



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

ITALO GABRIEL DA SILVA NOBRE

CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS DE *Nicotiana tabacum*
TRANSFORMADAS COM SEQUÊNCIA CODIFICADORA DE UMA
QUITINASE DE FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata*)

FORTALEZA - CE

2014

ITALO GABRIEL DA SILVA NOBRE

**CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS DE *Nicotiana tabacum*
TRANSFORMADAS COM SEQUÊNCIA CODIFICADORA DE UMA
QUITINASE DE FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata*)**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho - Orientadora

FORTALEZA - CE

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

N672c

Nobre, Italo Gabriel da Silva.

Caracterização de plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas com sequência codificadora de uma quitinase de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) / Italo Gabriel da Silva Nobre. – 2014.
55 f. : il., color., enc. ; 30 cm.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2014.
Orientação: Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho.

1. Quitina. 2. Cromatografia. 3. Feijão-de-corda. I. Título.

CDD 660.6

ITALO GABRIEL DA SILVA NOBRE

**CARACTERIZAÇÃO DE PLANTAS DE *Nicotiana tabacum*
TRANSFORMADAS COM SEQUÊNCIA CODIFICADORA DE UMA
QUITINASE DE FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata*)**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristina da Silveira Carvalho Paiva - Orientador
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Emmanuel de Sousa Jereissati
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Patricia Gadelha de Castro Landim
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho, orientadora, por ter acreditado no meu potencial. Agradeço pela disponibilidade de tempo e paciência ao longo desses anos e pelas críticas e sugestões relevantes feitas durante a sua orientação. Em especial, pelo carinho e preocupação demonstrados.

Ao prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, por sua contribuição para o desenvolvimento desse trabalho e pela disponibilização da estrutura do Laboratório de Genética Molecular. E ao grupo do Laboratório de Genética Molecular, em especial Suelen e Edvar.

Ao prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira pela disponibilização do Laboratório de Defesa de Plantas para realização de alguns experimentos, junto ao seu aluno de doutorado Fredy Davi que teve paciência em me ajudar com alguns ensaios.

Ao prof. Dr. Hélio Costa, pela valiosa contribuição neste trabalho que me permitiu confirmação de resultados importantes e pelo empréstimo dos reagentes de Biologia Molecular que viabilizaram a realização de muitos experimentos.

A profa. Dra. Ilka Maria e seu aluno Lucas Pinheiro, pela grande ajuda nos ensaios de atividade antifúngica.

Ao prof. André Coelho por toda a atenção e disponibilidade tanto em sala de aula quanto em laboratório.

Ao secretário do curso de graduação, Gilmar Ferreira, sempre muito prestativo e competente e a coordenadora Dirce Fernandes por toda sua coragem na criação do curso de bacharelado em Biotecnologia.

A Dra. Patricia Gadelha e Prof. Dr. Emmanuel Jereissati, por sua disponibilidade em compor a banca examinadora.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho e minha formação.

Ubuntu.

RESUMO

As quitinases são enzimas capazes de promover a clivagem das ligações existentes entre os monômeros de N-acetilglicosaminas. Nesse contexto, plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas com uma sequência VuChil, codificadora de quitinase de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), foram utilizadas como modelo para realizar estudos de caracterização e atividade protéica. Neste trabalho, relatamos a análise dos transcritos para VuChil, a análise de segregação das plantas transformadas, atividade quitinolítica de extratos foliares e o fracionamento do extrato proteico. A expressão do gene de três gerações de plantas transformadas foi confirmada por RT-PCR. As duas gerações de plantas transgênicas geradas por autofecundação de parentais contendo o inserto foi testada em relação à estabilidade da herança do transgene. Nas duas gerações testadas o padrão de segregação não diferiu das proporções Mendelianas esperadas. A produção de quitinase em extratos proteicos de folhas foi analisada por meio de ensaio colorimétrico utilizando como substrato quitina coloidal. Atividade enzimática foi detectada, embora seus níveis tenham variado nas diferentes plantas transformadas. A cromatografia em coluna de quitina foi realizada e o fracionamento do extrato apresentou dois picos. A expressão do gene foi comprovada, assim como a atividade enzimática da proteína.

Palavras-chave: quitina, cromatografia, RT-PCR.

ABSTRACT

The chitinases enzymes are capable of promoting the cleavage of the links between the monomers of N-acetylglucosamine. In the context, *Nicotiana tabacum* plants transformed with a VuChil sequence encoding cowpea bean chitinase (*Vigna unguiculata*), were used as a model to perform characterization studies and protein activity. In the present work, we report the analysis of transcripts for VuChil, the segregation analysis of transformed plants, chitinase activity of plant extracts and the fractionation of protein extract. That way, transgenic plants of *Nicotiana tabacum* containing a chitinase from *V. unguiculata* were evaluated. The expression of the gene in three generations of transformed plants was confirmed by RT-PCR. Two generation of transgenic plants produced by autofertilization of parents containing the insert was tested for the stability of the inheritance of the transgene. In both descendants the pattern of segregation did not differ from the expected Mendelian proportions. The production of chitinase in protein extracts of leaves was analyzed by colorimetric assay using colloidal chitin as substrate. Enzymatic activity was detected, although its levels had changed in different transformed plants. Chromatography on chitin column was carried out and the fractionation of the extract showed two peaks. The expression of the gene was confirmed, as well as the enzymatic activity of the protein.

Keywords: chitin, chromatography, RT-PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Mapa circular do vetor binário pCAMBIA 1305.2 (CAMBIA Vectors)** 25
- Figura 2 - Atividade quitinolítica total contra o substrato quitina coloidal.** 30
- Figura 3 - Atividade quitinolítica específica contra o substrato quitina coloidal.** 30
- Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 0,8% de produtos de PCR para amplificação da sequência Vuchil codificadora de uma quitinase de *V. unguiculata* a partir de DNA genômico de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi.** 30
- Figura 4 - Aspecto de germinação de sementes de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi após uma semanas de cultivo** 32
- Figura 5 - Aspecto de germinação de sementes de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi após quatro semanas de cultivo** 35
- Figura 6 - Taxa de germinação das sementes (em porcentagem) na geração T₂.** 36
- Figura 7 - Comprimento médio das radículas emitidas em quatro semanas (mm) na geração T₂.** 37
- Figura 8 - Taxa de germinação das sementes (em porcentagem) na geração T₃.** 37
- Figura 9 - Comprimento médio das radículas emitidas em quatro semanas (mm) na geração T₃.** 38
- Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% de RNA total extraído de folhas de fumo transformadas com a Vuchil de feijão-de-corda e plantas de grupo controle.** 38

- Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1,0% de cDNA extraído de folhas de plantas de fumo transformadas com a VuChil de *Vigna unguiculata* e plantas de grupo controle, obtidos através de RT-PCR.** 40
- Figura 12 - Fracionamento de amostra protéica de tecido foliar de plantas transformadas.** 42
- Figura 13 - Fracionamento de amostra protéica de tecido foliar de plantas não transformadas.** 43
- Figura 14 – Atividade quitinolítica total contra o substrato quitina coloidal.** 45
- Figura 15 – Atividade quitinolítica específica contra o substrato quitina coloidal.** 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Famílias de proteínas relacionadas à patogênese	14
Tabela 2 – Análise de segregação da resistência ao antibiótico higromicina em progênies oriundas da autofecundação de plantas de <i>N. tabacum</i> var <i>Xanthi</i> transformadas com Vuchil que codifica para uma quitinase de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>).	33

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

NAcGlcs	N-acetilglicosaminas
PR	Relacionadas à patogenêse
PCR	Reação em cadeia da polimerase
EC	<i>Enzyme Commission Numbers</i>
rpm	Rotacões por minuto
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
MS	Meio de cultura Murashige e Skoog
NAG	N-acetil-D-glucosamina
DMAB	dimetilaminobenzaldeído
BDA	Ágar batata dextrose
MS	Meio de cultura Murashige e Skoog
MSH	Meio de cultura Murashige e Skoog acrescido de higromicina
VuChil	Quitinase de classe I de <i>Vigna unguiculata</i>
Cpl	1º pico eluído de extratos protéicos de plantas não transformadas
CplI	2º pico eluído de extratos protéicos de plantas não transformadas
Vcpl	1º pico eluído de extratos protéicos de plantas transformadas
Vcpl	2º pico eluído de extratos protéicos de plantas transformadas

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1.	Quitiniases vegetais.....	13
1.2.	Plantas transgênicas resistentes a fungos.....	17
2.	OBJETIVOS.....	19
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3.	MATERIAIS	20
3.1	Plantas.....	20
3.2.	Reagentes.....	20
4.	METODOLOGIA.....	21
4.1.	Atividade quitinolítica.....	21
4.2.	Aclimatização dos transformantes e obtenção de sementes da geração T ₁	22
4.3	Análise de segregação.....	22
4.4.	Extração de DNA.....	23
4.5.	Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	24
4.6.	Extração de RNA	26
4.7	Síntese do cDNA (RT-PCR).....	27
4.8.	Extração proteica de tecidos vegetais.....	27
4.9.	Cromatografia de afinidade.....	28
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1	Atividade quitinolítica.....	29
5.2	Análises da Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	31
5.3	Seleção de plantas transformadas.....	33
5.4	Análise de transcritos (RT-PCR).....	39

5.5	Cromatografia de afinidade.....	41
5.6	Atividade quitinolítica dos picos da cromatografia.....	44
6.	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Quitinases vegetais

As quitinases (EC 3.2.1.14) são enzimas capazes de promover a clivagem das ligações β -(1-4) existentes entre os monômeros de N-acetilglicosaminas (NAcGlc), que estão incluídas em uma classe de enzimas do grupo das glicosil-hidrolases (KERN, 2003). Essas enzimas são largamente distribuídas na natureza, presentes em plantas, animais, vírus, bactérias, fungos e insetos. O papel das quitinases nos organismos são diversos, incluindo defesa, digestão de nutrientes, morfogênese e patogênese, além de possuírem aplicação em biotecnologia, agricultura, medicina e meio ambiente (ZHANG et al., 2012).

Dependendo do seu modo de ação, as quitinases podem ser classificadas em exo e endoquitinases (SAHAI; MANOCHA, 1993). Endoquitinases (EC 3.2.1.14) clivam quitina aleatoriamente em pontos internos, produzindo multímeros de NAcGlc de baixa massa molecular, tais como quitotetraose, quitotriose e diacetilquitobiose (dímeros de NAcGlc). Exoquitinases podem ser divididas em duas subcategorias: quitobiosidases (EC 3.2.1.29), que catalisam a liberação de diacetilquitobiose do final não redutor da cadeia de quitina; e β -(1-4) N-acetilglucosaminidases (EC 3.2.1.30), que clivam produtos oligoméricos de endoquitinases e quitobiosidases, gerando monômeros de NAcGlc (DAHIYA; TEWARI R; HOONDAL, 2006).

Quitinases são enzimas hidrolíticas que têm papel importantíssimo no funcionamento da maquinaria vegetal e na sobrevivência da planta. Em vegetais, quitinases são proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas), um grupo de proteínas incluindo enzimas hidrolíticas, enzimas inibidoras e peptídeos permeáveis à membrana que são produzidos por plantas em resposta a invasão de patógenos e fatores abióticos (LI; YI, 2012). As plantas produzem 17 famílias de PR-proteínas (relacionadas a patogênese), muitas das quais possuem uma atividade antifúngica *in vitro* (Van Loon et al., 2006). Stangarlin (2011) lista as 17 famílias de PR-proteínas e suas propriedades

como é possível verificar na Tabela 1. Entre as 17 famílias de PR-proteínas são encontradas quitinases, glucanases e osmotinas, também conhecidas como proteínas 'taumatina-like'. Quitinases e glucanases, bem como, alguns péptidos de origem microbiana, têm sido relatados que possuem atividade antifúngica. Há um crescente corpo de evidências que sugerem que proteínas PR são associadas à resistência à doenças.

Vários membros das classes de proteínas PR1, PR2 (glucanases), PR3 (quitinases), PR4 (quitinases I e II) e PR5 (taumatina-like) têm apresentado atividade antimicrobiana *in vitro*. (JACH et al., 1992). A função biológica de algumas das PR-proteínas já foi caracterizada.

PR-proteínas 2 (β -1,3-glucanase) e PR-proteínas 3 (quitinases) hidrolisam glucana e quitina, respectivamente, que são componentes estruturais importantes na parede celular da maioria dos fungos patogênicos (DOES; CORNELISSEN, 1998).

Tabela 1. Famílias de proteínas relacionadas à patogênese

Família	Propriedades
PR-1	Antifúngica
PR-2	β -1,3-glucanase
PR-3	Quitinase I-II, IV-VII
PR-4	Quitinase I-II
PR-5	Osmotina
PR-6	Inibidores de protease
PR-7	Endoproteinases
PR-8	Quitinase III
PR-9	Peroxidases
PR-10	<i>Proteínas semelhantes a ribonuclease</i>
PR-11	Quitinase V
PR-12	Defensinas
PR-13	Tioninas
PR-14	Proteínas relacionadas com o transporte de lipídios
PR-15	Oxalato oxidases
PR-16	<i>Proteínas semelhantes a oxalato oxidase</i>
PR-17	Desconhecida

Fonte: (STANGARLIN, 2011).

Na literatura estudos que demonstram resistência de plantas transgênicas a fungos fitopatogênicos, frequentemente usam como estratégia expressar genes que codificam β -1,3-glucanases e / ou quitinases vegetais (BROGLIE et al.,1991; JACH et al.,1995), devido à sua capacidade de degradar o polímero β -1,3-glucana e quitina, dois maiores componentes de paredes celulares de fungos.

