acgacggtac attcttgctc actgactggc tttcgcattg tccaatggaa
721 gttatcctga agaacttcag agccaagaac cccgccgcat ggtctcacat acctgctcaa
781 cagctataca tcttccctag tgaacctcct gcggacaacc agccggacc cgttagccca
841 caggggacgg ttccccttcc atattcattc aacttctcct ctgtcgagcc gacgcagtat
901 tccgggtgga cagcgaagat tgcagattcc acgacgttca acatttccgt cgctatcgcc
961 gtggccgagg ttacagttga gcctggtgct ttgagagagc tgcactggca tccgactgag
1021 gacgagtgga cattcttcat ctctggaaac gcgaggggta caattttcgc tgcgcagagt
1081 gtagcctcta cgtttgatta ccaagggtgg gatatcgctt atgttcctgc atctatgggc
1141 cattatgtag agaacattgg aaacacgact ttgacttata tggaggctct caataccgac
1201 cgttttgctg atgtcagtct aagtcagtgg ctggcgtaa cacctccgag tgtcgtgcag
1261 gcgcacctga acttgacgca cgagacactt gcggagctca agcagtttgc gaccaaggcg
1321 actgttggtg gtctctgtgaa ctga
```

Figura 3. Seqüência do gene *oxdc* de 1.344pb isolado do fungo *Flammulina velutipes* (isolado: IJF 140502, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

## 4.2 – Clonagem do gene *oxdc*

O processo de clonagem do gene *oxdc* deu origem ao vetor pBluKSPOXDCAHAS (10.968pb). A Figura 4 apresenta a digestão do vetor pBluKSPOXDCAHAS com a enzima *FspI* realizada para confirmar a inserção do cassete de expressão do gene *ahas*.

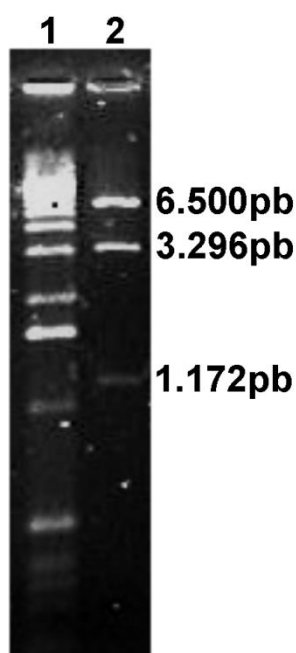


Figura 4. Digestão do vetor pBluKSPOXDCAHAS com a enzima *FspI* (2). Marcador 1-kb ladder-Invitrogen (1).

Como o fungo *S. sclerotiorum* é capaz de afetar todas as partes da planta de soja, o gene *oxdc* foi clonado sob o controle de duas seqüências em *tandem* do promotor constitutivo CaMV35S. Este promotor tem sido utilizado com sucesso no controle da expressão de transgenes em diferentes órgãos de várias espécies de plantas, incluindo a soja. Kay et al. (1987) demonstraram que a duplicação em

*tandem* das seqüências do CaMV35S aumenta a atividade transcricional em aproximadamente 10 vezes quando comparada com o promotor natural.

O cassete de expressão do gene *oxdc* presente no vetor pBluKSPOXDCAHAS foi destinado previamente para a construção do vetor pCambOxDc e utilizado para transformar, via *Agrobacterium*, a alface visando o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ao mofo branco (Dias et al., 2006). Os resultados obtidos revelaram que o gene *oxdc* sob o controle da seqüência em *tandem* do CaMV35S e do *enhancer* AMV é capaz de prover aumento da resistência ao fungo *S. sclerotiorum*. Adicionalmente, o promotor CaMV35S foi utilizado com sucesso no controle da expressão do gene *oxdc* em plantas transgênicas de fumo e tomate resistentes a *S. sclerotiorum* (Kesarwani et al., 2000; Walz et al., 2008b).

#### **4.3 – Transformação genética de soja com o vetor pBluKSPOXDCAHAS, análise da PCR para a detecção do gene *oxdc* e obtenção da geração T<sub>2</sub>**

O vetor pBluKSPOXDCAHAS foi utilizado para transformar via biobalística células meristemáticas de 1.152 embriões zigóticos. Após o período de indução de multibrotação, os embriões bombardeados foram transferidos para o meio seletivo contendo imazapir (500nM). Quarenta e oito (48) plantas regenerantes em meio seletivo foram analisadas via PCR. A análise da PCR detectou a presença do gene *oxdc* em 10 plantas (Figura 5). Cada planta *oxdc* positiva, segundo a análise molecular (PCR), foi considerada um evento T<sub>0</sub> distinto (OXDC.1; OXDC.2; OXDC.3; OXDC.4; OXDC.5; OXDC.6; OXDC.7; OXDC.8; OXDC.9 e OXDC.10). A eficiência

de transformação, considerando o número final de plantas transgênicas e o número total de embriões bombardeados foi de 0,87%.

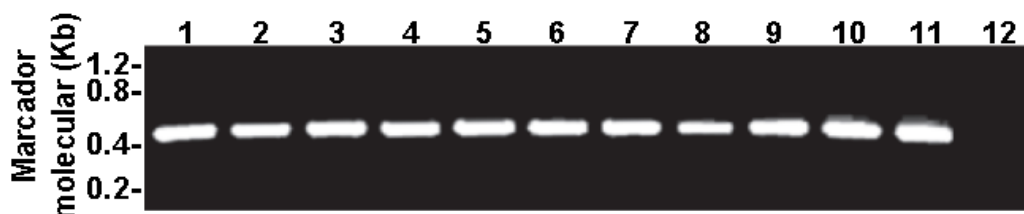


Figura 5. PCR das plantas de soja transformadas com o vetor pBlukSPOXDCAHAS. Os números de 1 a 10 indicam respectivamente os eventos OXDC.1; OXDC.2; OXDC.3; OXDC.4; OXDC.5; OXDC.6; OXDC.7; OXDC.8; OXDC.9 e OXDC.10). Os números 11 e 12 indicam respectivamente o vetor pBluKSPOXDCAHAS e a cultivar BR-16 não transgênica. O marcador utilizado foi o 1-kb ladder-Sigma. As bandas possuem 522pb.

As 10 plantas positivas, segundo a análise da PCR, foram aclimatadas na casa de vegetação visando à obtenção da geração  $T_1$ . O estresse causado pela cultura de tecidos associado às baixas temperaturas durante o período de aclimação acarretou no florescimento precoce das plantas  $T_0$  e impediu o desenvolvimento normal das plantas. Decorrente do desenvolvimento anormal das plantas, o número de sementes obtidas de cada evento na geração  $T_0$  foi extremamente baixo (Tabela 3). Este fato impediu que fosse realizada a análise de segregação do transgene na geração  $T_1$ .

As sementes obtidas de cada evento  $T_0$  foram plantadas em casa de vegetação e as plantas  $T_1$  foram analisadas via PCR para detectar a presença do gene *oxdc*. Os transgênicos apresentaram fenologia (altura da planta, local de inserção da primeira vagem, número de ramos, comprimento de internós, área

foliar e número total de flores e vagens) semelhante às plantas não-transformadas. Cada planta T<sub>1</sub> foi considerada um evento distinto.

Tabela 3. Número total de sementes obtidas de cada evento na geração T<sub>0</sub>.

Evento T <sub>0</sub>	Número de sementes obtidas na geração T <sub>0</sub>
OXDC.1	6
OXDC.2	8
OXDC.3	5
OXDC.4	8
OXDC.5	2
OXDC.6	23
OXDC.7	5
OXDC.8	1
OXDC.9	1
OXDC.10	6

#### 4.4 – Inoculação de folhas destacadas das plantas T<sub>2</sub> utilizando discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*

Vinte e quatro sementes de 16 eventos T<sub>1</sub> (OXDC.1.01; OXDC.1.02; OXDC.2.03; OXDC.2.04; OXDC.3.05; OXDC.3.06; OXDC.4.07 OXDC.4.08;; OXDC.5.09; OXDC.5.10; OXDC.6.11; OXDC.6.12; OXDC.7.16; OXDC.7.17; OXDC.8.18 e OXDC.9.21) foram plantadas na casa de vegetação e as plantas T<sub>2</sub> foram analisadas via PCR para a detecção do gene *oxdc*. Cerca de 10 plantas PCR positivas de cada evento T<sub>2</sub> e 10 plantas não transgênicas da variedade BR-16, que apresentaram desenvolvimento similar, foram selecionadas para realizar o teste da folha destacada inoculada com o fungo *S. sclerotiorum* (Tabela 2).

A análise da curva de progresso da doença revela que todos os eventos transgênicos apresentaram atraso no desenvolvimento dos sintomas quando comparados com o controle não transgênico (Figura 6). Após 42 horas da

inoculação, os primeiros sintomas eram facilmente observados no controle (áreas lesionadas variando de 0.84 a 2.69 cm<sup>2</sup>). No mesmo estágio, os eventos transgênicos, em sua grande maioria, apresentavam pequenos sintomas localizados apenas ao redor do disco de micélio. A área lesionada do controle, após 42 horas, foi, aproximadamente, 2 vezes maior que o pior evento transgênico (OXDC.1.02) e 7 vezes maior que o melhor evento (OXDC.9.21) nesse mesmo estágio. A média da área lesionada de todos os eventos transgênicos foi de 0,41 cm<sup>2</sup>, enquanto que o valor obtido para o controle foi de 1,49 cm<sup>2</sup>. Considerando que, para o cálculo da área lesionada, a área do disco de micélio ( $\approx 0.2$  cm<sup>2</sup>) fora apreciada, mesmo que o fungo não tenha penetrado no tecido, a média obtida para os eventos transgênicos está superestimada, pois parte dos eventos não apresentavam sintomas visíveis ao redor do halo formado pelo *plug*. Desta forma, a diferença real entre os transgênicos e o controle neste primeiro estágio de avaliação é ainda maior.

Após 66 horas, com a evolução dos sintomas em alguns eventos transgênicos, observou-se que o crescimento do patógeno ocorre, principalmente, através das nervuras das folhas. Nesse estágio, a área infectada do controle foi 2,8 vezes maior que o pior evento transgênico (OXDC.1.02) e 23,4 vezes maior que o melhor evento (OXDC.9.21). A média da área lesionada de todos os eventos transgênicos foi de 1,41 cm<sup>2</sup>, enquanto que o valor obtido para o controle foi de 6,48 cm<sup>2</sup>. Vale ressaltar que a média da área lesionada de todos os eventos transgênicos após 66 horas do início do teste foi menor que a obtida no controle após 42 horas.

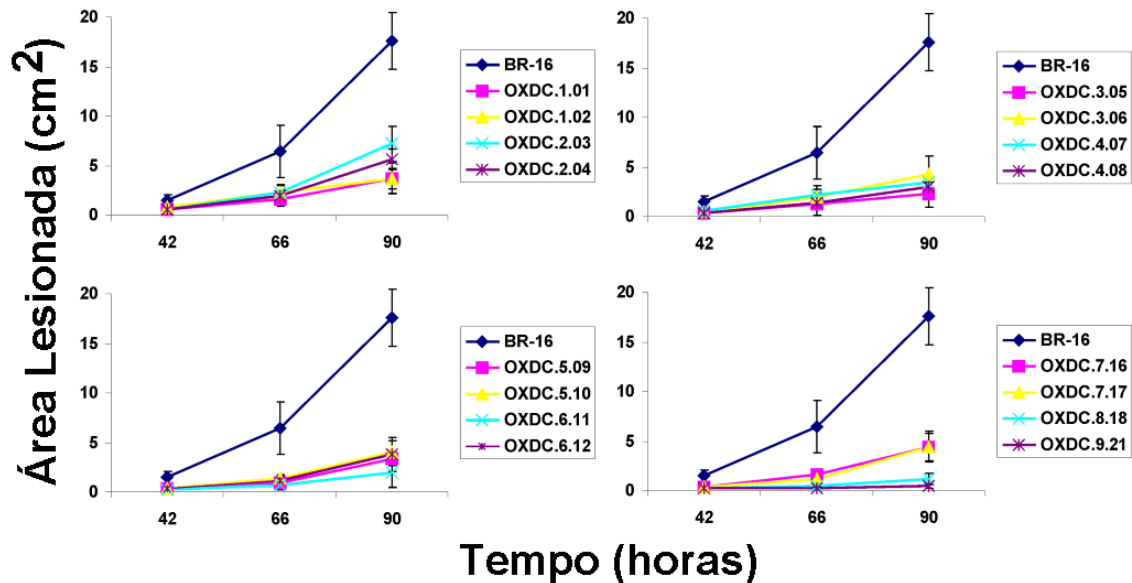


Figura 6. Curva de progresso da doença obtida a partir da inoculação de folhas destacadas com discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. A área infectada medida em cada tempo (42, 66 e 90 horas) é a média de 10 repetições, exceto para os eventos OXDC.1.02, OXDC.2.04, OXDC.5.10, OXDC.7.16, OXDC.7.17 e OXDC.8.18 que tiveram 9, 6, 4, 8, 6 e 9 repetições, respectivamente. As barras indicam o desvio padrão das médias.

No último estágio, considerado para a avaliação da curva de progresso da doença, as lesões observadas nas folhas das plantas controles atingiram as bordas e estenderam-se por quase a totalidade da folha (Figura 1A). Nesse estágio, a magnitude do valor obtido para a média da área lesionada do controle (17,60 cm<sup>2</sup>) foi 5 vezes maior que a média da área lesionada de todos os eventos transgênicos (3,5 cm<sup>2</sup>). A média da área infectada obtida 90 horas após a inoculação, variou de 0,45 cm<sup>2</sup> (OXDC.9.21) a 7,19 cm<sup>2</sup> (OXDC.2.03) nos eventos transgênicos. Detalhes das lesões observadas em cada evento transgênico após 90 horas do início do teste podem ser observados nas Figuras 2A a 17A. Nesse estágio, as áreas anotadas para o evento OXDC.9.21 variaram de 0,2 a 0,84 cm<sup>2</sup>.

Vale ressaltar que toda a área anotada inclui o valor da área do disco de micélio ( $\approx 0.2 \text{ cm}^2$ ), mesmo que não tenha sido observado sintoma oriundo da penetração do fungo na folha. Após 90 horas, nas repetições 2 e 7 do evento OXDC.9.21 o crescimento do fungo *S. sclerotiorum* ocorreu apenas sob a superfície das folhas não sendo visualizada penetração dos micélios, mesmo quando analisadas com o auxílio da lupa (Figuras 8 e 17A).

A análise para determinar a curva de progresso da doença foi encerrada após 90 horas da inoculação das folhas destacadas, pois nesse estágio as lesões observadas no controle haviam atingido as extremidades do tecido. Contudo, como o fato verificado no controle não fora observado nos eventos transgênicos, uma nova avaliação foi realizada após 24 horas da última avaliação, ou seja, 114 horas após o início do teste. Nesse momento, observou-se que a média da área lesionada do evento OXDC.9.21 foi de  $0,54 \text{ cm}^2$ , valor 2,75 vezes menor que o observado no controle no primeiro estágio de avaliação (42 horas). As Figuras 18A e 19A mostram respectivamente as fotos do controle e do evento OXDC.9.21 após 114 horas do início do teste.

A área abaixo da curva de progresso da doença (AUDPC) foi utilizada para sumarizar a severidade da doença em cada evento transgênico e no controle. O teste de Kruskal-Wallis revelou que houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre os tratamentos (Figura 7). O único evento que não diferiu significativamente ao nível de 5% de probabilidade da cultivar BR-16 foi o OXDC.2.03. Contudo, vale ressaltar que este difere do controle se considerar o valor de  $P \leq 0,10$ . Outro ponto importante a ser considerado na comparação entre o evento OXDC.2.03 e o controle refere-se ao fato de que a diferença estatística obtida a partir do teste de



Kruskal-Wallis é uma função dos postos das observações na amostra combinada e não das médias propriamente ditas. Adicionalmente, a severidade do evento OXDC.2.03 foi 61% menor que a severidade obtida no controle. A severidade média de todos os eventos transgênicos foi 79% inferior a determinada para o controle. Os eventos OXDC.9.21 e OXDC.8.18 tiveram os menores índices de severidade. Tais eventos apresentaram, respectivamente, índices de severidade 96% e 93% menor que o apurado para o controle.