Quitinases também podem inibir o crescimento de fungos através da ligação a quitina da parede celular dos fungos (STAHL; THEIS, 2004). As plantas desenvolveram β -1,3-glucanases como uma das principais PR-proteínas (relacionada a patogênese) nos seus sistemas de defesa (DE LUCCA; CLEVELAND; WEDGE, 2005). Acredita-se que as β -1,3-glucanases digerem diretamente os polímeros de β -1,3-glucano, sendo β -1,3-glucano o componente principal das paredes de células de fungos, a atividade β -glucanásica poderia resultar na lise celular ou a liberação de fragmentos bioativos da parede celular como elicitores para a indução de reações de defesa das plantas (RYAN; FARMER, 1991).

A transformação genética utilizando genes de quitinases têm sido realizada em muitos trabalhos, empregando genes de diversas fontes. Algumas vantagens das quitinases na proteção de plantas contra patógenos incluem seu potencial fungicida, o fato de possuírem um alvo específico, minimizando efeitos nocivos à planta hospedeira e seu caráter atóxico a humanos e vertebrados superiores, além de conferirem resistência a um amplo espectro de patógenos (WANG *et al.*, 1999, PATIL *et al.*, 2000).

Quitinases ainda podem funcionar como lisozimas e degradar parede celular de bactérias, e pode desempenhar também um papel nos processos de desenvolvimento da planta hospedeira (DE JONG et al, 1992;. TAKAKURA et al., 2000). Além de conferir vantagem adaptativa aos vegetais contra a doenças causadas por fungos, a capacidade de genes de quitinases pode conferir um caráter tóxico também a insetos, o que poderia reduzir os níveis de predação de plantas por esses animais (WANG *et al.*, 1999).

As quitinases de plantas são geralmente endoquitinases, as quais têm massas moleculares com cerca de 30 kDa podendo ter natureza ácida ou

básica. No entanto, é sabido que as quitinases de plantas estão agrupadas em sete classes com respeito à sua estrutura e especificidade do substrato (COLINGE et al, 1993;. NEUHAUS et al, 1996; GOMEZ et al, 2002). A maioria das quitinases leguminosas pertencem a classes I a IV. Como no caso de outras PR-proteínas, quitinases são classificadas como proteínas ácidas extracelulares (MAUCH E STAEHELIN, 1989) ou proteínas vacuolares básicas (NEUHAUS et al., 1991) de acordo com os seus padrões de expressão e de sequências de aminoácidos.

Quitinase de classe I apresenta quatro motivos: peptídeo sinal, domínio rico em cisteína (de ligação a quitina), região de dobradiça e o domínio catalítico (COLLINGE et al., 1993). As quitinases de classe I contém dois domínios principais. O primeiro domínio N-terminal, com cerca de 25 aminoácidos, é rico em cisteínas e possui afinidade de ligação por quitina. Este apresenta alta identidade com o precursor da heveína, lectina de *Hevea brasiliensis*. O segundo, ligado ao domínio lectínico por uma região rica em prolínas, trata-se do domínio catalítico altamente conservado. (SHINSHI et al., 1990; COLINGE et al., 1993).

Castro (2011) realizou um trabalho de caracterização de uma quitinase recombinante de feijão-de-corda expressa em *Pichia pastoris* denominada de rVuChil e estabeleceu que seu valor de ponto isoelétrico está uma faixa de 4,44 a 5,15. As quitinases de classe I estão localizadas principalmente nos vacúolos e são subdivididas nas classes Ia e Ib (THEIS E STAHL, 2004, SHAKBAZAU E KARTEL, 2008). A maioria das quitinases de classe Ia apresentam um elevado pI. As quitinases acídicas pertencentes à classe Ib são secretadas para o espaço apoplástico (ARIE et al., 2000). Jerreissati (2012) conseguiu clonar com sucesso o gene de quitinase de classe I de feijão-de-corda em *N. tabacum* com um peptídeo sinal que a direciona a ser secretada para o meio apoplástico.

1.2 Expressão de quitinases em plantas transgênicas

Doenças causadas por bactérias e fungos são alguns dos principais fatores limitantes na produção agrícola no mundo. Além dos efeitos negativos sobre a produtividade, as doenças também podem afetar a qualidade pós-colheita dos alimentos. Por razões de custo, eficácia e preocupações ambientais, a comunidade científica tem destinado atenção para a produção de transgênicos que possam conferir níveis significativos de resistência a doenças (SALMERON; VERNOOIJ, 1998).

Proteínas antimicrobianas enzimaticamente ativas incluem quitinases, glucanases e lisozimas. Como demonstrado por Punja e Raharjo (1996), cenouras transgênicas que expressam uma quitinase básica do tabaco apresentaram maior resistência a três dos cinco patógenos testados, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Botritis cinerea*. A expressão transgênica em tabaco de um gene que codifica para a lisozima, capaz de degradar quitina e peptidoglicano bacteriano *in vitro*, resultou inicialmente, em plantas mais resistentes à *Erysiphe chicoracearum* (Nakajima et al., 1997).

Plantas da família Solanaceae como *Nicotiana tabacum* L.(tabaco), *Solanum lycopersicum* (tomate) e *Solanum tuberosum* (batata) são importantes culturas comerciais e, portanto são alvo de diversas pesquisas a fim de aumentar a resistências contra patógenos. Foi demonstrado que a expressão constitutiva de uma defensina, MsDef1, de semente de alfafa conferiu forte resistência a *Verticillium dahliae* no campo (GAO et al., 2000). A expressão constitutiva da defensina NmDef02 em batata transgênica demonstrou fornecer uma forte resistência à *Phytophthora infestans* em casa de vegetação e em campo (PORTIELES et al., 2010).

A co-expressão de quitinase de arroz e MsDef1 promoveu uma resistência muito mais forte a *Botritis cinerea* quando comparado a expressão das proteínas isoladas em tomates transgênicos (CHEN et al., 2009). O mesmo foi verificado por Ntui et al. (2011), onde a co-expressão de uma quitinase de *Streptomyces griseus* e de uma defensina de *Wasabia japonica* forneceu resistência mais robusta contra *Fusarium oxysporum* em tabaco transgênico do que a expressão de cada proteína isolada.

O tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) possui um histórico bem estabelecido como planta modelo em cultura de tecidos e para a transformação genética vegetal. Esta espécie é usada como um sistema experimental para estudos de fenômenos básicos em plantas (HELGESON, 1979). A expressão constitutiva de uma endoquitinase de feijão em plantas transgênicas de tabaco e plantas de canola proporcionaram maior proteção contra *Rhizoctonia solani*, um fungo endêmico do solo que infecta diversas espécies de plantas, incluindo as de milho e soja, produzindo sintomas graves no caule e na raiz (BROGLIE et al., 1991). Níveis similares de resistência a *R. solani* foram obtidas com plantas transgênicas de tabaco expressando constitutivamente um gene de quitinase bacteriano isolado de *Serratia marcescens* (JACH et al., 1992).