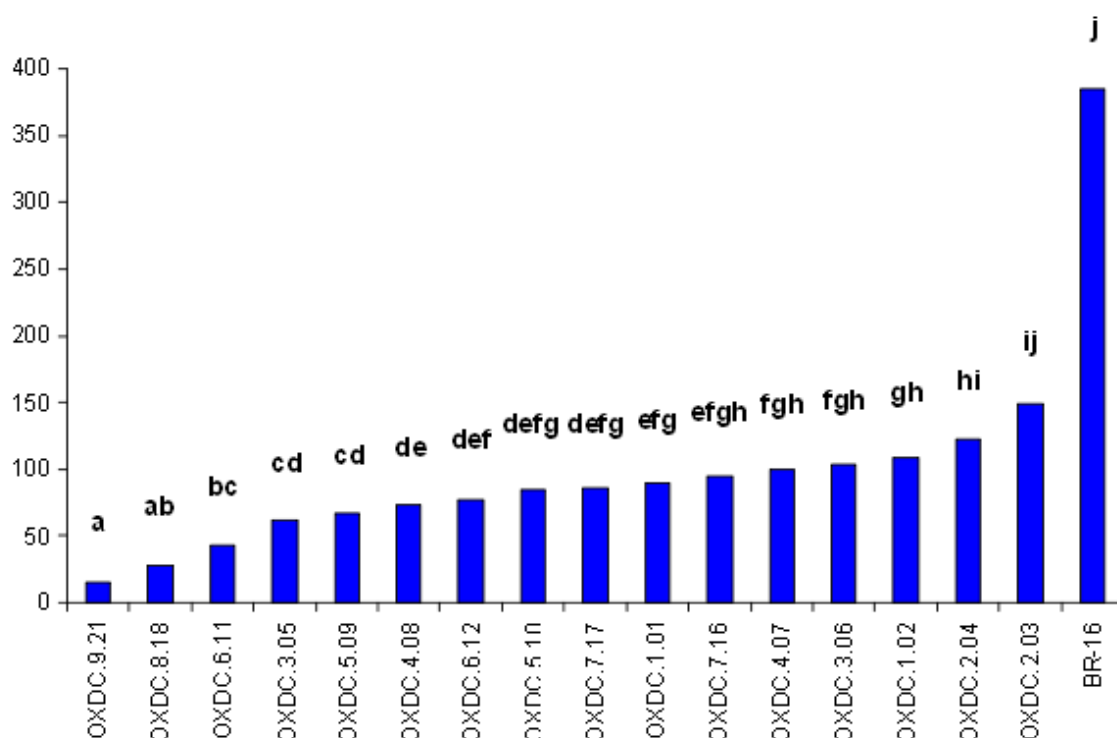


Figura 7. Severidade da doença dos eventos *oxdc* e do controle não transgênico (BR-16) medida pelo cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AUDPC). Letras iguais presentes acima das barras de média indicam que os eventos não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste de Kruskal-Wallis.

Os resultados impetrados a partir da curva de progresso da doença e da severidade da doença utilizando o teste de inoculação da folha destacada com o fungo *S. sclerotiorum* sugerem que a expressão do gene da *oxdc* em soja confere

aumento do nível de resistência das plantas ao patógeno. Resultados similares foram previamente relatados em plantas de tabaco, tomate e alface transformadas para expressar o gene que codifica para a OXDC (Kesarwani et al., 2000; Dias et al., 2006; Walz et al., 2008b). Paralelamente, e seguindo estratégia similar, a expressão da enzima OXO em plantas transgênicas de soja, girassol, canola, amendoim e tomate também culminou no aumento do nível de resistência a *Sclerotinia* (Donaldson et al., 2001; Cober et al., 2003; Hu et al., 2003; Livingstone et al., 2005; Dong et al., 2008; Walz et al., 2008a).

Com o objetivo de verificar a correlação entre a resistência da planta ao fungo *S. sclerotiorum* e o nível de transcritos do gene *oxdc*, foi realizada a análise de RT-PCR utilizando folhas extraídas do controle (repetição 1) e das plantas transgênicas OXDC.6.11.7 (repetição 7 do evento OXDC.6.11) e OXDC.9.21.2 (repetição 2 do evento OXDC.9.21). A planta OXDC.6.11.7 apresentou resistência parcial a *S. sclerotiorum* enquanto que a OXDC.9.21.2 exibiu o maior nível de resistência a *S. sclerotiorum* (Figura 8). A análise de RT-PCR revelou a presença de transcritos do gene *oxdc* apenas nas plantas transgênicas OXDC.9.21.2 e OXDC.6.11.7 (Figura 9). Por sua vez, a planta OXDC.9.21.2, que apresentou alto nível de resistência a *S. sclerotiorum*, obteve nível de transcritos 2,75 vezes maior que a planta OXDC.6.11.7, que acusou moderada resistência ao fungo (Figura 9). Estes resultados sugerem que a expressão do gene *oxdc* está associada à resistência ao fungo, e que o nível de resistência é dependente do nível de expressão do transgene. A associação entre a presença do gene e a resistência é também apoiada pelo fato de que todos os eventos transgênicos apresentaram algum nível de resistência ao patógeno quando comparados com o controle.

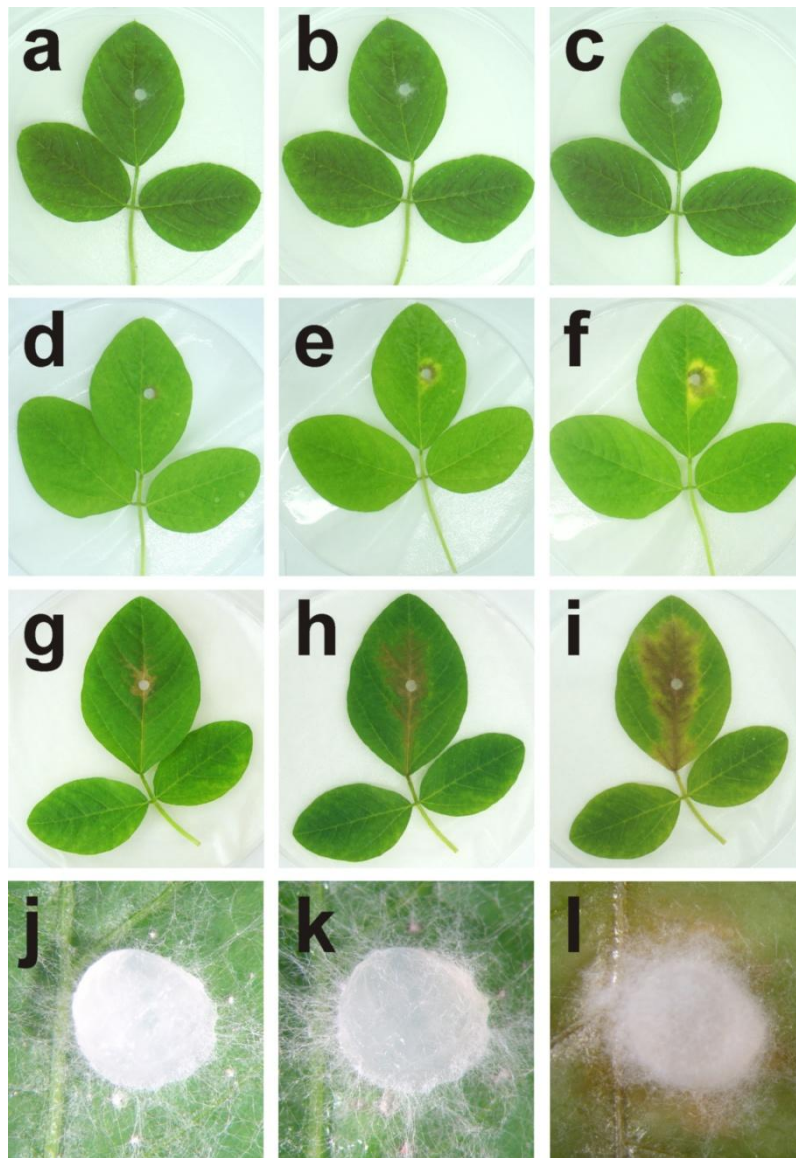


Figura 8. Resposta a *S. sclerotiorum* obtida pela inoculação de folhas destacadas com discos de micélio. Detalhe do trifólio da planta OXDC.9.21.2 após 42 (a), 66 (b) e 90 (c) horas. Detalhe do trifólio da planta OXDC.6.11.7 após 42 (d), 66 (e) e 90 (f) horas. Detalhe do trifólio da repetição 1 do controle BR-16 após 42 (g), 66 (h) e 90 (i) horas. Detalhe do crescimento do micélio na folha da planta OXDC.9.21.2 após 90 (j) e 114 (k) horas e no controle BR-16 após 90 (l) horas.

Os resultados obtidos pela análise de RT-PCR corroboram com estudos realizados previamente que correlacionaram o nível de resistência ao fungo *S.*

*sclerotiorum* ao nível de transcritos do gene *oxdc* e da atividade da enzima OXDC (Dias et al., 2006; Walz et al., 2008b). Kesarwani et al. (2000) observaram que o nível de expressão da enzima OXDC, em plantas transgênicas de fumo, foi cinco vezes maior quando direcionada para o vacúolo em comparação com o citosol. Sendo assim, o uso de construções utilizando peptídeos sinais que direcionam a expressão do gene *oxdc* para o vacúolo da planta apresenta-se como estratégia potencial para o desenvolvimento de cultivares resistentes ao mofo branco.

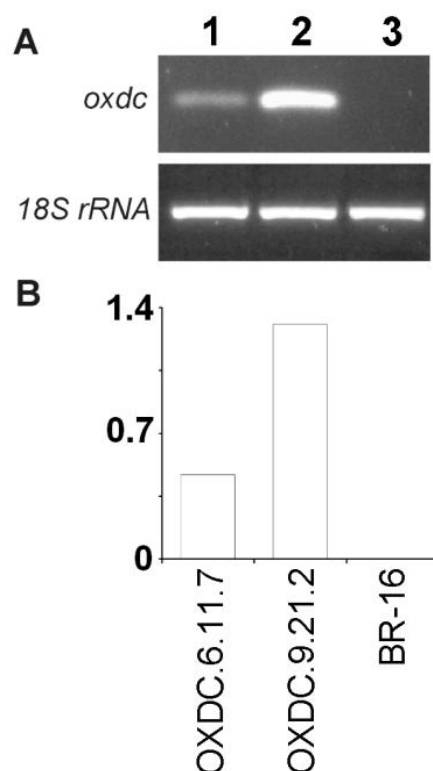


Figura 9. (A) RT-PCR para a detecção da expressão do transgene *oxdc* e do gene endógeno *18S rRNA* nas plantas transgênicas OXDC.6.11.7 e OXDC.9.21.2 e no controle (BR-16). (B) Quantificação da expressão do gene *oxdc* relativa à do *18S rRNA*.

O evento OXDC.9.21, que apresentou a menor severidade nos testes realizados utilizando o método da folha destacada, foi selecionado para a

caracterização adicional por Southern *blot*. Os resultados revelaram que todas as plantas analisadas do evento OXDC.9.21 possuem duas cópias do gene *oxdc* e o mesmo padrão de integração (Figura 10). Este fato suplanta, pelo menos para este evento, a decisão de considerarmos cada planta testada como uma repetição.

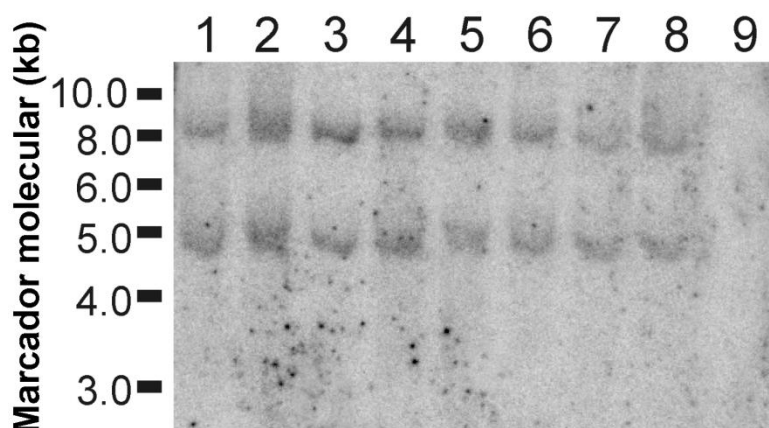


Figura 10 Análise da presença do transgene *oxdc* nas plantas transgênicas do evento OXDC.9.21 (1 a 8). Planta controle BR-16 (9).

Os resultados obtidos no presente estudo suportam a hipótese que o AO produzido pelo fungo exerce função estratégica durante o processo de infecção do hospedeiro e que a introdução de genes capazes de produzir enzimas que degradam este ácido é aplicável ao desenvolvimento de linhagens de soja resistentes a *S. sclerotiorum*. Previamente, Donaldson et al. (2001) verificaram que plantas de soja transformadas com o gene *oxo* apresentaram redução do progresso da doença, quando comparadas com o controle, em testes realizados utilizando os métodos de inoculação de cotilédones e inoculação da haste com o fungo *S. sclerotiorum* (Donaldson et al., 2001). Uma das linhagens obtidas por

Donaldson et al. (2001) avaliada em testes a campo apresentou resistência parcial ao mofo branco da soja com índices de severidade inferior a testemunha irmã não transgênica (Cober et al., 2003).

Em contraste com o trabalho realizado por Donaldson et al. (2001), os eventos transgênicos obtidos neste estudo expressam a OXDC e, por conseqüência, não produzem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicional no sistema. Embora, comumente apresentado como importante componente do sistema de defesa das plantas a patógenos, o papel do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na interação *Sclerotinia* x planta, mesmo que não totalmente esclarecido, parece atuar como facilitador do desenvolvimento do fungo. Recentes estudos (Kim et al., 2008; Walz et al., 2008b) concluíram que, no início do processo de infecção (pH > 5), o AO secretado pelo fungo *S. sclerotiorum* induz o aumento dos níveis de espécies ativas de oxigênio (ROS), tais como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que dispara a morte celular programada (PCD) e conduz a reação de hipersensibilidade (HR). Por ser um fungo necrotrófico, a morte celular produzirá o ambiente favorável ao seu desenvolvimento e fornecerá o suprimento necessário para a infecção e colonização do hospedeiro. Em concordância, plantas transgênicas de tabaco e *A. thaliana* incapazes de incitar a HR apresentaram maior nível de resistência à *S. sclerotiorum* (Govrin & Levin, 2000; Dickman et al. 2001). Todavia, em termos práticos, estudos adicionais são necessários para determinar a melhor estratégia visando o desenvolvimento de plantas resistentes a *S. sclerotiorum* via introdução de genes capazes de gerar enzimas que degradam o AO.

Por fim, visando o desenvolvimento de variedades de soja resistentes a *S. sclerotiorum* faz-se necessário a introdução dos materiais obtidos nesse trabalho em programas de seleção recorrente, utilizando no cruzamento outras fontes de tolerância ao mofo branco. Bidney et al (2000) indica que o cruzamento entre linhagens que expressam enzimas capazes de degradar o AO com linhagens tolerantes ao mofo branco determina aumento significativo da resistência ao patógeno. Nesse estudo, o autor demonstra que o efeito sinérgico da expressão de enzimas como a OXO e OXDC em materiais tolerante a *S. sclerotiorum* provê imunidade ou significativo aumento da resistência em plantas de girassol e canola.

## 5 – CONCLUSÕES

A expressão do gene *oxdc* em soja confere aumento do nível de resistência das plantas ao fungo *S. sclerotiorum*.

Os resultados obtidos no presente estudo suportam a hipótese que o AO produzido pelo fungo possui importante papel na interação *Sclerotinia* x Soja e que a introdução de genes capazes de produzir enzimas que degradam este ácido é aplicável ao desenvolvimento de linhagens de soja resistentes a *S. sclerotiorum*.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams PB, Ayers WA: Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69: 896-899 (1979).
2. Aragão FJL, Sarokin L, Vianna GR, Rech EL: Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plants at a high frequency. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 1-6 (2000).
3. Arahana VS, Graef GL, Specht JE, Steadman JR, Eskridge KM: Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Crop Science* 41: 180-188 (2001).
4. Bateman DF, Beer SV: Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotinia rolfsii*. *Phytopathology* 55: 204-11 (1965).
5. Bidney DL, Scelonge CJ, Charne DG, Mancl MK, Falak I, Nazarian KAP, Cole GS: Production of pathogen resistant plants. United States Patent 6166291 (2000).
6. Boland GJ, Hall R: Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16: 93-108 (1994).
7. Bolton MD, Thomma BPHJ, Nelson BD: *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology* 7: 1-16 (2006).

8. Cessna SG, Sears VE, Dickman MB, Low PS: Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant Cell* 12: 2191-2199 (2000).
9. Chen C, Harel A, Gorovoits R, Yarden O, Dickman MB: MAPK regulation of sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum* is linked with pH and cAMP sensing. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 404-413 (2004).
10. Chen Y, Wang D: Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 89: 1268-1272 (2005).
11. Chun D, Kao LB, Lockwood JL, Isleib TG: Laboratory and field assessment of resistance in soybean to stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 71: 811-815 (1987).
12. Cober ER, Rioux S, Rajcan I, Donaldson PA, Simmonds DH: Partial resistance to white mold in a transgenic soybean line. *Crop Science* 43: 92-95 (2003).
13. Danielson GA, Nelson BD, Helms TC: Effect of *Sclerotinia* stem rot on yield of soybean inoculated at different growth stages. *Plant Disease* 88: 297-300 (2004).
14. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB: A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21 (1983).
15. Dias BBA, Cunha WG, Morais LS, Vianna GR, Rech EL, Capdeville Gd, Aragão FJL: Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology* 55: 187-193 (2006).

16. Dickman MB, Park YK, Oltersdorf T, Li W, Clemente T, French R: Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 6957-6962 (2001).
17. Donaldson PA, Anderson T, Lane BG, Davidson AL, Simmonds DH: Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59: 297-307 (2001).
18. Dong X, Ji R, Guo X, Foster SJ, Chen H, Dong C, Liu Y, Hu Q, Liu S: Expressing a gene encoding wheat oxalate oxidase enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Planta* 228: 331-340 (2008).
19. Doyle JJ, Doyle JL: Genomic Plant DNA preparation from fresh tissue: CTAB method. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-14 (1987).
20. Dutton MV, Evans CS: Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 881–895 (1996).
21. Favaron F, Sella L, D'Ovidio R: Relationships among endo-polygalacturonase, oxalate, pH, and plant polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in the interaction between *Sclerotinia sclerotiorum* and soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 1402-1409 (2004).
22. Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT, Pennington JS: Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science* 11: 929-931 (1971).

23. Ferrar PH, Walker JRL: o-Diphenol oxidase inhibition-an additional role for oxalic acid in the phytopathogenic arsenal of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium rolfsii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 43: 415-422 (1993).
24. Godoy G, Steadman JR, Dickman MB, Dam R: Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37: 179-191 (1990).
25. Govrin EM, Levine A: The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10: 751-757 (2000).
26. Guimarães RL, Stotz HU: Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. *Plant Physiology* 136: 3703-3711 (2004).
27. Guo X, Wang D, Gordon SG, Helliwell E, Smith T, Berry SA, St Martin SK, Dorrance AE: Genetic mapping of QTLs underlying partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean PI 391589A and PI 391589B. *Crop Science* 48: 1129-1139 (2008).
28. Hancock JC: Degradation of pectic substances associated with pathogenesis by *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower and tomato stems. *Phytopathology* 56: 975–979 (1966).
29. Higgins BB: Physiology and parasitism of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Phytopathology* 17: 417-448 (1927).

30. Hoffman DD, Hartman GL, Mueller DS, Leits RA, Nickell CD, Pedersen WL: Yield and seed quality of soybean cultivars infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 82: 826-829 (1998).
31. Hu X, Bidney DL, Yalpani N, Duvick JP, Crasta O, Folkerts O, Lu GH: Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology* 133: 170-181 (2003).
32. Kay R, Chan A, Daly M, McPherson J: Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236: 1299-1302 (1987).
33. Kesarwani M, Azam M, Natarajan K, Mehta A, Datta A: Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*. Molecular cloning and its overexpression to confer resistance to fungal infection in transgenic tobacco and tomato. *Journal of Biological Chemistry* 275: 7230-7238 (2000).
34. Kim HS, Diers BW: Inheritance of partial resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean. *Crop Science* 40: 55-61 (2000).
35. Kim HS, Hartman GL, Manandhar JB, Graef GL, Steadman JR, Diers BW: Reaction of soybean cultivars to *Sclerotinia* stem rot in field, greenhouse, and laboratory evaluations. *Crop Science* 40: 665-669 (2000).
36. Kim KS, Dickman MB, Min JY: Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 605-612 (2008).

37. Kolkman JM, Kelly JD: An indirect test using oxalate to determine physiological resistance to white mold in common bean. *Crop Science* 40: 281-285 (2000).
38. Kritzman G, Chet I, Henis Y: The role of oxalic acid in the pathogenic behavior of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Experimental Mycology* 1: 280-285 (1977).
39. Kruskal WH, Wallis WA: Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47: 583–621 (1952).
40. Kull LS, Vuong TD, Powers KS, Eskridge KM, Steadman JR, Hartman GL: Evaluation of resistance screening methods for *Sclerotinia* stem rot of soybean and dry bean. *Plant Disease* 87: 1471-1476 (2003).
41. Kurian P, Stelzig DA: The synergistic role of oxalic acid and endopolygalacturonase in bean leaves infected by *Cristulariella pyramidalis*. *Phytopathology* 69: 1301–1304 (1979).
42. Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583–593. (1994).
43. Livingstone DM, Hampton JL, Phipps PM, Grabau EA: Enhancing resistance to *Sclerotinia minor* in peanut by expressing a barley oxalate oxidase gene. *Plant Physiology* 137: 1354-1362 (2005).
44. Lumsden RD: *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean and the production of cellulase. *Phytopathology* 59: 653–657 (1969).

45. Magro P, Marciano P, Di Lenna P: Oxalic acid production and its role in pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. FEMS Microbiology Letters 24: 9-12 (1984).
46. Marciano P, Di Lenna P, Magro P: Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. Physiological Plant Pathology 22: 339-345 (1983).
47. Maxwell DP, Lumsden RD: Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture. Phytopathology 60: 1395–1398 (1970).
48. Mehta A, Datta A: Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*. Purification, characterization, and cDNA cloning. The Journal of Biological Chemistry 266: 23548-23553 (1991).
49. Noyes RD, Hancock JG: Role of oxalic acid in the *Sclerotinia* wilt of sunflower. Physiological Plant Pathology 18: 123-132 (1981).
50. Pierson PE, Rhodes LH: Effect of culture medium on the production of oxalic acid by *Sclerotinia trifoliorum*. Mycologia 84: 467-469 (1992).
51. Purdy LH: *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. Phytopathology 69: 875-880 (1979).
52. Rech EL, Vianna GR, Aragão FJL: High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. Nature Protocols 3: 410-418 (2008).

53. Resende MLV, Salgado SML, Chaves ZM: Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira* 28: 123-130 (2003).
54. Riou C, Freyssinet G, Fevre M: Production of cell wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1478-1484 (1991).
55. Rollins JA: The *Sclerotinia sclerotiorum pac1* gene is required for sclerotial development and virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 785-795 (2003).
56. Rollins JA, Dickman MB: pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: Identification of a *pacC/RIM1* homolog. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 75-81 (2001).
57. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning : a laboratory manual* / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. (1989).
58. Shaner G, Finney RE: The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67: 1051-1056 (1977).
59. Stone HE, Armentrout VN: Production of oxalic acid by *Sclerotinia cepivorum* during infection of onion. *Mycologia* 77: 526–530 (1985).
60. Tenhaken R, Levine A, Brisson LF, Dixon RA, Lamb C: Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 4158-4163 (1995).



61. Thomma BPHJ, Penninckx IAMA, Broekaert WF, Cammue BPA: The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology* 13: 63–68 (2001).
62. Tu JC: Tolerance of white bean (*Phaseolus vulgaris*) to white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) associated with tolerance to oxalic acid. *Physiological Plant Pathology* 26: 111-117 (1985).
63. Vale FXR, Fernandes Filho EI, Liberato JR: Quant. A software for plant disease severity assessment. In: 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch, New Zealand: 105 (2003).
64. Vuong TD, Diers BW, Hartman GL: Identification of QTL for resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean plant introduction 194639. *Crop Science* 48: 2209-2214 (2008).
65. Vuong TD, Hoffman DD, Diers BW, Miller JF, Steadman JR, Hartman GL: Evaluation of soybean, dry bean, and sunflower for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Crop Science* 44: 777-783 (2004).
66. Walz A, Zingen-Sell I, Loeffler M, Sauer M: Expression of an oxalate oxidase gene in tomato and severity of disease caused by *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology* 57: 453-458 (2008a).
67. Walz A, Zingen-Sell I, Theisen S, Kortekamp A: Reactive oxygen intermediates and oxalic acid in the pathogenesis of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology* 120: 317-330 (2008b).
68. Wang Z, Song J, Zhang Y, Yang B, Wang Y, Chen S: Mechanism analysis of broad-spectrum disease resistance induced by expression of anti-

- apoptotic *p35* gene in tobacco. Chinese Journal of Biotechnology 24: 1707-1713 (2008).
69. Wegulo SN, Yang XB, Martinson CA: Soybean cultivar responses to *Sclerotinia sclerotiorum* in field and controlled environment studies. Plant Disease 82: 1264-1270 (1998).
  70. Wharton P, Kirk W: White Mold Michigan Potato Diseases Series; MSU Extension bulletin E-2989 (2007).
  71. Wrather JA, Koenning SR: Effects of diseases on soybean yields in the United States 1996 to 2007. Plant Health Progress: doi:10.1094/PHP-2009-0401-01-RS (2009).
  72. Yang XB, Lundeen P, Uphoff MD: Soybean varietal response and yield loss caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease 83: 456-461 (1999).

## **ANEXOS**

## ANEXO A

- Figura 1A. Folhas de plantas não transgênicas da variedade BR-16 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm. ... 57
- Figura 2A. Folhas do evento OXDC.1.01 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm..... 58
- Figura 3A. Folhas do evento OXDC.1.02 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm..... 59
- Figura 4A. Folhas do evento OXDC.2.03 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm..... 60
- Figura 5A. Folhas do evento OXDC.2.04 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm..... 61
- Figura 6A. Folhas do evento OXDC.3.05 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm..... 62
- Figura 7A. Folhas do evento OXDC.3.06 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm..... 63
- Figura 8A. Folhas do evento OXDC.4.07 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm..... 64

Figura 9A. Folhas do evento OXDC.4.08 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo <i>S. sclerotiorum</i> . O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.....	65
Figura 10A. Folhas do evento OXDC.5.09 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo <i>S. sclerotiorum</i> . O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.....	66
Figura 11A. Folhas do evento OXDC.5.10 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo <i>S. sclerotiorum</i> . O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.....	67
Figura 12A. Folhas do evento OXDC.6.11 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo <i>S. sclerotiorum</i> . O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.....	68
Figura 13A. Folhas do evento OXDC.6.12 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo <i>S. sclerotiorum</i> . O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.....	69
Figura 14A. Folhas do evento OXDC.7.16 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo <i>S. sclerotiorum</i> . O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.....	70
Figura 15A. Folhas do evento OXDC.7.17 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo <i>S. sclerotiorum</i> . O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.....	71
Figura 16A. Folhas do evento OXDC.8.18 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo <i>S. sclerotiorum</i> . O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.....	72

- Figura 17A. Folhas do evento OXDC.9.21 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm..... 73
- Figura 18A. Folhas de plantas não transgênicas da variedade BR-16 após 114 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm..... 74
- Figura 19A. Folhas do evento OXDC.9.21 após 114 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm..... 75

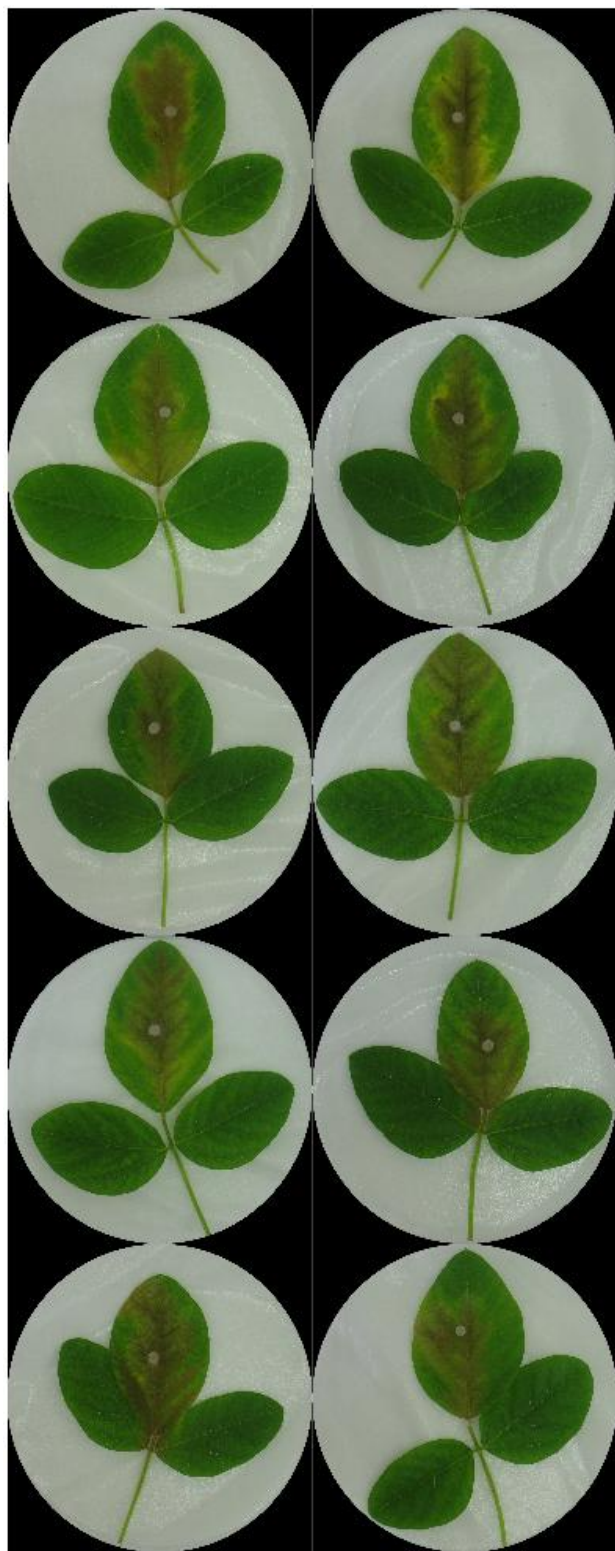


Figura 1A. Folhas de plantas não transgênicas da variedade BR-16 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.

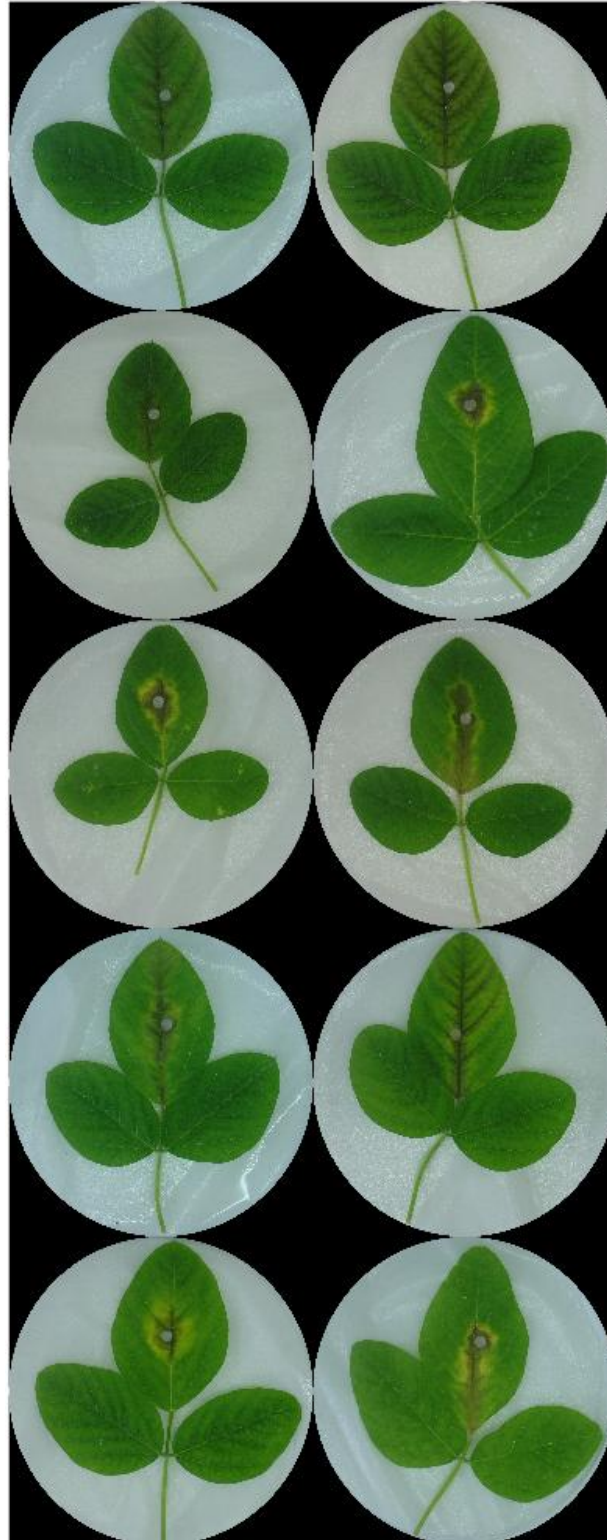


Figura 2A. Folhas do evento OXDC.1.01 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.





Figura 3A. Folhas do evento OXDC.1.02 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.