A expressão de quitinases de insetos em plantas transgênicas de tabaco tem se mostrado letal a larvas, atingindo índices de 100% de mortalidade em besouros da espécie *Oryzaephilus mercator* quando alimentados com uma dieta contendo uma quitinase de *Manduca sexta* (WANG et al., 1999). Em outro trabalho, plantas de tabaco expressando uma quitinase de *Manduca sexta* foram testadas com respeito a uma possível inibição do crescimento das larvas e redução da área foliar danificada por insetos herbívoros. Em experimentos com *Heliothis virescens*, houve efeitos significativos de retardo do desenvolvimento das larvas e diminuição da área foliar danificada (DING et al., 1998). Além da importância das plantas de tabaco como hospedeira de genes de quitinases heterólogas, a própria planta é fonte destas enzimas, a exemplo dos diversos trabalhos que relatam a atividade de quitinases de plantas, contra uma grande variedade de fungos.

Esses estudos são fundamentais para a concepção de uma forma mais eficiente na produção de plantas transgênicas podendo ser usadas para o controle de fungos patogênicos e insetos. Além disso, estudos citológicos podem contribuir com uma melhor compreensão do processo secretor de quitinase e o desenvolvimento de estratégias de clonagem adequadas para secreção de produtos desejados (DAHIYA; TEWARI R; HOONDAL, 2006). As plantas transgênicas expressando quitinases apresentam alvos específicos na proteção contra fungos. Estudos de caracterização e expressão heteróloga de novas quitinases em vegetais são necessários para melhorar a proteção de plantas cultivadas contra esses patógenos (CLETUS et al., 2013).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) transformadas com o gene codificador de uma quitinase de classe I de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*).

2.2 Objetivos Específicos

- Obter geração T2 e T3 do clone T4B6 de *N. tabacum* transformadas com gene VuChil e analisar o padrão de segregação genético;
- Confirmar a presença da sequência VuChil, codificadora de quitinase de feijão de corda em plantas de fumo transformadas nos clones T4A3, T4B6 das gerações T2 e T3;
- Analisar os transcritos da sequência VuChil de plantas de fumo transformadas com a sequência de quitinase de *V. unguiculata*;
- Avaliar os níveis de atividade quitinolítica total e específica de extratos protéicos obtidos de folhas de plantas de fumo transformadas com a sequência VuChil do clone T4B6 geração T2;
- Fracionar a amostra protéica obtida a partir de folhas de plantas transformadas, clone T4B6 geração T2 e não transformadas e avaliar seu perfil cromatográfico.

3. MATERIAIS

3.1 Plantas

Plantas de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi foram transformadas geneticamente por Jereissati (2012) via agroinfecção, com o vetor pCAMBIA1305.2::VuChil, contendo a sequência que codifica uma quitinase de classe I de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*). A sequência foi inserida no vetor binário pCAMBIA1305.02 sob controle do promotor CaMV35S duplicado. O vetor recombinante foi inserido em *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, e essas células foram utilizadas como ferramenta na transformação genética.

3.2 Reagentes

Tampão de extração CTAB 2x, β -mercaptoetanol, clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), RNase, etanol 70%, isopropanol, agarose, tampão *Green GoTaq*, dNTP, iniciadores, *GoTaq* DNA Polimerase (Promega), brometo de etídio, tampão TBE, Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen), nitrogênio líquido, DNase (Qiagen), kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega), oligo dT, *improm-II 5X Reaction Buffer*, sais e vitaminas Murashige e Skoog (MS); sacarose, ágar, canamicina, solução de Hoagland, hipoclorito de sódio, tampão acetato de sódio, quitina coloidal, reagente de Bradford, glucoronidase, tampão acetato de sódio, tetraborato de sódio, potássio, ácido acético P.A, *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB), meio ágar batata dextrose (BDA), solução salina.

4 . METODOLOGIA

4.1 Avaliação da atividade quitinolítica

A determinação da atividade quitinolítica foi realizada seguindo a metodologia descrita por Boller (1993), que teve como parâmetro a liberação de N-acetil-D-glucosamina (NAG), a partir da ação hidrolítica das enzimas sobre quitina coloidal. Para essa finalidade, 250 μL de extrato proteico de tecido foliar, obtido a partir de plantas transformadas (clone T4B6 geração T2), foram incubados com 250 μL de quitina coloidal, a 37 °C, durante 1 hora. A atividade enzimática foi interrompida pela fervura dos tubos, em banho-maria, por 10 minutos. Após resfriamento em banho de gelo, os tubos foram centrifugados a 10.000 x g, por 10 minutos, e alíquotas de 300 μL foram retiradas e incubadas com 10 μL de uma solução da enzima glucoronidase (EC 3.2.1.31), a 37 °C, durante 1 hora.

Para determinação de NAG liberada no ensaio, os 310 μL do hidrolisado foram acrescidos de 190 μL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, e 100 μL de uma solução de tetraborato de sódio 0,6 M. Imediatamente, os tubos foram fervidos em banho-maria por 5 minutos e resfriados em banho de gelo. Foi adicionado 1 mL da solução de ácido acético P.A. : *p*-dimetilaminobenzaldeído 2X (DMAB) em uma proporção (1:1). A mistura foi mantida a 37 °C, por 20 minutos, sob agitação, e imediatamente foi feita a leitura da absorvância de 585 nm. Para cálculo do teor de açúcar liberado no ensaio, uma curva padrão foi construída a partir de soluções de glucose, com concentrações variando de 100 a 500 μM em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 (REISSING et al., 1955). As atividades quitinolíticas total e específica foram expressas em nKat (nmol/mL.s) e nKat/mgP, respectivamente, onde 1 nKat equivale a 1 mol de Nag liberados por segundo.

4.2. Aclimatização dos transformantes e obtenção de sementes

Plantas de fumo transformadas com sequência codificadora de quitinase, clone T4B6, foram cultivadas através de propagação *in vitro* desse material a partir de segmento nodal em meio MS sólido (sais e vitaminas MS; sacarose 3%; ágar 0,7%; pH 5,8) (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de higromicina (50 mg/L). Após a emergência das raízes nos explantes, as plantas foram selecionadas para pré-aclimatação em copos descartáveis contendo areia e vermiculita (1:1), mantidas em sala de cultura sob a temperatura entre 20-22 °C, e regadas periodicamente com solução nutritiva de Hoagland (1950).

Após quatro semanas, essas plantas foram transferidas para vasos contendo areia, regadas periodicamente com solução nutritiva, e mantidas em casa de vegetação até começarem a emitir os botões florais. Então, os botões florais foram cobertos com pano de trama fina para evitar a ocorrência de polinização cruzada e as sementes então foram coletadas. Após aproximadamente duas semanas as sementes puderam ser coletadas e foram armazenadas a 4 °C.