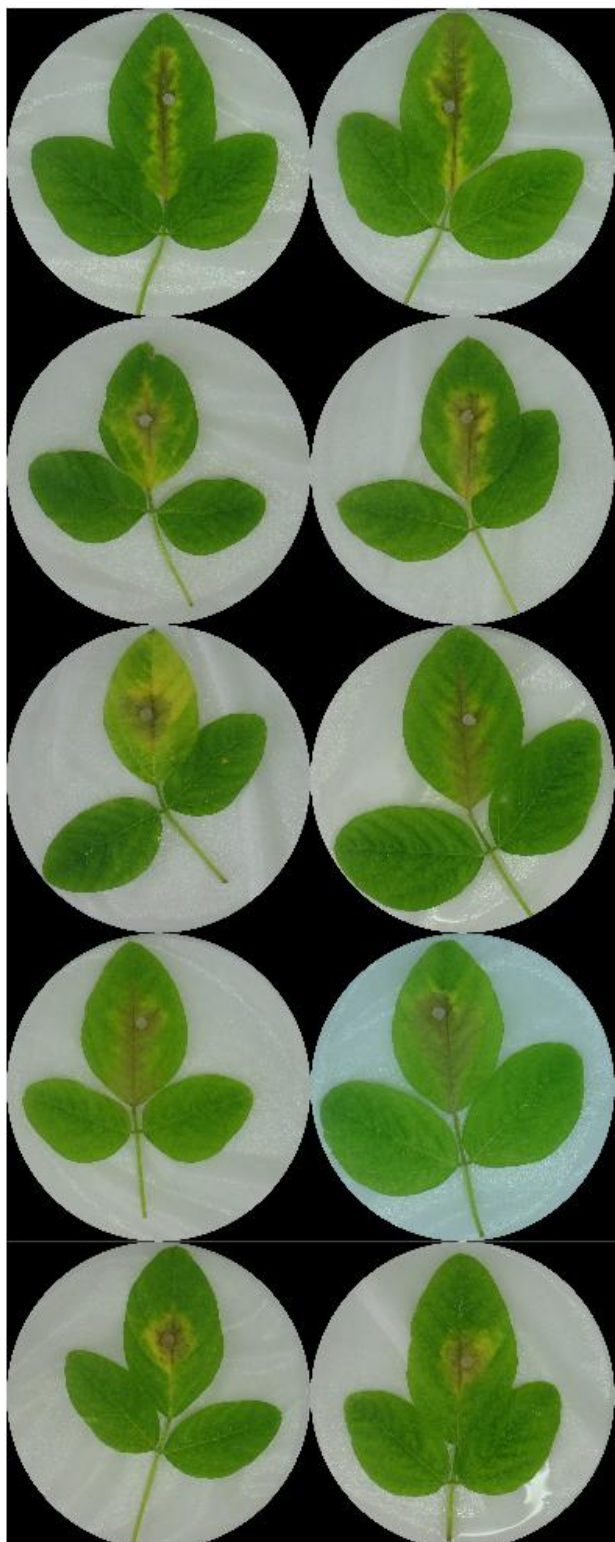


Figura 4A. Folhas do evento OXDC.2.03 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.



Figura 5A. Folhas do evento OXDC.2.04 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.



Figura 6A. Folhas do evento OXDC.3.05 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.



Figura 7A. Folhas do evento OXDC.3.06 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.



Figura 8A. Folhas do evento OXDC.4.07 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.

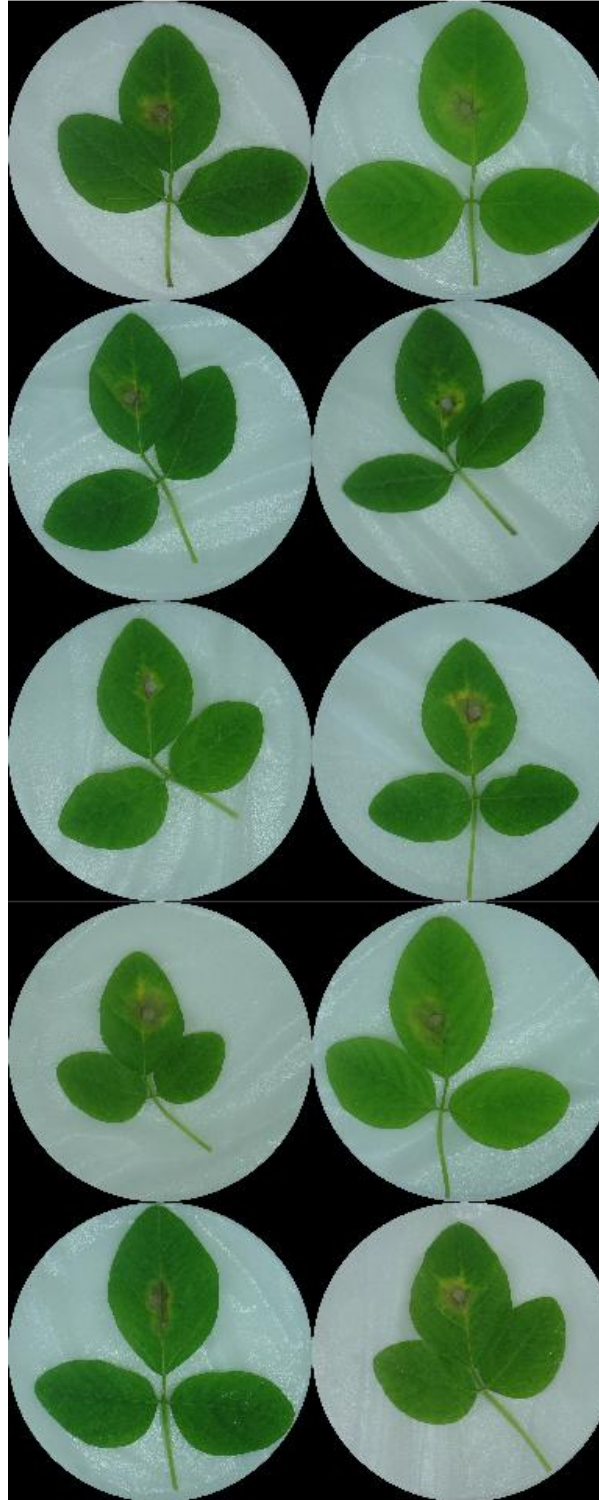


Figura 9A. Folhas do evento OXDC.4.08 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.



Figura 10A. Folhas do evento OXDC.5.09 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.





Figura 11A. Folhas do evento OXDC.5.10 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.



Figura 12A. Folhas do evento OXDC.6.11 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.



Figura 13A. Folhas do evento OXDC.6.12 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.

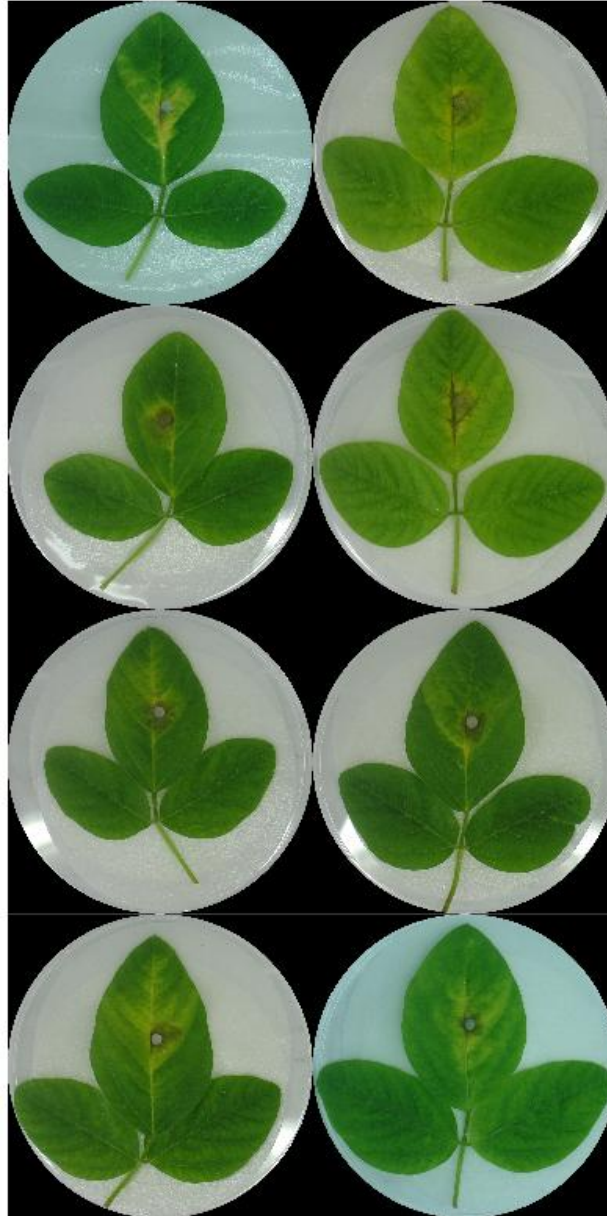


Figura 14A. Folhas do evento OXDC.7.16 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.

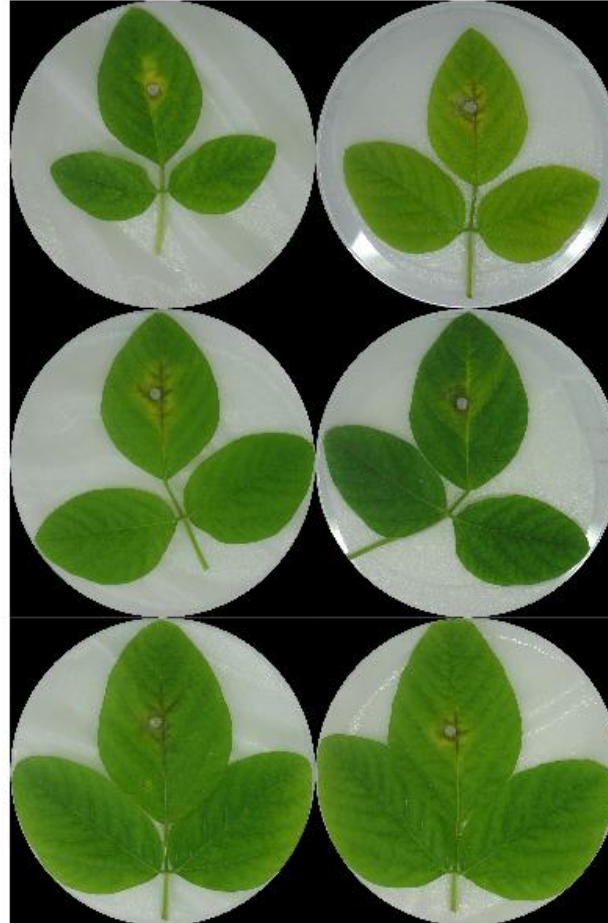


Figura 15A. Folhas do evento OXDC.7.17 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.



Figura 16A. Folhas do evento OXDC.8.18 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.

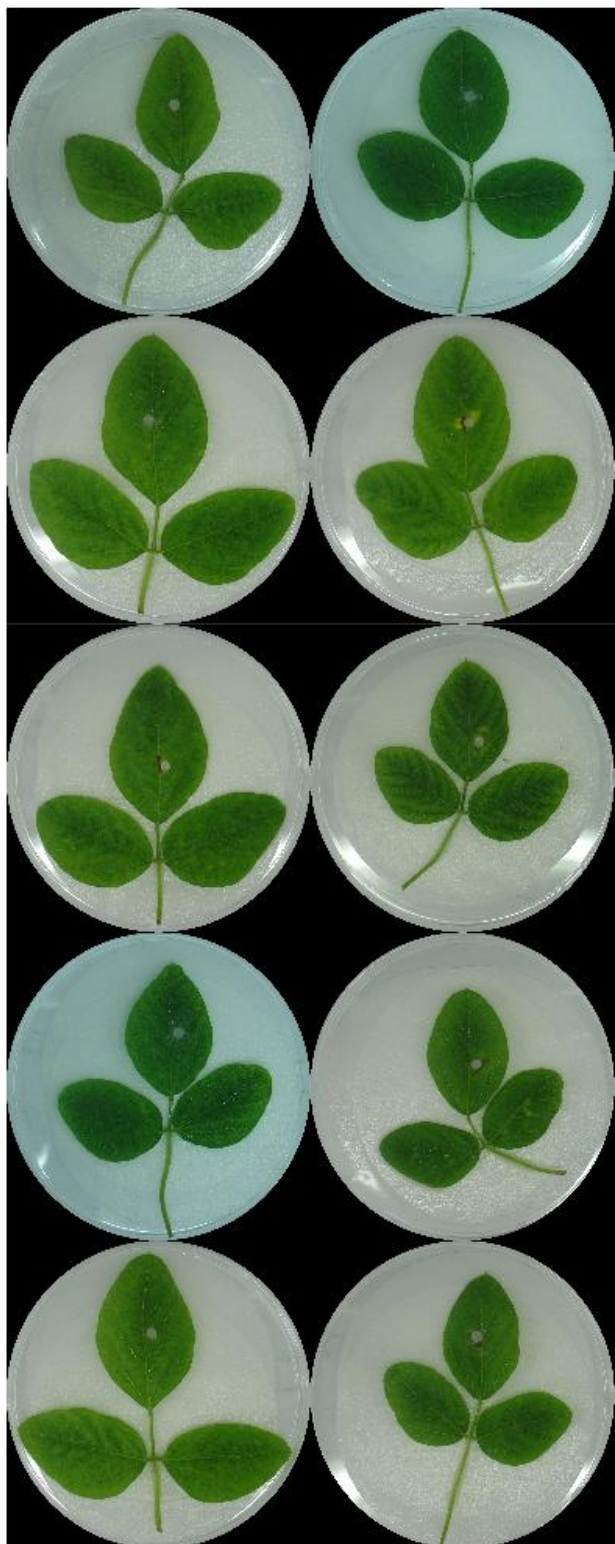


Figura 17A. Folhas do evento OXDC.9.21 após 90 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.

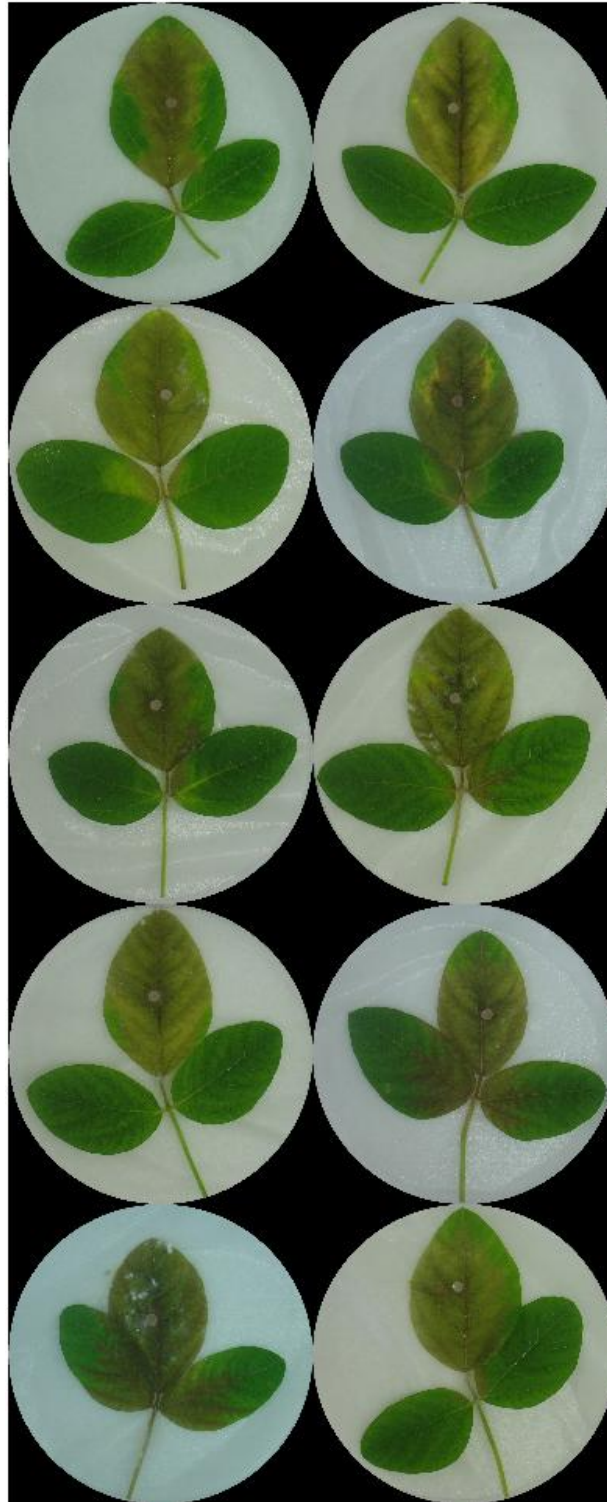


Figura 18A. Folhas de plantas não transgênicas da variedade BR-16 após 114 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.



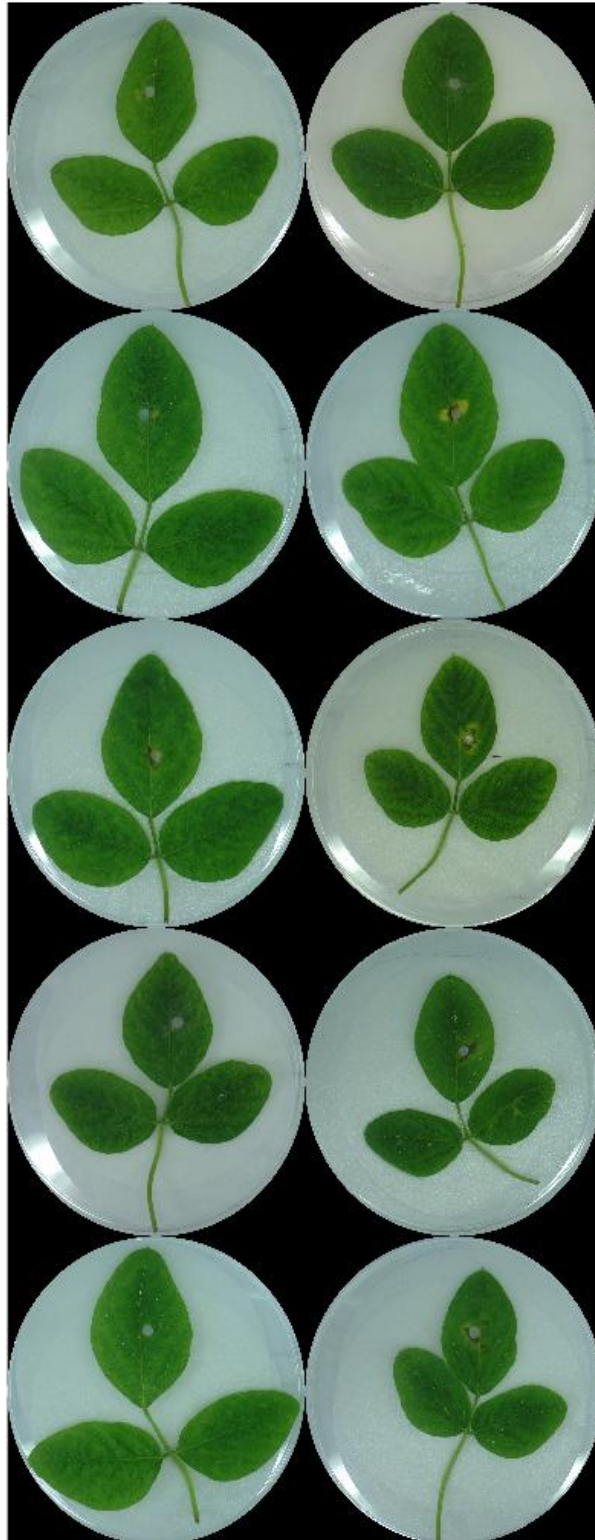


Figura 19A. Folhas do evento OXDC.9.21 após 114 horas do posicionamento dos discos de micélio do fungo *S. sclerotiorum*. O diâmetro do círculo no qual as folhas estão contidas possui 15 cm.

## ANEXO B

- Artigo 1B. Cunha WG, Tinoco MLP, Pancoti HL, Ribeiro RE, Aragão FJL: High resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic soybean plants transformed to express an oxalate decarboxylase gene. Plant Pathology Doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02279.x (2010).....77
- Artigo 2B. Dias BBA, Cunha WG, Morais LS, Vianna GR, Rech EL, Capdeville Gd, Aragão FJL: Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Pathology 55: 187-193 (2006).....84

## High resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic soybean plants transformed to express an oxalate decarboxylase gene

W. G. Cunha<sup>ab</sup>, M. L. P. Tinoco<sup>ab</sup>, H. L. Pancoti<sup>a</sup>, R. E. Ribeiro<sup>a</sup> and F. J. L. Aragão<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte, 70770-916, Brasília; and <sup>b</sup>Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Campus Universitário, 70910-900 Brasília, DF, Brazil

Pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum* (white mould) has been associated with fungal secretion of oxalic acid (OA). Enzymes capable of degrading OA have been utilized to produce transgenic resistant plants. Transgenic soybean lines containing the decarboxylase gene (*oxdc*) isolated from a *Flammulina* sp. were produced by the biolistic process. Molecular analysis revealed successful incorporation of the gene into the plant genome and showed that the *oxdc* gene was transferred to the progeny plants. Sixteen T<sub>2</sub> transgenic events were screened for *S. sclerotiorum* resistance using a detached leaf assay. The white mould disease progress curve displayed a significant delay in symptom development in all *oxdc* events compared with the nontransgenic genotype. Area under the disease progress curve (AUDPC) showed reduction in severity ranging from 61% to 96% comparing the *oxdc* events with the nontransgenic control. One event (OXDC.9.21) presented some plants that did not show any symptoms after 92 h. RT-PCR analysis for detection of *oxdc* gene transcripts suggested that expression of the *oxdc* gene is associated with resistance to *S. sclerotiorum*.

Keywords: oxalate decarboxylase, oxalic acid, transgenic soybean, white mould

### Introduction

White mould, caused by the necrotrophic ascomycete fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, is a worldwide disease. The fungus infects more than 400 plant species, including important crops such as cotton, tomato, sunflower, dry bean and soybean (Boland & Hall, 1994). In soybean, the disease is also called *Sclerotinia* stem rot (SSR) and its incidence causes significant damage to yield and grain quality. For an increase of 10% in disease incidence the yield losses range from 83 to 335 kg ha<sup>-1</sup> (Danielson et al., 2004). SSR is one of the most important soybean diseases in the USA and Brazil and these countries are responsible for more than 60% of total world soybean production. In the USA, SSR is generally found in farms in the states of Iowa, Illinois, Minnesota, Nebraska and Pennsylvania (Wrather & Koenning, 2009). Historically, these states produce about 55% of the total soybean produced in the USA ([http://www.nass.usda.gov/Statistics\\_by\\_Subject/index.asp](http://www.nass.usda.gov/Statistics_by_Subject/index.asp)). In 2004, when climatic conditions were favourable to the pathogen's development, the soybean yield suppression caused by SSR was more than 60 million bushels (Wrather & Koenning,

2009). In Brazil, the disease usually occurs in the southern states and in highland areas of the Central Region. In these regions, yield losses of up to 60% have been verified (L.H.C. da Silva, FESURV, Brazil, personal communication).

Disease control management is concentrated on agronomic practices, such as planting under tillage, use of lodging resistant varieties, wide-row planting and rotation with non-host crops. However, in favourable environmental conditions for pathogen development, these practices are not enough. Recommended chemical control has poor efficiency due to low penetration and uneven distribution of fungicides, caused by the already formed plant canopy, since the infection starts at the plant's reproductive stage. Additionally, the use of fungicides for SSR control increases production costs. Consequently, resistant varieties would be the best alternative for SSR management. However, such a disease is difficult to control genetically where breeding programmes have had limited success. Genetic resistance to *S. sclerotiorum* is complex, has low heritability and is restricted to a few lines that have shown only partial resistance (Kim & Diers, 2000; Vuong et al., 2008). In addition, the plant escape mechanisms (flowering date, plant height, lodging, canopy architecture and maturity) and environmental conditions make SSR resistance evaluations difficult in the field.

\*E-mail: aragao@cenargen.embrapa.br

Previous studies showed that some of the identified quantitative trait loci (QTL) for resistance to SSR were associated with escape mechanisms (Kim & Diers, 2000). For these reasons, soybean breeding has not made available a SSR-resistant variety on the market.

Previous studies provided evidence for the involvement of oxalic acid (OA) in *S. sclerotiorum* pathogenesis and OA tolerance has been correlated to disease tolerance (Bateman & Beer, 1965; Maxwell & Lumsden, 1970; Noyes & Hancock, 1981; Marciano et al., 1983; Magro et al., 1984; Tu, 1985; Godoy et al., 1990; Wegulo et al., 1998; Cessna et al., 2000; Kolkman & Kelly, 2000; Favaron et al., 2004; Guimarães & Stotz, 2004; Kim et al., 2008; Walz et al., 2008b). Treatment of healthy plants with OA or fungal culture filtrates resulted in foliar symptoms identical to those found in diseased plants (Bateman & Beer, 1965; Noyes & Hancock, 1981; Marciano et al., 1983). In addition, plants that showed in vitro and field tolerance to OA were more tolerant to *S. sclerotiorum* (Noyes & Hancock, 1981; Tu, 1985; Wegulo et al., 1998; Kolkman & Kelly, 2000) and mutants of *S. sclerotiorum* unable to synthesize OA were less pathogenic when compared with a wild type (Godoy et al., 1990). A potential alternative to developing an SSR-resistant soybean variety is the introduction of genes that generate enzymes capable of degrading the OA. Several transgenic plants expressing genes encoding enzymes that can metabolize OA, such as oxalate oxidases (OXO) and oxalate decarboxylases (OXDC), have shown an enhanced resistance to *S. sclerotiorum* (Kesarwani et al., 2000; Donaldson et al., 2001; Cober et al., 2003; Hu et al., 2003; Livingstone et al., 2005; Dias et al., 2006; Dong et al., 2008; Walz et al., 2008a). OXO catalyses the oxygen-dependent oxidation of oxalate to carbon dioxide and hydrogen peroxide. OXDC breaks down oxalate to generate carbon dioxide and formate in the absence of any cofactor requirement. In addition, OXDC is specific to OA and has high activity at acidic or neutral pH (Kesarwani et al., 2000).

The main goal of this research was to introduce an oxalate decarboxylase gene (*oxdc*) from a *Flammulina* sp. into the soybean genome in order to generate transgenic lines resistant to *S. sclerotiorum*.

## Materials and methods

### Plasmid vector and soybean transformation

The *oxdc* coding sequence was removed from pTO-POOxDc and cloned into the vector pUC19-35SdAMV-NOS, between the XbaI and BamHI sites, under the control of the doubled 35S promoter from Cauliflower mosaic virus and a sequence enhancer from Alfalfa mosaic virus (Dias et al., 2006). The *oxdc* expression cassette was excised with EcoRI and HindIII from the vector pOXDC (Dias et al., 2006) and inserted into the pBluKSP (Fermentas) to generate the pBluKSPOXDC vector. The *oxdc* cassette is composed of the *oxdc* coding sequence under control of the doubled 35S promoter from Cauli-

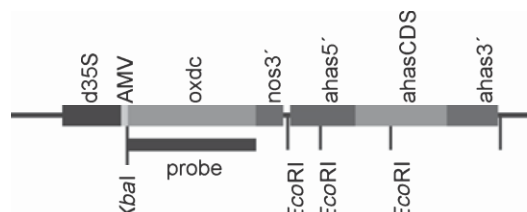


Figure 1 Diagram representing the pBluKSPOXDCAHAS transformation vector containing the *ahas* gene (*ahas5'*: *ahas* gene promoter; *ahasCDS*: *Arabidopsis thaliana* AHAS coding sequence; *ahas3'*: *ahas* gene terminator) and *oxdc* expression cassettes (*d35S*: doubled 35S promoter from Cauliflower mosaic virus; *AMV*: non-translated sequence enhancer from Alfalfa mosaic virus; *nos3'*: nopaline synthase terminator). Black bar represents the probe used in the Southern analysis.

flower mosaic virus and a sequence enhancer from Alfalfa mosaic virus, and *nos* gene terminator. The 5718-bp fragment containing the mutated *Arabidopsis thaliana* *ahas* gene (selectable marker that confers imidazolinone-specific resistance) was removed with XbaI from the vector pAC321 (Rech et al., 2008) and cloned into the SpeI site of the vector pBluKSPOXDC, resulting in the transformation vector pBluKSPOXDCAHAS (Fig. 1).

Soybean transformation was carried out according to Rech et al. (2008) and Aragão et al. (2000). Mature seeds of a commercial variety (BR-16) were surface-sterilized and soaked in distilled water for 18–20 h. The embryonic axes were excised from seeds, and the apical meristems were exposed by removing the primary leaves and bombarded as previously described by Aragão et al. (2000). Multiple shooting was induced by cultivating the embryonic axes in BAP-supplemented medium immediately after bombardment. As soon as the embryonic axes-derived shoots were 2–3 cm in length, they were individually transferred to a plastic pot containing a mixture of fertilized soil and vermiculite and acclimatized in a greenhouse to produce seeds. A total of 1152 explants were bombarded with the vector pBluKSPOXDCAHAS.

### PCR screening of transformed plants

The recovered plants and progenies were screened by PCR to detect the presence of the *oxdc* gene. Genomic DNA from young leaves was extracted by the CTAB method (Doyle & Doyle, 1987). The PCR analyses were carried out according to Aragão et al. (2002). The primers OXDC 371 (5'-CTCGGCAGCAGAATGAGGTC-3') and OXDC 873 (5'-TCGGCTCGACAGAGGAGAAG-3') were used to amplify a 522-bp sequence within the *oxdc* coding sequence.

### Detached leaf assays

The detached leaf assay was carried out using plants from the T<sub>2</sub> generation. Sclerotia were collected from a soybean infected field located in Distrito Federal (Brazil) and

cultured on potato dextrose agar (PDA) medium at room temperature to produce mycelia. To produce the inoculum for the detached leaf assays, a single 5 mm diameter mycelium plug was placed at the centre of a new PDA plate. The fresh culture was incubated at 20 °C for 2 days in the dark. Mycelial plugs with 5 mm diameter were cut from the growing margins and applied to the adaxial surface of the middle leaflet of the youngest fully-expanded trifoliate leaves detached from plants (at V3 stage, according to Fehr et al., 1971). Leaves were immediately placed on a Petri dish containing three moist filter papers and incubated at 20 °C in the dark. Leaves were photographed at three different times (42, 66 and 90 h) and images were used to measure the infected area using the QUANT v1.0.1 software (Vale et al., 2003). The area under the disease progress curve (AUDPC) was used to summarize the progress of disease severity according to Shaner & Finney (1977).

#### Southern blot analysis

Genomic DNA was isolated according to Dellaporta et al. (1983). Southern blotting and hybridization were carried out as previously described (Sambrook et al., 1989). Genomic DNA (15 µg), digested with EcoRI, was separated on a 1% agarose gel, blotted onto a nylon membrane (Hybond) and hybridized with the probe labelled with  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci mol<sup>-1</sup>) using a random primer DNA labelling kit (Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's instructions. The probe was obtained by digesting the pBluKSPOXDCAHAS with BamHI and XbaI to generate the 1350-bp fragment (corresponding to oxdc coding sequence) that was isolated from a 1% agarose gel and purified using the Wizard SV Gel Clean-Up System (Promega).

#### RT-PCR expression analysis

RT-PCR were carried out as described by Dias et al. (2006). The relative intensity of the bands was determined by scanning the PCR gel and analyzing the band intensity using the Quantity One program v4.6.3. Relative quantification was done by comparing intensities of the oxdc and 18S rRNA bands.

## Results

PCR analyses revealed the presence of the oxdc gene in 10 generated plantlets (Fig. 2). Each of the 10 oxdc

plants was considered a distinct T<sub>0</sub> event (named OXDC.1 to OXDC.10). All seeds from the T<sub>0</sub> events were planted in a greenhouse and the T<sub>1</sub> plants were screened by PCR to detect the presence of the oxdc gene. Transformants presented phenology (plant height, site of insertion of first pod, number of branches, internode length, foliar area, total number of flowers and pods) similar to the non-transformed plants. Seeds from 16 T<sub>1</sub> events (OXDC.1.01; OXDC.1.02; OXDC.2.03; OXDC.2.04; OXDC.3.05; OXDC.3.06; OXDC.4.07; OXDC.4.08; OXDC.5.09; OXDC.5.10; OXDC.6.11; OXDC.6.12; OXDC.7.16; OXDC.7.17; OXDC.8.18 and OXDC.9.21) were harvested to plant the T<sub>2</sub> generation.

About 10 PCR-positive plants of each oxdc event and 10 plants of the nontransgenic variety BR-16, which showed similar growing development in the greenhouse, were screened for *S. sclerotiorum* resistance using the detached leaf assay. The disease progress curve displayed a significant delay in the symptom development in all oxdc events compared with the nontransgenic genotype (Fig. 3). Some plants of the event OXDC.9.21 did not show any symptoms after 92 h. Extensive mycelia penetration was not observed using a stereomicroscope over a period of 90 h or even after 114 h (Fig. 4j–k). In the control plants, the lesions expanded across the whole leaf after 90 h (Fig. 4). The average of the infected area 90 h after inoculation ranged from 0.45 cm<sup>2</sup> (OXDC.9.21) to 7.19 cm<sup>2</sup> (OXDC.2.03) in the transgenic events, while in the control it was 17.60 cm<sup>2</sup>. The AUDPC showed a severity reduction of 96% (OXDC.9.21) to 61% (OXDC.2.03) comparing the oxdc events with the nontransgenic control.

RT-PCR analysis for detection of oxdc gene transcripts was carried out with one plant from event OXDC.9.21 (that exhibited the highest resistance to *S. sclerotiorum*), one plant of OXDC.6.11 (that presented partial resistance) and one of the nontransgenic genotypes. The transgenic events showed oxdc gene expression, while in the nontransgenic plant oxdc transcripts were not observed (Fig. 5).

Since the event OXDC.9.21 revealed the highest *S. sclerotiorum* resistance, it was selected for further characterization by Southern blot. Results revealed the presence of two integrated copies of the oxdc gene and that all transgenic plants analyzed from this event presented the same integration pattern (Fig. 6). DNA isolated from a nontransgenic plant did not hybridize with the oxdc coding sequence probe.