4.3. Análise de segregação

As sementes obtidas das plantas em fumo transformadas com sequência codificadora de quitinase, clone T4B6 da geração T2 e T3, foram desinfestadas em tubos de microcentrífuga estéreis, por imersão em solução de etanol 70% durante 30 segundos, seguida por imersão em solução comercial de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo durante) durante 10 minutos. As sementes foram lavadas, três vezes, com água estéril, e submetidas ao cultivo em meio MS distribuídas em cinco placas de Petri (com 20 sementes por placa) contendo meio de cultura sólido MS basal e em cinco placas de Petri com meio sólido MS acrescido de higromicina (50 mg/L). As placas foram mantidas em câmara de crescimento tipo BOD a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 16 h. Para controle, foram utilizadas sementes não transformadas, submetidos aos mesmos tratamentos.

4.4. Extração de DNA

Os clones T4A3 (geração T1) e T4B6 (gerações T0, T1 e T2) cultivados *in vitro* foram selecionados para extração de DNA, protocolo adaptado como proposto por Doyle e Doyle (1987). Em condições assépticas, as plantas tiveram folhas destacadas e foram selecionados 50 a 60 mg de tecido foliar em tubos de microcentrífuga.

O tecido foi macerado com auxílio de bastão de vidro em 500 μ L de tampão de extração CTAB 2x (Tris-HCl 100 mM pH 8,0; CTAB 2%; EDTA 20 mM; NaCl 1,4 M) pré-aquecido a 60 °C e acrescido de 0,2% (v/v) de β -mercaptoetanol. Após a maceração, as amostras foram mantidas em banho-maria a 60 °C por 1 h, com mistura do conteúdo dos tubos por inversão a cada 15 minutos dos tubos. Então, foi adicionado 1 volume (500 μ L) de solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram invertidos e rotacionados a 10.000 x *g* por 10 minutos em centrífuga Marconi modelo MA-1800. A fase aquosa superior foi coletada, com auxílio de ponteiros com as pontas cortadas, e transferida para tubos novos. O DNA extraído foi precipitado por adição de 1,2 volumes (600 μ L) de isopropanol gelado. Os tubos foram invertidos e mantidos em repouso a temperatura ambiente. Após aproximadamente 2 h, foram centrifugados a 10.000 x *g* por 10 minutos.

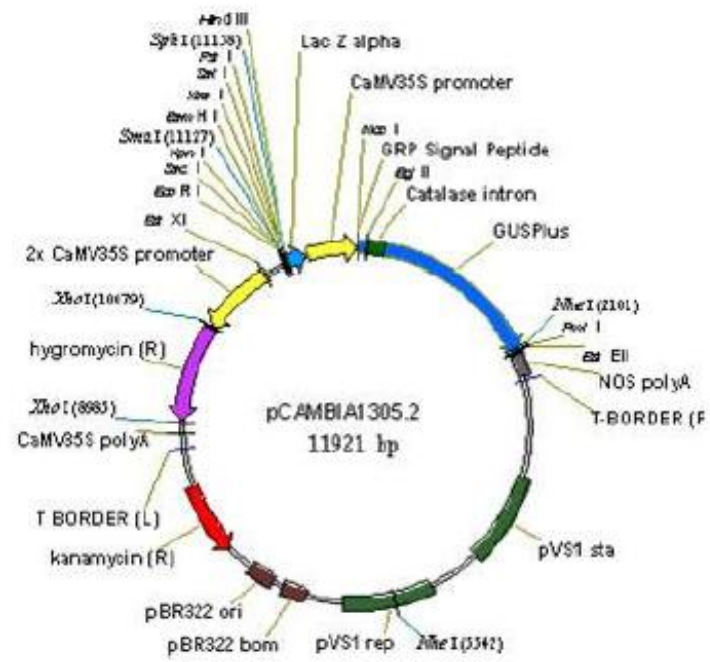
O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos invertidos para secagem por cerca de 10 minutos. Os *pellets* foram lavados com 1 mL de etanol 70% e novamente centrifugados a 10.000 x *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e, após secagem, o DNA extraído foi ressuspenso em 100 μ L de água ultrapura, contendo RNase (20 μ g/mL). As amostras foram quantificadas por espectrofotometria (260 nm) e avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

4.5. Reação em cadeia de polimerase (PCR)

O DNA extraído a partir de folhas de plantas de fumo transformadas com vetor contendo a sequência codificadora da quitinase de feijão-de-corda (VuChil) dos clones T4B6 (gerações T0, T1 e T2) e clone T4A3 (geração T1), os quais foram transformados por JEREISSATI (2012), utilizando vetor binário pCAMBIA 1305.2 (Figura 1). O inserto VuChil foi inserido na região onde corresponde ao gene GUS em que o promotor e a região que codificam um peptídeo sinal que direciona a proteína para o espaço apoplástico foram mantidas na inserção do gene de interesse. Para expressá-la em plantas de *N. tabacum* foi utilizado como molde em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação da região de interesse. Foram realizadas reações com volume final de 25 µL em tampão *Green GoTaq* (MgCl₂ 1,5 mM, pH 8,5); cada dNTP's (200 µM); iniciadores (0,5 µM) e 0,5 U da enzima *GoTaq* DNA Polimerase (Promega). Foram adicionados 500 ng de DNA molde a cada reação e o volume final foi completado com água ultrapura. A reação controle negativo foi realizada com DNA molde extraído de planta não transformada. Uma reação denominada “branco”, seguindo os mesmos parâmetros, foi realizada sem a adição de DNA, somente água, para verificação de possíveis contaminantes nos reagentes, sendo o volume de reação completado com água ultra-pura. A sequência dos iniciadores utilizados nas reações de PCR é (5'-AGAGATCTGAGGCAGTGTGGAAGCCAAGCG-3'), T_m: 66,2 °C, iniciador senso *QuiBg/II* com a inserção de sítio de restrição para a endonucleases *Bg/II* (negrito) enquanto os iniciadores anti-senso *QuiBstEII* (5'-GGGTAACCTCAGACGATGGGATGGAGATTAA-3'), T_m: 62,0 °C, com a adição de sítio para *BstEII* (negrito).

A PCR foi realizada no termociclador PTC-200 (MJ Research) e consistiu em desnaturação inicial a 95 °C durante 2 minutos, seguida de 34 ciclos de desnaturação 95 °C durante 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão à 72 °C por 1 minuto. Finalmente foi realizada uma extensão final a 72 °C durante 5 minutos e a reação foi mantida a 4 °C. Uma alíquota de 5 µL de cada produto da reação foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e observado sob luz ultravioleta em fotodocumentador.