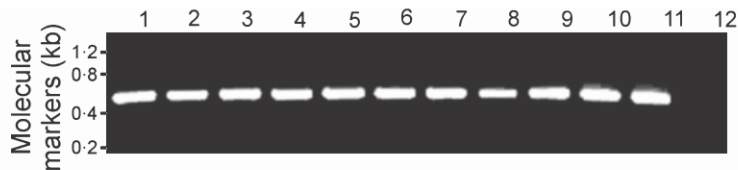


Figure 2 PCR analysis of putative transformed soybean plants for detection of the oxdc gene. Lanes 1–10: transgenic lines; lane 11: vector pBluKSPOXDCAHAS; lane 12: nontransgenic plant.

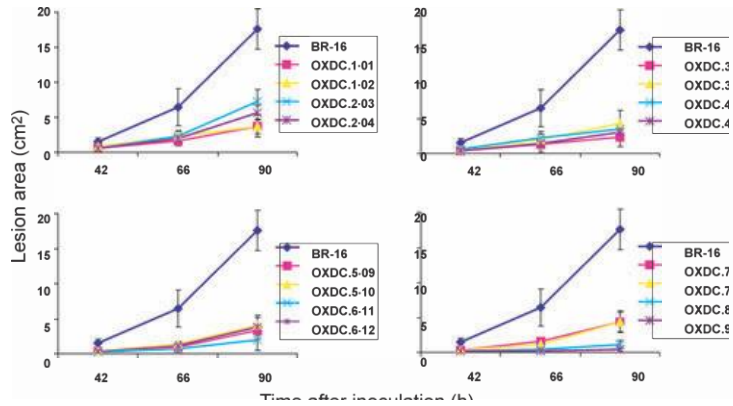


Figure 3 Disease progress curve of T<sub>2</sub> oxdc soybean transgenic events and the nontransgenic control (BR-16) obtained by the detached leaf assay using *Sclerotinia sclerotiorum* mycelial agar plug. The infected area measured in each time was an average of 10 different plant repetitions except for the OXDC.1.02, OXDC.2.04, OXDC.5.10, OXDC.7.16, OXDC.7.17 and OXDC.8.18 that were 9, 6, 4, 8, 6 and 9 repetitions, respectively. Bars = standard deviation.

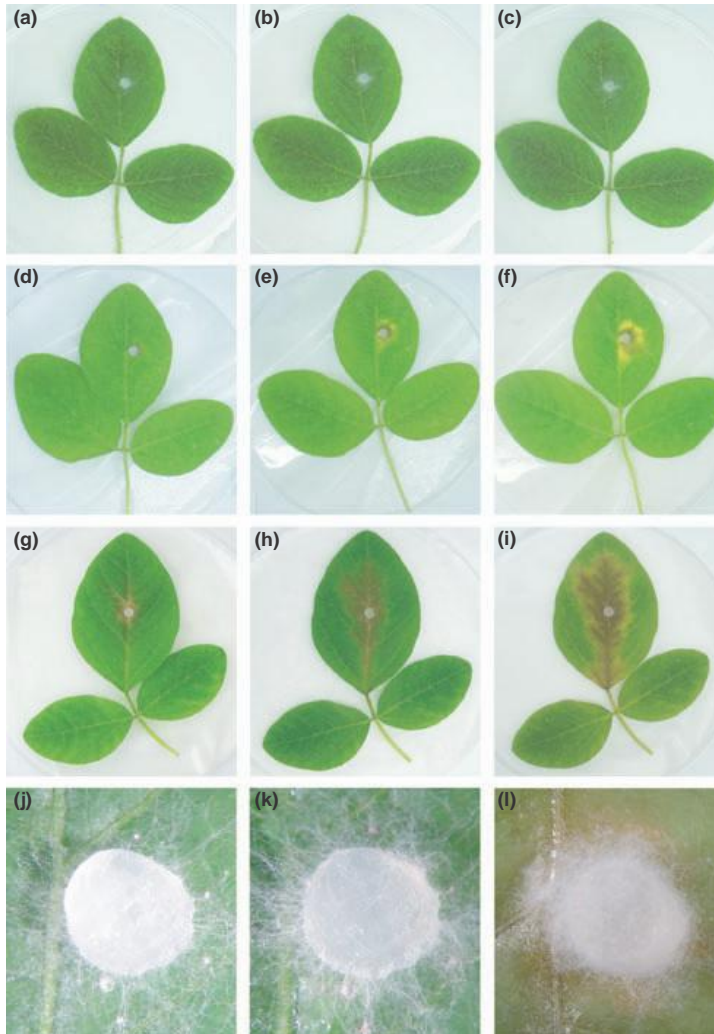


Figure 4 Resistance response of transgenic plants to *Sclerotinia sclerotiorum* inoculation. Symptoms were observed on detached leaves 42 h (a, d and g), 66 h (b, e and h) and 90 h (c, f and i) after inoculation of transgenic plants OXDC.9.21.2 (a–c), OXDC.6.11.7, (d–f) and nontransgenic control (g–i) with 5-mm mycelial agar plugs. Detail of soybean line OXDC.9.21.2 response to the mycelium of *S. sclerotiorum* growth 90 h (j) and 114 h (k) after inoculation compared to a nontransgenic plant 90 h after inoculation (l).

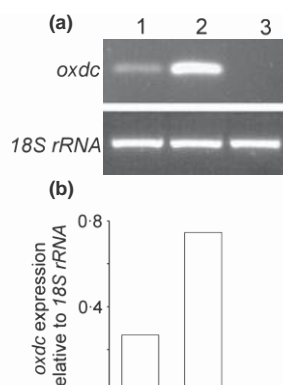


Figure 5 (a) RT-PCR for detection of expression of the foreign *oxdc* and endogenous 18S rRNA genes in transgenic soybean lines. (b) Quantification of the *oxdc* gene expression relative to that of 18S rRNA housekeeping gene. Lane 1: line OXDC.6.11.7; lane 2: line OXDC.9.21.2; lane 3: nontransgenic plant.

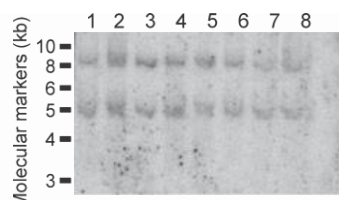


Figure 6 Southern blot analysis of genomic DNA to detect the foreign *oxdc* gene expression cassette in the soybean plants ( $T_2$  generation) from transgenic event OXDC.9.21. Lanes 1–8: transgenic plants; lane 9: nontransgenic plant.

## Discussion

The progenies ( $T_2$  generation) of self-pollinated transgenic lines were tested for resistance to *S. sclerotiorum*. Results from the detached leaf assays showed that plants transformed with the *oxdc* gene presented different levels of resistance to *S. sclerotiorum*. Compared to the non-transformed control, all transgenic events demonstrated a significant delay in lesion development. Similar results were previously reported in tobacco, tomato and lettuce transgenic plants transformed to express an *oxdc* coding gene (Kesarwani et al., 2000; Dias et al., 2006; Walz et al., 2008a).

RT-PCR analysis revealed the expression of the *oxdc* gene in the resistant lines tested (OXDC.9.21.2, OXDC.6.11.7), while no transcripts corresponding to the *oxdc* gene were observed in the susceptible nontransgenic lines analyzed. Results suggested that line OXDC.6.11.7, exhibiting only moderate resistance to *S. sclerotiorum*, revealed a presence of *oxdc* gene transcripts at a much lower level (Fig. 5b) than observed in the line OXDC.9.21.2, which exhibited a high resistance level to the pathogen. These results suggest that expression of the *oxdc* gene is associated with resistance to the fungus and

that the resistance level is dependent on the transgene expression level. The association of the presence of the gene and resistance is also supported by the fact that all transgenic lines presented a level of resistance to the pathogen while all nontransgenic genotypes tested were susceptible to infection. The results have shown that the generation of highly *S. sclerotiorum*-resistant soybean lines is feasible by the expression of the oxalate decarboxylase gene. The interaction of *Sclerotinia* with epidermal cells of transgenic and nontransgenic soybean plants is currently being studied at the ultra-structural level. This may help to elucidate the cellular basis of this plant-pathogen interaction. In addition, studies will be carried out to evaluate the resistance of soybean lines under field conditions. To confirm the enhanced resistance shown by the detached leaf assay, transgenic event OXDC.9.21 will be further tested under field conditions. Although the values were inconsistent in some situations, a significant correlation of SSR disease ratings between the detached leaf assay and field evaluations has been reported (Wegulo et al., 1998; Kim et al., 2000; Hoffman et al., 2002). To ensure the consistency of the detached leaf assay, this study used uniform leaf size, fixed the inoculum placement and provided adequate moisture during the test, as discussed by Wegulo et al. (1998).

Expression of oxalate-detoxifying enzymes in transgenic plants has been successful in generating resistant lines. Wheat oxalate oxidase has been constitutively expressed in canola, tobacco, soybean, poplar, sunflower, peanut and tomato (Thompson et al., 1995; Berna & Bernier, 1997; Donaldson et al., 2001; Cober et al., 2003; Hu et al., 2003; Livingstone et al., 2005; Dong et al., 2008) and the oxalate decarboxylase gene has been incorporated into tobacco, tomato and lettuce (Kesarwani et al., 2000; Dias et al., 2006; Walz et al., 2008a). In contrast to oxalate oxidase enzyme activity, which converts OA into carbon dioxide and hydrogen peroxide, oxalate decarboxylase promotes OA conversion into carbon dioxide and formate and does not lead to a development of additional hydrogen peroxide (Kesarwani et al., 2000; Walz et al., 2008a). The production of oxygen radical synthesis interactions seems to be important, as they weaken the host tissue at early stages of infection and consequently enhance the growth and development of the pathogen (Govrin & Levine, 2000). Kim et al. (2008) concluded that *S. sclerotiorum*-secreted oxalate induces increased levels of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide and superoxide in the plant in the early stages of the infection, which appears to trigger a programmed cell death (PCD) pathway, resulting in plant cell death and the generation of a suitable environmental niche for fungal pathogenic development, nutrient acquisition, and the establishment of a necrotrophic relationship. Walz et al. (2008b) observed moderate hydrogen peroxide accumulation in inoculated tobacco plants in the first 24 h after infection and a subsequent decrease. These studies suggested that in the early stages of pathogenesis at relatively high pH (>5) the oxalate produced by the fungus induces increased reactive oxygen species

(hydrogen peroxide and superoxide) levels and a programmed cell death response in plant tissue that is required for disease development (Kim et al., 2008). As OA accumulates, the pH decreases and it suppresses the reactive oxygen species and programmed cell death, enabling the pathogen's further ingress into plant tissue (Kim et al., 2008). OXDC transgenic plants would be a better model in which to study the plant pathogen interaction, considering that there is no additional hydrogen peroxide production, unlike in OXO plants. In practical terms, more studies are needed to determine which oxalate-detoxifying strategy would be more appropriate.

### Acknowledgements

We gratefully acknowledge the financial support of FINEP and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, grant number 500028 / 2006-0). W. Cunha was supported by a fellowship from CNPq.

### References

- Aragão FJL, Sarokin L, Vianna GR, Rech EL, 2000. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plants at a high frequency. *Theoretical and Applied Genetics* 101, 1–6.
- Aragão FJL, Vianna GR, Albino MMC, Rech EL, 2002. Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. *Crop Science* 42, 1298–302.
- Bateman DF, Beer SV, 1965. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 55, 204–11.
- Berna A, Bernier F, 1997. Regulated expression of a wheat germin gene in tobacco: oxalate oxidase activity and apoplastic localization of the heterologous protein. *Plant Molecular Biology* 33, 417–29.
- Boland GJ, Hall R, 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16, 93–100.
- Cessna SG, Sears VE, Dickman MB, Low PS, 2000. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *The Plant Cell* 12, 2191–9.
- Cober ER, Rioux S, Rajcan I, Donaldson PA, Simmonds DH, 2003. Partial resistance to white mold in a transgenic soybean line. *Crop Science* 43, 92–5.
- Danielson GA, Nelson BD, Helms TC, 2004. Effect of *Sclerotinia* stem rot on yield of soybean inoculated at different growth stages. *Plant Disease* 88, 297–300.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB, 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1, 19–21.
- Dias BBA, Cunha WG, Morais LS et al., 2006. Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology* 55, 187–93.
- Donaldson PA, Anderson T, Lane BG, Davidson AL, Simmonds DH, 2001. Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59, 297–307.
- Dong X, Ji R, Guo X et al., 2008. Expressing a gene encoding wheat oxalate oxidase enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Planta* 228, 331–40.
- Doyle JJ, Doyle JL, 1987. Genomic plant DNA preparation from fresh tissue: CTAB method. *Phytochemical Bulletin* 19, 11–4.
- Favaron F, Sella L, D'Ovidio R, 2004. Relationships among endopolygalacturonase, oxalate, pH, and plant polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in the interaction between *Sclerotinia sclerotiorum* and soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 1402–9.
- Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT, Pennington JS, 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science* 11, 929–31.
- Godoy G, Steadman JR, Dickman MB, Dam R, 1990. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37, 179–91.
- Govrin EM, Levine A, 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10, 751–7.
- Guimarães RL, Stotz HU, 2004. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. *Plant Physiology* 136, 3703–11.
- Hoffman DD, Diers BW, Hartman GL et al., 2002. Selected soybean plant introductions with partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 86, 971–80.
- Hu X, Bidney DL, Yalpani N et al., 2003. Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology* 133, 170–81.
- Kesarwani M, Azam M, Natarajan K, Mehta A, Datta A, 2000. Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*. Molecular cloning and its overexpression to confer resistance to fungal infection in transgenic tobacco and tomato. *Journal of Biological Chemistry* 275, 7230–8.
- Kim HS, Diers BW, 2000. Inheritance of partial resistance to *sclerotinia* stem rot in soybean. *Crop Science* 40, 55–61.
- Kim KS, Dickman MB, Min JY, 2008. Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21, 605–12.
- Kim HS, Hartman GL, Manandhar JB, Graef GL, Steadman JR, Diers BW, 2000. Reaction of soybean cultivars to *Sclerotinia* stem rot in field, greenhouse, and laboratory evaluations. *Crop Science* 40, 665–9.
- Kolkman JM, Kelly JD, 2000. An indirect test using oxalate to determine physiological resistance to white mold in common bean. *Crop Science* 40, 281–5.
- Livingstone DM, Hampton JL, Phipps PM, Grabau EA, 2005. Enhancing resistance to *Sclerotinia* minor in peanut by expressing a barley oxalate oxidase gene. *Plant Physiology* 137, 1354–62.
- Magro P, Marciano P, Di Lenna P, 1984. Oxalic acid production and its role in pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiology Letters* 24, 9–12.
- Marciano P, Di Lenna P, Magro P, 1983. Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance



- in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. *Physiological Plant Pathology* 22, 339–45.
- Maxwell DP, Lumsden RD, 1970. Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture. *Phytopathology* 60, 1395–8.
- Noyes RD, Hancock JG, 1981. Role of oxalic acid in the *Sclerotinia* wilt of sunflower. *Physiological Plant Pathology* 18, 123–32.
- Rech EL, Vianna GR, Aragão FJL, 2008. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature Protocols* 3, 410–8.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shaner G, Finney RE, 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67, 1051–6.
- Thompson C, Dunwell JM, Johnstone CE et al., 1995. Degradation of oxalic acid by transgenic oilseed rape plants expressing oxalate oxidase. *Euphytica* 85, 169–72.
- Tu JC, 1985. Tolerance of white bean (*Phaseolus vulgaris*) to white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) associated with tolerance to oxalic acid. *Physiological Plant Pathology* 26, 111–7.
- Vale FXR, Fernandes Filho EI, Liberato JR, 2003. QUANT. A software for plant disease severity assessment. In: 8th International Congress of Plant Pathology. Christchurch, New Zealand: 105.
- Vuong TD, Diers BW, Hartman GL, 2008. Identification of QTL for resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean plant introduction 194639. *Crop Science* 48, 2209–14.
- Walz A, Zingen-Sell I, Loeffler M, Sauer M, 2008a. Expression of an oxalate oxidase gene in tomato and severity of disease caused by *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology* 57, 453–8.
- Walz A, Zingen-Sell I, Theisen S, Kortekamp A, 2008b. Reactive oxygen intermediates and oxalic acid in the pathogenesis of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology* 120, 317–30.
- Wegulo SN, Yang XB, Martinson CA, 1998. Soybean cultivar responses to *Sclerotinia sclerotiorum* in field and controlled environment studies. *Plant Disease* 82, 1264–70.
- Wrather JA, Koenning SR, 2009. Effects of diseases on soybean yields in the United States 1996 to 2007. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2009-0401-01-RS.

## Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*

B. B. A. Dias<sup>ab</sup>, W. G. Cunha<sup>ac</sup>, L. S. Morais<sup>a</sup>, G. R. Vianna<sup>a</sup>, E. L. Rech<sup>a</sup>, G. de Capdeville<sup>a</sup> and F. J. L. Aragão<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Introdução e Expressão de Genes, PqEB W5 Norte, 70770-900, Brasília, DF; <sup>b</sup>Universidade de Brasília, Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, CP 04457, 70919-970, Brasília, DF; and <sup>c</sup>Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, 70919-970, Brasília, DF, Brazil

*Sclerotinia sclerotiorum* causes rot in a broad range of crops including lettuce, soybean, dry bean and tomato. Pathogenesis of *Sclerotinia* has been associated with the copious production of oxalic acid. Enzymes capable of degrading oxalic acid have been utilized to produce transgenic resistant plants. Transgenic lettuce lines containing the decarboxylase gene (*oxdc*) isolated from a *Flammulina* sp. were produced by *Agrobacterium*-mediated transformation. Out of 80 regenerated plants, PCR analysis revealed the presence of the *oxdc* gene in 34 lines. Except for eight lines, the primary transformants transferred the foreign gene to the first generation in a Mendelian fashion. In a detached-leaf assay inoculated with agar plugs of a 2-day-old *S. sclerotiorum* culture, two lines (P100 and P43) were symptomless, while line P57 showed a delay in symptom development when compared with a nontransgenic control line. RT-PCR analysis carried out with the resistant lines showed the expression of *oxdc* gene transcripts.

**Keywords:** *Flammulina* sp., oxalate decarboxylase, oxalic acid, *Sclerotinia sclerotiorum*, transgenic lettuce

### Introduction

*Sclerotinia sclerotiorum* is a broad host-range pathogenic ascomycete, which can cause diseases in more than 400 plant species including many agronomically important crops such as tomato, soybean, dry bean and lettuce (Boland & Hall, 1994). In lettuce (*Lactuca sativa*), diseased plants are unmarketable as they rot once infected with the fungus. The disease is difficult to control when the fungus is established in the soil because the sclerotia of *S. sclerotiorum* are long-lived (Tu, 1997). Although some breeding lines of *L. sativa* and *L. serriola* have shown some degree of resistance against *S. sclerotiorum*, there are no resistant commercial cultivars of lettuce, and disease control is based on the use of fungicides, with ascospores as the target (Whipps *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2004).

Pathogenesis of *S. sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum* and *Sclerotium rolfsii* has been associated with the production of oxalic acid by these fungi (Bateman & Beer, 1965; Magro *et al.*, 1984; Godoy *et al.*, 1990). Previous studies

provided evidence for the involvement of oxalic acid in fungal pathogenesis. Treatment of healthy sunflower and common bean plants with oxalic acid or fungal culture filtrates resulted in foliar symptoms identical to those found in diseased plants (Noyes & Hancock, 1981; Marciano *et al.*, 1983; Godoy *et al.*, 1990). In addition, plants that showed *in vitro* resistance to oxalic acid were more tolerant to *S. sclerotiorum* (Noyes & Hancock, 1981; Rowe, 1993; Kolkman & Kelly, 2000). Marciano *et al.* (1983) detected high concentrations of oxalic acid in sunflower tissues infected by *S. sclerotiorum*. Moreover, prototrophic mutants of *S. sclerotiorum* deficient in oxalic acid production were nonpathogenic to common bean plants. In contrast, the oxalic acid-producing wild type was pathogenic (Godoy *et al.*, 1990). The exact role of oxalic acid during infection is not well understood. However, several cellulolytic and pectolytic enzymes secreted by the fungi during invasion of plant tissues have maximal activities at low pH, and oxalate might increase enzymatic activity by shifting the apoplastic pH (Bateman & Beer, 1965; Lumsden, 1976; Magro *et al.*, 1984). Oxalic acid may chelate calcium, compromising the function of calcium-dependent defence responses and weakening the cell wall (Bateman & Beer, 1965; Marciano *et al.*, 1983; Ferrar & Walker, 1993). In addition, oxalate suppresses oxidant biosynthesis,

\*E-mail: aragao@cenargen.embrapa.br

Accepted 1 September 2005

disabling the earliest resistance response in plant cells (Cessna *et al.*, 2000).

With a view to the degradation of oxalic acid, genes for enzymes such as oxalate oxidase and oxalate decarboxylase have been isolated and characterized. Oxalate oxidase catalyses the oxygen-dependent oxidation of oxalate to CO<sub>2</sub> and hydrogen peroxide (Kotsira & Clonis, 1997). Oxalate decarboxylases break down oxalate to generate formate and carbon dioxide (Reinhardt *et al.*, 2003). The introduction of these genes in transgenic plants has been proposed in order to produce *Sclerotinia*-resistant lines. The barley oxalate oxidase gene was introduced into canola (Thompson *et al.*, 1995) and peanut (Livingstone *et al.*, 2005). The wheat oxalate oxidase gene was introduced into poplar (Liang *et al.*, 2001), tobacco (Berna & Bernier, 1997), soybean (Donaldson *et al.*, 2001) and sunflower (Burke & Rieseberg, 2003). The oxalate decarboxylase gene from *Collybia velutipes* (syn. *Flammulina velutipes*) was introduced into tomato and tobacco (Kesarwani *et al.*, 2000).

As *S. sclerotiorum* is one of the most important pathogens of lettuce, the main goal of this research was to isolate and to introduce an oxalate decarboxylase gene (*oxdc*) from a *Flammulina* sp. into lettuce plants.

## Materials and methods

### Isolation of the oxalate decarboxylase gene

An oxalate decarboxylase gene from the edible mushroom *Flammulina* sp. was isolated using RT-PCR. The mycelium of the fungus (isolate IJF 140502, Embrapa Germplasm Bank) was cultivated on static liquid medium (5% dextrose, 1% peptone, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and 1% Difco malt extract, pH 5.2) (Mehta & Datta, 1991) for 25 days at 25°C. Oxalic acid was added to the culture at 12.5 mM. After 12 h, total RNA was isolated from 250 mg of mycelium of *Flammulina* sp. using the Micro-to-Midi Total RNA kit (Invitrogen). Total RNA was used to produce cDNA using the reverse transcriptase Superscript II (Invitrogen), according to the protocol suggested by the manufacturer. PCR reaction was carried out in a PTC-100 thermocycler (MJ Research) in 50 µL solution containing 40 ng cDNA, 60 mM Tris-SO<sub>4</sub> pH 8.9, 18 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 250 mM of each dNTP, 200 mM of each primer and 5 U Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). The mixture was overlaid with mineral oil, denatured at 94°C (2 min), and subjected to 35 cycles of amplification (94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 68°C for 2 min) with a final elongation step of 10 min at 68°C. The primers 5'-TCTAGATGTTCAACAAC-TCCAACG-3' and 5'-GGATCCTCAGTTCACAGGAC-CAAC-3' were used to amplify a sequence of 1344 bp, corresponding to the coding sequence from the oxalate decarboxylase (*oxdc*) gene. The sequence was cloned into pCR2-1TOPO (Invitrogen) to generate the vector pTOPOOxDc, sequenced by using universal M13 and T7 primers on an automatic sequencer (Applied Biosystems) and deposited in GenBank (accession no. AY238332).

### Plasmid vector

The *oxdc* coding sequence was removed from pTOPOOxDc and cloned into the vector pUC19-35SAMVNOS, between the *Xba*I and *Bam*HI sites, under the control of the doubled 35S promoter from *Cauliflower mosaic virus* and a sequence enhancer from *Alfalfa mosaic virus*. The pUC19-35SAMVNOS vector was derived from the pBI426 (Datla *et al.*, 1991) in which the *gus-nptII* gene fusion was removed with *Nco*I and *Sac*I, and the *Nco*I site was deleted by partial digestion of nuclease S1. The *oxdc* expression cassette was removed from the pUC19-35SAMVNOS vector with *Pvu*II and cloned into the binary vector pCAMBIA1390 (CAMBIA) in the *Sma*I site, resulting in the transformation vector pCambOxDc. The vector pCambOxDc carries the selectable marker gene *hpt* to confer hygromycin resistance.

*Agrobacterium* strain EHA 105, containing the vector pCambOxDc, was used to transform lettuce plants.

### Lettuce transformation

The transformation of lettuce cv. Verônica was performed according to Curtis *et al.* (1994). Cotyledons from 48-h-germinated seeds were excised, then cocultured with bacterial suspension for 15 min. Explants were transferred to MS medium (Murashige & Skoog, 1962) supplemented with 0.1 mg L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine (BAP), 0.1 mg indolylbutyric acid (IBA), 10 mg hygromycin and 250 mg cefotaxime L<sup>-1</sup>. Calluses were transferred to MS medium containing 0.1 mg BAP L<sup>-1</sup> for shoot regeneration.

### PCR screening of transformed plants

Plantlets were screened by PCR for the presence of the *oxdc* gene. Genomic DNA was isolated from young leaf discs according to Doyle & Doyle (1987). PCR reactions were carried out according to Aragão *et al.* (2002). The primers OXDC 873 (5'-TGGGCTCGACAGAGGA-GAAG-3') and OXDC 371 (5'-CTCGGCAGCAGAAT-GAGGTC-3') within the gene *oxdc* coding sequence were used to amplify a 502-bp sequence.

### Progeny analysis

Seeds of the first generation (R<sub>1</sub>) of self-pollinated plants were germinated on half-strength MS medium containing 10 mg hygromycin and 250 mg cefotaxime L<sup>-1</sup>.  $\chi^2$  analyses, using the correction factor of Yates (Steel & Torrie, 1980), were performed to determine whether or not the observed segregation ratio was consistent with a Mendelian ratio (3 : 1 or 15 : 1), with a 95% level of confidence.

### Inoculation of transgenic plants with *S. sclerotiorum*

An isolate of *S. sclerotiorum* obtained from tomato plants grown in Guaíra, SP, Brazil and kept at Embrapa Hortaliças (Brasília, DF, Brazil) was used in the experiments. The fungus was grown on PDA medium (20% potato,

2% dextrose, 1.5% agar). Inoculation was carried out according to Dickson & Hunter (1983). A mycelial agar plug 2 mm in diameter was cut from the growing margins of a 2-day-old *S. sclerotiorum* culture and applied to the adaxial surface of a leaf detached from a 9-week-old plant (10 leaves from each transgenic and nontransgenic line). Symptoms were observed every 12 h and lesion length recorded. Leaves were kept in a plant growth chamber (Convion) at 20°C, 90–100% relative humidity and a photoperiod (50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) of 12 h.

### RT-PCR expression analysis

Lines P20, P43, P57 and P100 were analysed for the presence of *oxdc* gene transcripts. Total RNA was extracted from leaves using the Micro-to-Midi Total RNA kit. The remaining genomic DNA was eliminated by DNase digestion of the RNA samples. Total RNA was used to produce cDNA using the reverse transcriptase Superscript II, according to the protocol suggested by the manufacturer. PCR reactions were carried out as described above, except for the following changes: 25 ng cDNA, 1.5 U *Taq* DNA polymerase, and amplification cycles of 95°C for 1 min, 57°C for 1 min and 72°C for 1 min, with a final elongation step of 5 min at 72°C. Primers OXDC 873 and OXDC 371 were used to amplify a sequence within the *oxdc* gene. As an internal control, primers rRNA1 (5'-AACGGCTACCACATCCAAGG-3') and rRNA2C (5'-TCATTACTCCGATCCCGAAG-3') were used to amplify a sequence from the *18S rRNA* gene.

### Results

The oxalate decarboxylase gene (*oxdc*) from *Flammulina* sp. isolate IJF 140502 showed 99.26% identity when compared with the GenBank sequence from *F. velutipes* (accession AF2000683), revealing differences in only 10 bp. No differences were found in the protein amino acid sequence.

Out of 80 regenerated plants, 34 lines (42.5%) revealed the presence of the *oxdc* gene in the PCR analysis. All transgenic lines were rooted and acclimatized. Seven lines showed an abnormal phenotype with smaller leaves and thinner stems.

All acclimatized transgenic lines ( $R_0$  generation) were allowed to produce seeds. The progeny ( $R_1$  generation) of 34 self-fertilized transgenic lines were screened by PCR analysis for the presence of the *oxdc* gene (Fig. 1). With the exception of eight lines (P11, P37, P39, P41, P61, P81, P82, P88), the  $R_0$  plants transferred the foreign gene to the  $R_1$  generation in a Mendelian fashion (Table 1). Twenty-three lines presented a segregation ratio of 3 : 1 and three lines a segregation ratio of 15 : 1.

Detached leaves were inoculated with 2-mm-diameter agar plugs from growing margins of 2-day-old *S. sclerotiorum* cultures and lesion length was recorded. Lines P100 and P43 did not show any symptoms (Fig. 2). Although the mycelium of *S. sclerotiorum* was able to initiate growth from the plug and attach to the leaf surface at



Figure 1 PCR analysis of putative transformed lettuce lines for detection of the *oxdc* gene. Lane 1, positive control (plasmid pCambiaOxDc); lane 2, nontransgenic plant; lanes 3–15, transgenic lines.

Table 1 Segregation analysis in 34 lines of transgenic lettuce

Line $R_0$	$R_1$ generation <sup>a</sup>		Segregation ratio tested	$\chi^2$	$P^b$
	Positive	Negative			
P1	42	8	3 : 1	2.16	0.14
P2	35	15	3 : 1	0.66	0.41
P3	42	8	3 : 1	2.16	0.14
P5	40	10	3 : 1	0.66	0.41
P6	45	4	15 : 1	0.30	0.58
P11	20	25	3 : 1	22.41	0.00
P14	39	11	3 : 1	0.24	0.62
P17	41	6	15 : 1	3.40	0.07
P19	35	15	3 : 1	0.66	0.41
P20	39	6	3 : 1	3.26	0.07
P21	39	11	3 : 1	0.24	0.62
P22	41	4	15 : 1	0.56	0.46
P23	36	13	3 : 1	0.06	0.80
P37	24	25	3 : 1	17.69	0.00
P39	44	6	3 : 1	4.51	0.03
P40	40	10	3 : 1	0.67	0.41
P41	27	22	3 : 1	10.35	0.01
P42	41	9	3 : 1	1.31	0.25
P43	37	11	3 : 1	0.11	0.73
P48	40	8	3 : 1	1.77	0.18
P54	37	12	3 : 1	0.01	0.93
P57	39	11	3 : 1	0.24	0.62
P58	37	12	3 : 1	0.01	0.93
P59	37	13	3 : 1	0.03	0.87
P61	29	19	3 : 1	5.44	0.02
P63	33	17	3 : 1	2.16	0.14
P81	5	43	3 : 1	106.77	0.00
P82	29	18	3 : 1	4.43	0.03
P88	7	41	3 : 1	93.44	0.00
P99	33	17	3 : 1	2.16	0.14
P100	36	12	3 : 1	0.00	1.00
P101	41	9	3 : 1	1.31	0.25
P102	32	18	3 : 1	3.22	0.07
P103	36	12	3 : 1	0.00	1.00

<sup>a</sup>Data are based on *in vitro* tolerance to hygromycin.

3 : 1 or 15 : 1.

inoculation sites of resistant transgenic plants, no colonization of the foliar tissue was observed (Fig. 2c). In contrast, tissue colonization was extensive on nontransgenic plants (Fig. 2d). Line P57 showed a delay in symptom

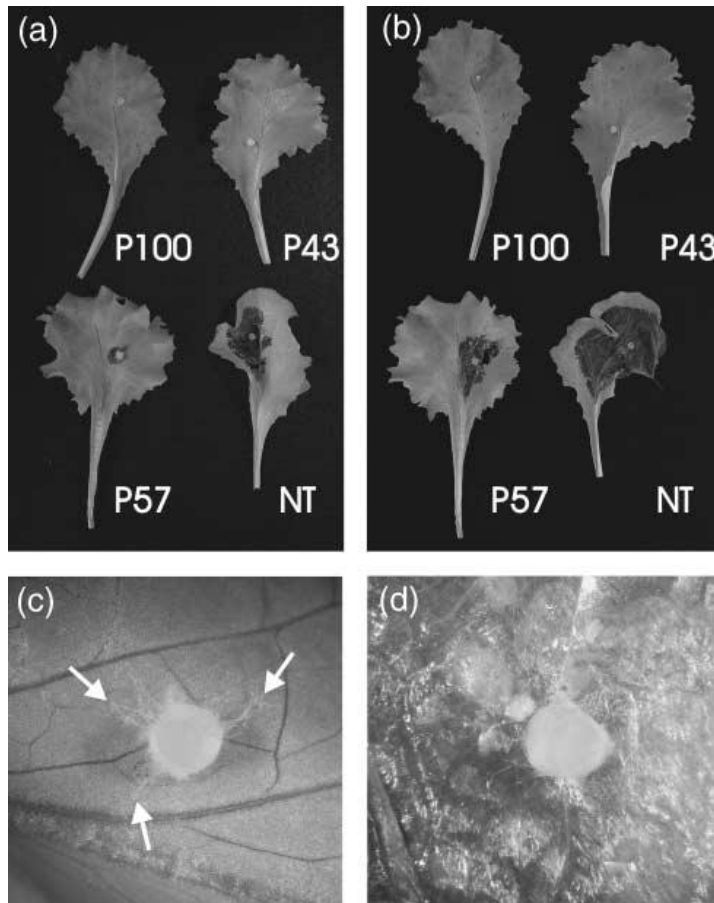


Figure 2 Pathogenesis assay of transgenic lines P100, P43 and P57 for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Symptoms were observed on detached leaves (a) 12; (b) 24 h after inoculation with 2-mm mycelial agar plugs. (c) Detail of the mycelium of *S. sclerotiorum* initiating growth from the plug and attaching to the leaf surface at the inoculation site of a resistant transgenic plant (arrows); (d) line P43 and damaged susceptible nontransgenic plants. NT, nontransgenic line.