Figura 1: Mapa circular do vetor binário pCAMBIA 1305.2 (CAMBIA Vectors)



4.6 Extração de RNA

O RNA total dos diferentes clones, T4B6 (gerações T0, T1, T2 e T3) e T4A3 (geração T1) de *N. tabacum* transformados gene VuChil foi extraído a partir de tecido foliar, de acordo com o protocolo estabelecido pelo Kit comercial RNeasy® Mini Kit (QIAGEN). Folhas de fumo (3g) foram maceradas em nitrogênio líquido até obter um pó fino. Em seguida, o tecido macerado (100 mg) foi transferido para um microtubo de 1,5 mL. Uma alíquota de 350 µL do tampão RTL, que acompanha o kit, foi adicionada à amostra e a mistura foi homogeneizada. Em seguida, foi adicionado um volume de 250 µL de etanol P.A. à amostra a qual foi homogeneizada e transferida (700 µL) para colunas do tipo *RNeasy Mini Spin*, previamente acopladas a tubos de coleta de 2 mL. Esse material foi submetido a um “*spin*” de 12.000 x *g* (Marconi MA-1800) por 2 minutos, à temperatura ambiente. O material não retido no tubo de coleta foi descartado. Em seguida, 500 µL de tampão RPE foram adicionados ao topo da coluna, que foi novamente centrifugada a 8.000 x *g* por 15 seg, à temperatura ambiente. O material coletado foi descartado e 500 µL de tampão RPE foram novamente adicionados, seguido de centrifugação a 8.000 x *g*, por 2 min, à temperatura ambiente. Após esta centrifugação, a coluna foi transferida para um novo tubo de coleta e 40 µL de água livre de RNAses (Qiagen) foram adicionados a seu topo. Uma última centrifugação foi realizada a 12.000 x *g*, por 1 min, à temperatura ambiente. O material retido no tubo de coleta constituiu o RNA purificado através da coluna de sílica.

A concentração do RNA (ng/µL) foi estimada com base nas leituras das absorbâncias das amostras no comprimento de onda de 260 nm, utilizando-se espectrofotômetro GeneQuant (Pharmacia). O grau de pureza deste RNA também foi avaliado, neste equipamento por meio da verificação da presença de carboidratos (relação das absorbâncias nos comprimentos de onda de 260 e 230 nm) e/ou proteínas (relação das absorbâncias nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm). Para avaliar a integridade do RNA, 500 ng foram aplicados em eletroforese em gel de agarose 1,0%.

4.7 Síntese do cDNA (RT-PCR)

O RNA extraído das plantas foi submetido à reação de transcrição reversa (RT) para a síntese do cDNA de fita simples. A reação foi realizada utilizando o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) em termociclador Amplitherm (Thermal cyclers). 1 µg de RNA total, 1,5 µL de oligo dT (0,5 µg/µL) e o volume completado para 11,6 µL com água ultrapura. As amostras foram incubadas a 70 °C, por 5 minutos, e a 4°C durante 5 minutos e, em seguida, incubadas no gelo. Após a incubação, foi preparada uma nova mistura de reação, constituída de 4 µL de ImProm-II 5X Reaction Buffer, 2,4 µL de MgCl₂, 1 µL de dNTP (10mM) e 1 µL ImProm-II Reverse Transcriptase totalizando-se um volume de 20 µL. Esses 20 µL da mistura de reação foram incubados à 25 °C durante 5 minutos, 42 °C durante 1 hora, 70 °C durante 15 minutos e a reação foi, então, mantida a 4 °C.

A seguir, 1 µL da reação foi submetido a reação de PCR (tópico 4.4), com os iniciadores (tópico 4.5), consistindo em desnaturação inicial a 95 °C durante 3 minutos, anelamento a 55 °C durante 1 minuto, extensão a 72 °C durante 2 minutos, seguidos de 34 ciclos de desnaturação (95 °C durante 1 minuto), anelamento e extensão. A extensão final durou 5 minutos e a reação foi, então, mantida a 4 °C. Um volume de 5 µL de cada produto da PCR foi analisado, por meio de eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e observado sob luz ultravioleta.

4.8 Extração proteica de tecidos vegetais

Foram coletados 30 g de tecido foliar a partir de plantas transformadas com sequência codificadora de quitinase de feijão-de-corda, clone T4B6 geração T2, macerado em nitrogênio líquido até formar um pó fino. O macerado foi homogeneizado com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, onde para cada 1 g de folha, foram adicionados 3 mL de tampão. A amostra ficou sob agitação durante 3 horas, e então, foi filtrada utilizando-se pano de trama fina. O filtrado foi centrifugado em centrífuga Eppendorf modelo 5810R, por 30 minutos a 10.000 x g, 4 °C. O sobrenadante foi coletado e filtrado em papel de filtro.

Após filtração em papel de filtro a amostra foi dialisada por 48 h. A diálise foi realizada contra tampão de extração acetato de sódio 50 mM pH 5,2, sob agitação, sendo o tampão trocado a cada 4 horas. Após a diálise, o extrato total foi centrifugado novamente e o precipitado descartado. As amostras foram armazenadas em banho de gelo para quantificação proteica pelo método de Bradford (1976) e mantidas em refrigeração a 4 °C.

4.9 Cromatografia de Afinidade

A amostra obtida após a extração proteica foi dialisada exaustivamente contra água e concentrada através de liofilização. O volume do extrato, contendo um total de 10 mg de proteínas, foi mantido em contato com a matriz de quitina, previamente equilibrada com tampão de extração, por aproximadamente 16 horas, a 4°C.

O pico não retido foi eluído utilizando o tampão de extração, acetado de sódio 50 mM pH 5,2. Dois picos adsorvidos foram eluídos da matriz cromatográfica: primeiro eluído usando ácido acético 0,1 M e o pico seguinte eluído com ácido acético 0,5 M. Foram coletadas frações de 5,0 mL no pico não retido a um fluxo constante de 1mL/minuto e frações de 1,0 mL nos picos adsorvidos a um fluxo de 1mL/minuto. As frações foram monitoradas através leitura a 280 nm em espectrofotômetro. As amostras foram dialisadas exaustivamente contra água e armazenadas a -20 °C.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade Quitinolítica

Ensaio da atividade quitinolítica foram realizados com amostras de extrato proteico de folhas, sem diluição. Foi verificado que os extratos proteicos contêm um alto *pool* de quitinases, por ter extrapolado a curva do DMAB. Foi necessário, então, a repetição do ensaio, a partir do extrato protéico diluído 40 vezes, em que os resultados da atividade da quitinase iriam ser calculados.

Uma grande variação, tanto na quantidade de proteína total solúvel quanto nas atividades quitinolíticas total e específica foi detectada no grupo das plantas transformadas, embora os dados demonstrem pouca diferença desses parâmetros em relação às plantas não transformadas e transformadas, o que pode ser explicado pela presença de quitinases endógenas em tecidos de *N. tabacum* (Figura 1 e 2).

Os resultados obtidos nos ensaios da atividade quitinolítica demonstrou que o clone T4B6 apresentou maior atividade quitinolítica específica maior do que o clone T4A3. A partir desses resultados o clone T4B6 foi o escolhido para dar sequência na obtenção das sementes nas progênes desse clone.

Figura 2 - Atividade quitinolítica específica de extrato total dos clones T4A3, T4B6, T4B6-T1 e Controle (planta não transformada) contra o substrato quitina coloidal. Reações foram realizadas em triplicata. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de NAcGlc por minuto.