development compared with the nontransgenic line (Fig. 2a,b). The progression of disease development in 33 transgenic lettuce lines over a 36-h period is illustrated (Fig. 3). Except for transgenic lines P57, P43 and P100 (Fig. 3a,d,h, respectively), there were no significant differences in lesion length compared with the controls (non-transgenic plants). Symptoms were more severe for line P2 at 36 h than for the other lines from its group (Fig. 3c). As observed in the control plants, in all transgenic susceptible lines the lesions extended across the whole leaf within 48 h (data not shown).

RT-PCR analysis for detection of *oxdc* gene transcripts was carried out with three resistant lines (P43, P57, P100) and one susceptible transgenic line (P20). The resistant lines showed *oxdc* gene expression, while line P20 and the nontransgenic plant did not produce *oxdc* gene transcripts (Fig. 4). All plants tested displayed similar levels of expression of the *18S rRNA* gene.

## Discussion

The expression of the oxalate decarboxylase gene (*oxdc*) from *Flammulina* sp. in lettuce has allowed the produc-

tion of transgenic lines resistant to the necrotrophic fungus *S. sclerotiorum*.

With the exception of seven lines, the transgenic plants produced presented a normal phenotype. Seven transgenic lines showed an abnormal phenotype, with smaller leaves and narrow stems. Similar results were observed by Pileggi *et al.* (2001). These phenotypes may be attributable to somaclonal variation caused by exposure to growth regulators during callus growth and plant regeneration. Insertional gene mutation could also be involved. Further experiments with plasmid rescue should be considered in order to evaluate this possibility.

The progenies ( $R_1$  generation) of self-pollinated transgenic lines were tested for the presence of the *oxdc* gene. The analyses indicated that most of the transgenic plants contained the transgene(s) integrated in a single locus, as indicated by the 3 : 1 segregation ratio. This is a desirable property for introducing transgenic plants into a breeding programme aimed at the development of new cultivars.

Several studies support the concept that most of the foreign genes introduced by *Agrobacterium* are normally transmitted to the progeny (Gelvin, 1998). In this study, eight lines did not transfer the introduced foreign gene to

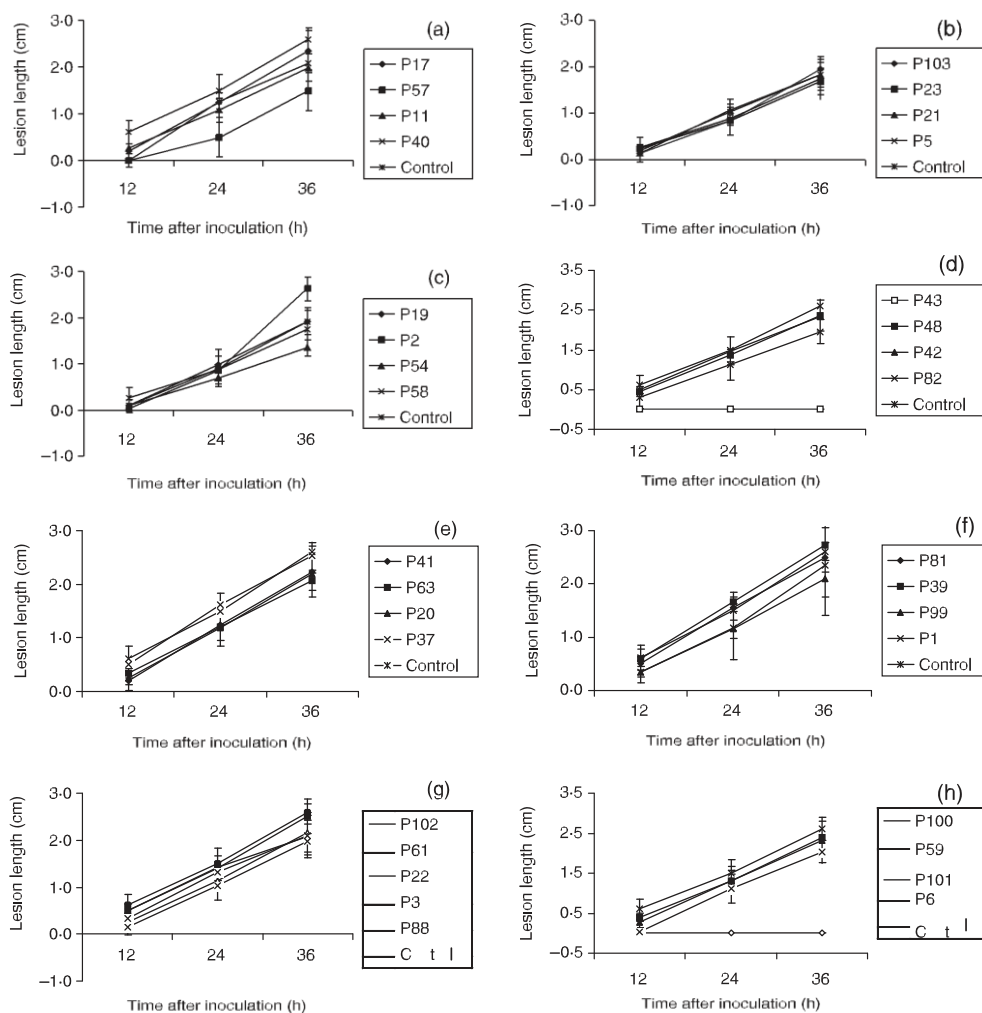


Figure 3 Lesion-length progression following inoculation of detached leaves of 33 transgenic lettuce lines and control with mycelial agar plugs containing *Sclerotinia sclerotiorum*. Transgenic lines and control indicated on right border of each block. Bars, SD ( $n = 10$ ).

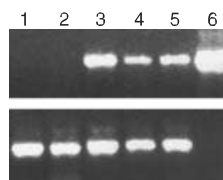


Figure 4 RT-PCR for detection of expression of *oxdc* and 18S rRNA genes in transgenic lettuce lines. Upper lanes: (1) nontransgenic plant; (2) P20; (3) P43; (4) P57; (5) P100; (6) plasmid vector used in the PCR reaction. Lower lanes: lettuce 18S rRNA gene as internal control.

the  $R_1$  generation in the Mendelian segregation ratio expected for self-pollinated plants. An insertional mutation of an essential gene required for ovule fecundation or development might account for this aberrant inheritance.

In addition, physical transgene elimination has been reported in several plants and has been attributed to intrachromosomal recombination (Fladung, 1999); genetic instability resulting from the conditions of tissue culture (Risseuw *et al.*, 1997; Joersbo *et al.*, 1999); or a genomic defence process (Srivastava *et al.*, 1996; Romano *et al.*, 2005).

From the total of 34 putative transgenic lines produced, only three lines presented resistance to *S. sclerotiorum*. The expression of a transgene located in active chromatin or heterochromatin is highly variable, even among lines independently transformed with the same construct. Many factors may be responsible for variable transgene expression, including the tendency for exogenous DNA to undergo rearrangement prior to integration, effects related to the transgene copy number and integration position, and effects of DNA hypermethylation (Meyer, 1998; Abranches *et al.*, 2000).

The introduction of genes coding for enzymes able to degrade oxalic acid in transgenic plants has been successful in generating *Sclerotinia*-resistant canola (Thompson *et al.*, 1995); poplar (Liang *et al.*, 2001); tobacco (Berna & Bernier, 1997; Kesarwani *et al.*, 2000); soybean (Donaldson *et al.*, 2001); sunflower (Burke & Riesenber, 2003); tomato (Kesarwani *et al.*, 2000); and peanut (Livingstone *et al.*, 2005). Apparently, only transgenic soybean and sunflower plants with partial resistance have so far been tested under field conditions (Burke & Rieseberg, 2003; Cober *et al.*, 2003). Correlation of *Sclerotinia* disease ratings between glasshouse, laboratory and field evaluations has been reported (Kim *et al.*, 2000). Although this correlation was inconsistent in some cases (Vuong *et al.*, 2004), *in vivo* resistance assays with both oxalic acid and *Sclerotinia* mycelium plug inoculation have consistently been correlated with resistance in the field (Kesarwani *et al.*, 2000; Kolkman & Kelly, 2000; Chipps *et al.*, 2005). In soybean, Wegulo *et al.* (1998) demonstrated that both mycelial inoculation of detached leaves and the response of detached stems to oxalic acid correlated with disease resistance in the field.

RT-PCR analyses revealed the expression of the *oxdc* gene in the three resistant lines (P43, P57, P100), while no *oxdc* gene transcripts were observed in the susceptible transgenic and nontransgenic lines analysed. These results suggest that expression of the *oxdc* gene is associated with resistance to *Sclerotinia*.

The results show that expression of the oxalate decarboxylase gene in a highly susceptible species is efficient in generating resistance to *S. sclerotiorum*. The interaction of *Sclerotinia* with epidermal cells of transgenic and nontransgenic lettuce is currently being studied at the ultrastructural level. This may help to elucidate the cellular basis of this plant–pathogen interaction. In addition, studies are being carried out to evaluate the resistance of lettuce lines under field conditions.

### Acknowledgements

We would like to thank Dr Arailde Fontes Urben (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) and Dr Gilmar Paulo Henz (Embrapa Hortaliças) for providing the *Flammulina* sp. and *Sclerotinia* isolates, respectively, and Warley Almeida for his technical assistance. This work was supported by CNPq (grant number 305441/2004-3).

### References

- Abranches R, Santos AP, Wegel E, Williams S, Castilho A, Christou P, Shaw P, Stoger E, 2000. Widely separated multiple transgene integration sites in wheat chromosomes are brought together at interphase. *The Plant Journal* **24**, 713–23.
- Aragão FJL, Vianna GR, Albino MMC, Rech EL, 2002. Transgenic dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. *Crop Science* **42**, 1298–302.
- Bateman DF, Beer SV, 1965. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* **55**, 204–11.
- Berna A, Bernier F, 1997. Regulated expression of wheat germin gene in tobacco: oxalate oxidase activity and apoplastic localization of the heterologous protein. *Plant Molecular Biology* **33**, 417–29.
- Boland GJ, Hall R, 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **16**, 93–108.
- Burke JM, Riesenber LH, 2003. Fitness effect of transgenic disease resistance in sunflowers. *Science* **300**, 1250.
- Cessna SG, Sears VE, Dickman MB, Low PS, 2000. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *The Plant Cell* **12**, 2191–9.
- Chipps TJ, Gilmore B, Myers JR, Stotz HU, 2005. Relationship between oxalate, oxalate oxidase activity, oxalate sensitivity, and white mold susceptibility in *Phaseolus coccineus*. *Phytopathology* **95**, 292–9.
- Cober ER, Rioux S, Rajcan I, Donaldson PA, Simmonds DH, 2003. Partial resistance to white mold in a transgenic soybean line. *Crop Science* **43**, 92–5.
- Curtis IS, Power JB, Blackhall NM, de Laat AMM, Davey MR, 1994. Genotype-independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Experimental Botany* **45**, 1441–9.
- Datla RS, Hammerlindl JK, Pelcher LE, Crosby WL, Selvaraj G, 1991. A bifunctional fusion between  $\beta$ -glucuronidase and neomycin phosphotransferase: a broad-spectrum marker enzyme for plants. *Gene* **101**, 239–46.
- Dickson MH, Hunter JE, 1983. Modification of methods for screening for white mold resistance in greenhouse. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative* **26**, 85–6.
- Donaldson PA, Anderson T, Lane BG, Davidson AL, Simmonds DH, 2001. Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2-8* (*germin*) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59**, 297–307.
- Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**, 11–5.
- Ferrar PH, Walker JRL, 1993.  $\sigma$ -Diphenol oxidase inhibition – an additional role for oxalic acid in the phytopathogenic arsenal of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium rolfsii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **43**, 415–22.
- Fladung M, 1999. Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). I. Flanking DNA sequences and T-DNA structure. *Molecular and General Genetics* **260**, 574–81.
- Gelvin SB, 1998. The introduction and expression of transgenes in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **9**, 227–32.
- Godoy G, Steadman JR, Dickman MB, Dam R, 1990. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **37**, 179–91.
- Joersbo M, Brunstedt J, Marcussen J, Okkels FT, 1999. Transformation of the endospermous legume guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L.) and analysis of transgene transmission. *Molecular Breeding* **5**, 521–9.
- Kesarwani M, Azam M, Natarajan K, Mehta A, Datta A, 2000. Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*. Molecular cloning and its overexpression to confer resistance to fungal

- infection in transgenic tobacco and tomato. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 7230–8.
- Kim HS, Hartman GL, Manandhar JB, Graef GL, Steadman JR, Diers BW, 2000. Reaction of soybean cultivars to sclerotinia stem rot in field, greenhouse, and laboratory evaluations. *Crop Science* **40**, 665–9.
- Kolkman JM, Kelly JD, 2000. An indirect test using oxalate to determine physiological resistance to white mold in common bean. *Crop Science* **40**, 281–5.
- Kotsira VP, Clonis YD, 1997. Oxalate oxidase from barley roots: purification to homogeneity and study of some molecular, catalytic, and binding properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **340**, 239–49.
- Liang H, Maynard CA, Allen RD, Powell WA, 2001. Increased *Septoria musiva* resistance in transgenic hybrid poplar leaves expressing wheat oxalate oxidase gene. *Plant Molecular Biology* **45**, 619–29.
- Livingstone DM, Hampton JL, Phipps PM, Grabau EA, 2005. Enhancing resistance to *Sclerotinia minor* in peanut by expressing a barley oxalate oxidase gene. *Plant Physiology* **137**, 1354–62.
- Lumsden RD, 1976. Pectolytic enzymes of *Sclerotinia sclerotiorum* and their localization in infected bean. *Canadian Journal of Botany* **54**, 2630–41.
- Magro P, Marciano P, Di Lenna P, 1984. Oxalic acid production and its role in pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiology Letters* **49**, 9–12.
- Marciano P, Di Lenna P, Magro P, 1983. Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. *Physiological Plant Pathology* **22**, 339–45.
- Mehta A, Datta A, 1991. Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*. Purification, characterization, and cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 23548–53.
- Meyer P, 1998. Stabilities and instabilities in transgene expression. In: Lindsey K, ed. *Transgenic Plant Research*. Chur, Switzerland: Harwood Academic, 263–75.
- Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–97.
- Noyes RD, Hancock JG, 1981. Role of oxalic acid in the *Sclerotinia* wilt of sunflower. *Physiological Plant Pathology* **18**, 123–32.
- Pileggi M, Pereira AAM, Silva JS, Pileggi SAV, Verma DPS, 2001. An improved method for transformation of lettuce by *Agrobacterium tumefaciens* with a gene that confers freezing resistance. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **44**, 191–6.
- Reinhardt LA, Svedruzic D, Chang CH, Cleland WW, Richards NGJ, 2003. Heavy atom isotope effects on the reaction catalyzed by the oxalate decarboxylase from *Bacillus subtilis*. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 1244–52.
- Risseuw E, Franke-van Dijk ME, Hooykaas PJ, 1997. Gene targeting and instability of *Agrobacterium* T-DNA loci in the plant genome. *The Plant Journal* **11**, 717–28.
- Romano E, Soares A, Proite K, Neiva S, Grossi M, Faria JC, Rech EL, Aragão FJL, 2005. Transgene elimination in genetically modified dry bean and soybean lines. *Genetics and Molecular Research* **4**, 177–84.
- Rowe DE, 1993. Oxalic acid effects in exudates of *Sclerotinia trifoliorum* and *S. sclerotiorum* and potential use in selection. *Crop Science* **33**, 1146–9.
- Srivastava V, Vasil V, Vasil IK, 1996. Molecular characterization of the fate of transgenes in transformed wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied of Genetics* **92**, 1031–7.
- Steel RGD, Torrie JH, 1980. *Principles and Procedures of Statistics*. New York, USA: McGraw-Hill.
- Thompson C, Dunwell JM, Johnstone CE, Lay V, Ray J, Schmitt M, Watson H, Nisbet G, 1995. Degradation of oxalic acid by transgenic oilseed rape plants expressing oxalate oxidase. *Euphytica* **85**, 169–72.
- Tu JC, 1997. An integrated control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) of beans, with emphasis on recent advances in biological control. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **38**, 73–6.
- Vuong TD, Hoffman DD, Diers BW, Miller JF, Steadman JR, Hartman GL, 2004. Evaluation of soybean, dry bean, and sunflower for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Crop Science* **44**, 777–83.
- Wegulo SN, Yang XB, Martinson CA, 1998. Soybean cultivar responses to *Sclerotinia sclerotiorum* in field and controlled environment studies. *Plant Disease* **82**, 1264–70.
- Whipps JM, Budge SP, McClement S, Pink DAC, 2002. A glasshouse cropping method for screening lettuce lines for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 373–8.
- Young CS, Clarkson JP, Smith JA, Watling M, Phelps K, Whipps JM, 2004. Environmental conditions influencing *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce. *Plant Pathology* **53**, 387–97.