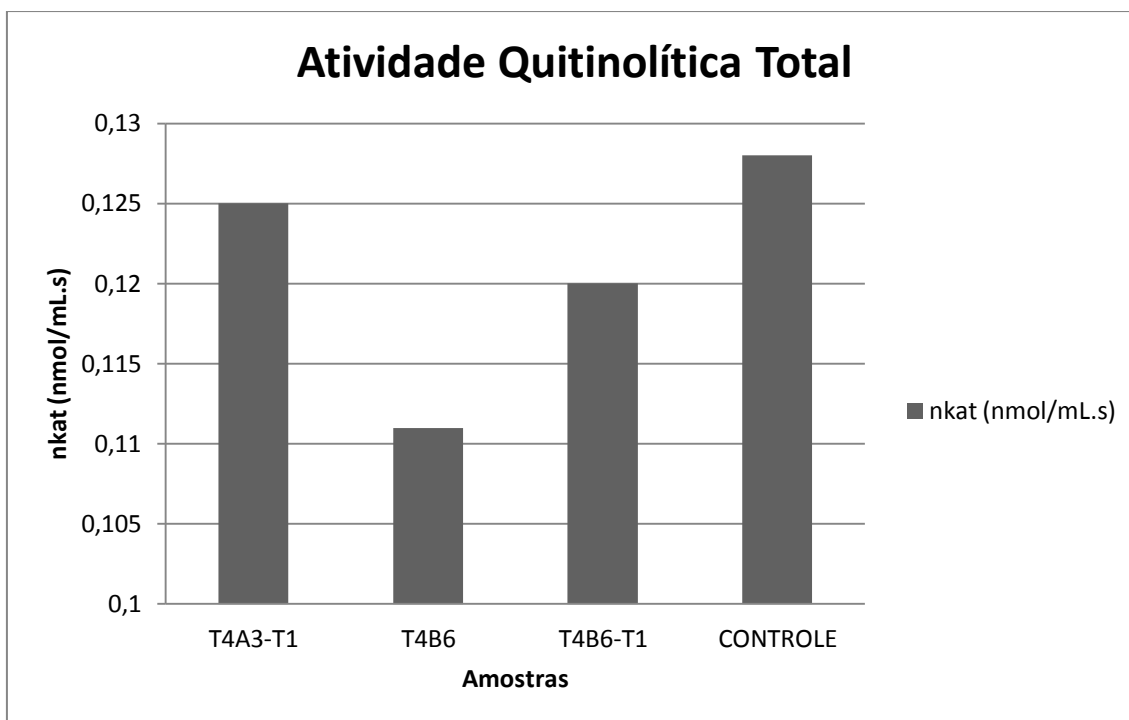
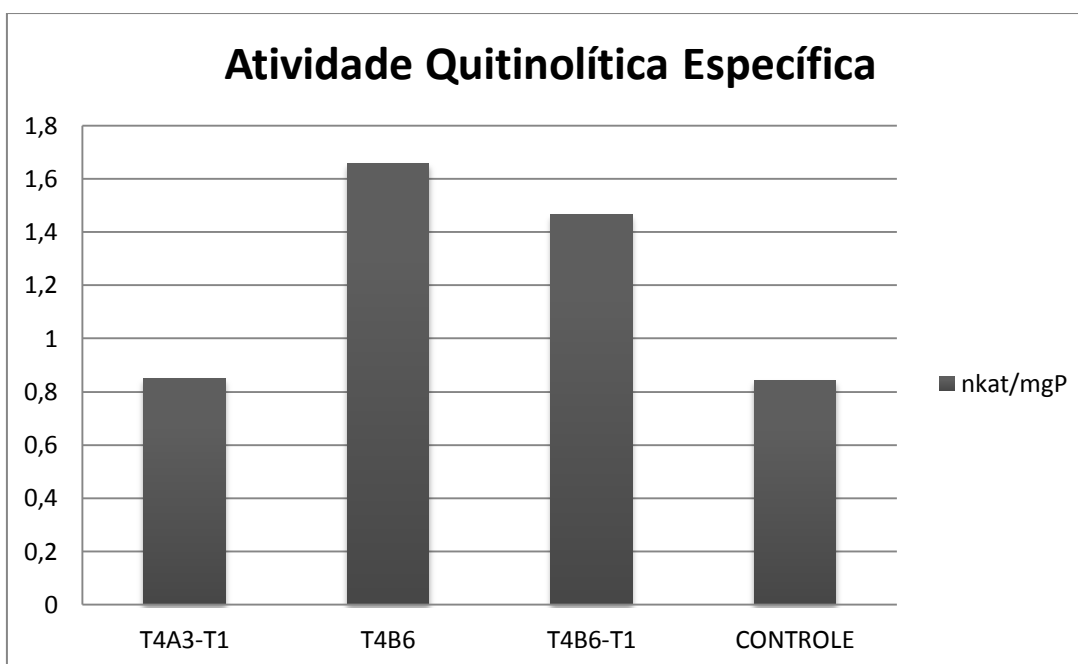


Figura 3 - Atividade quitinolítica específica de extrato total dos clones T4A3, T4B6, T4B6-T1 e Controle (planta não transformada) contra o substrato quitina coloidal. Reações foram realizadas em triplicata. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de NAcGlc por minuto por mg de proteína.



5.2 Análises da Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O T-DNA, porção do plasmídeo contida entre as bordas esquerda e borda direita do vetor de expressão pCAMBIA 1305.2 (Figura 1) contém o gene marcador de seleção *hpt II*, que codifica para Higromicina fosfotransferase (HPT), que confere resistência ao antibiótico higromicina. Essa enzima inativa por fosforilação o antibiótico higromicina, de forma que as células transformadas, que expressam o fragmento inserido, podem sobreviver em meio contendo este tal agente de seleção.

Partindo de plantas que conseguiram crescer em meio seletivo, foi extraído DNA de cinco diferentes plantas correspondentes aos clones T4A3, geração T1 e clone T4B6, das gerações T0, T1 e T2 de *N. tabacum* transformadas com a sequência codificadora de da quitinase de classe I de feijão-de-corda (VuChil). Das seis amostras avaliadas, cinco tiveram sua transformação confirmada pela presença de um fragmento com aproximadamente 898 pb correspondente à Vuchil (Figura 4). Não foi observada amplificação do fragmento equivalente a sequência Vuchil a partir de DNA extraído de planta não transformada, utilizada como controle da reação. As cinco amostras confirmadas correspondem a três diferentes clones selecionados anteriormente.

Os clones selecionados nos quais a sequência de interesse não foi identificada podem ter mantido o gene marcador de seleção e ter perdido o gene de interesse, como é relatado na literatura a ocorrência de escape gênico na seleção de plantas transformadas mesmo com o enraizamento nos controles submetidos à pressão seletiva. A detecção de escapes na triagem de linhagens selecionadas pode ser decorrente de perda de DNA (HORSCH et al., 1985).

Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% de produtos de PCR para amplificação da sequência Vuchil codificadora de uma quitinase de *V. unguiculata* a partir de DNA genômico de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi. M: Marcador ϕ X174 DNA digerido com *Hae*III (150 ng). 1 e 2: DNA de planta de fumo transformada (geração T1) clone T4A3. 3 e 4: DNA de planta de fumo transformada (geração T0) do clone T4B6.. 5 e 6: DNA de planta de fumo transformada (geração T1) do clone T4B6. 7 e 8: DNA de planta de fumo transformada (geração T2) do clone T4B6. 9: Controle negativo, planta não transformada. 10: Branco.



A partir da confirmação por PCR, dos clones que continham o inserto pCAMBIA1305.02::VuChil, foram selecionadas plantas para a produção da progênie desses transformantes primários, com intuito de verificar se o gene VuChil estava sendo transmitido para a progênie.

5.3 Seleção de plantas transformadas

O transformante confirmado por PCR, T4B6 foi aclimatizado em vasos contendo areia e húmus e sementes da geração T2 e T3 foram obtidas. Ambas as gerações de plantas transgênicas, geradas por autofecundação de parentais portadores de cópias do transgene, foram testadas com relação à estabilidade da herança do transgene. Para as duas gerações, originadas de cruzamentos independentes, o padrão de segregação não diferiu das proporções mendelianas esperadas (3:1), de acordo com o teste do qui-quadrado (X^2) realizado (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise de segregação da resistência ao antibiótico higromicina em progênie oriundas da autofecundação de plantas de *N. tabacum* var *Xanthi* transformadas com Vuchil .

Progênie	Fenótipos Observados*		Hipótese**	Proporção Esperada		X^2	P
	G	N		G	N		
T4B6-T2	64	16	3:1	60	20	0,816667	>0,05
T4B6-T3	62	18	3:1	60	20	0,15	>0,05

*G – sementes que germinaram em meio MS contendo higromicina; N – sementes que não germinaram em meio MS contendo higromicina.

**Considerando uma inserção do T-DNA e dominância completa.

As sementes obtidas foram cultivadas em meio MS basal e meio MS acrescido de higromicina (50 mg/L). Como controle, foram utilizadas sementes de plantas não transformadas, seguindo os mesmos tratamentos. A expressão do gene *hptII* foi avaliada em meio seletivo, contendo higromicina. Sementes de plantas não transformadas não se desenvolveram, atestando a eficácia do agente de seleção. Sementes não transformadas apresentaram uma alta taxa de germinação quando comparadas aos percentuais encontrados para as plantas transformadas, pois a germinação é contabilizada no momento em que a radícula emerge da semente.

Durante a primeira semana (Figura 5) é possível verificar que sementes não transformadas em meio seletivo chegam a germinar. Porém na quarta semana (Figura 6), quando as reservas nutricionais contidas nas sementes sem esgotam e a planta começa a absorver os nutrientes do meio juntamente com o agente de seleção, por não conseguir metabolizar a higromicina seu desenvolvimento é reduzido e o comprimento da radícula não ultrapassa 10 mm, enquanto o comprimento das radículas emitidas em plantas transformadas em meio contendo antibiótico varia entre 60 mm 70 mm.

Parâmetros, como percentual de germinação e comprimento da raiz também foram avaliados no período de quatro semanas durante o desenvolvimento das plântulas (Figura 7 e 8) para a geração T2 e (Figura 9 e 10) para geração T3.

Figura 5 - Aspecto de germinação de sementes do clone T4B6-T3 de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi após uma semana de cultivo a) planta não-transformada em meio contendo higromicina, b) planta não transformada em meio sem antibiótico, c) planta transformada com gene de *V. unguiculata* em meio contendo higromicina, e d) planta transformada com gene de *V. unguiculata* em meio MS sem antibiótico. Escala: 1 cm.

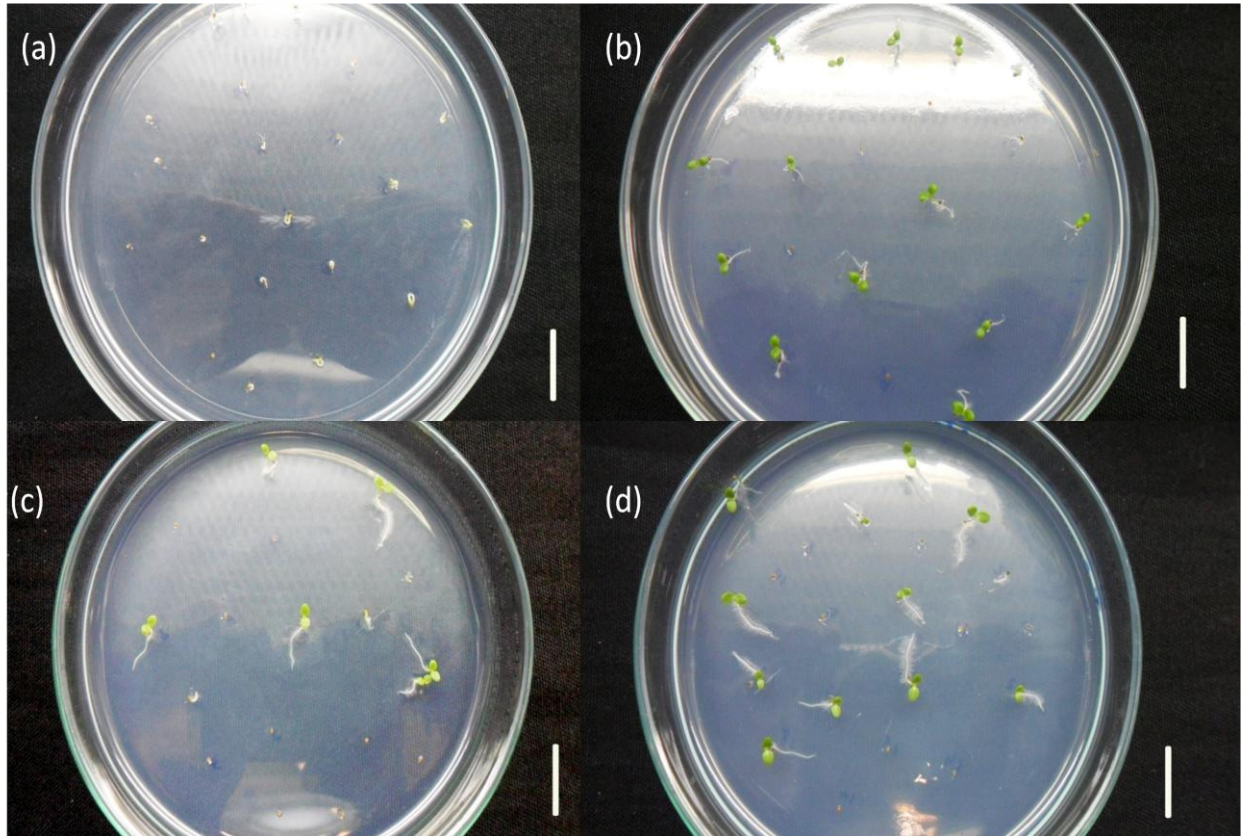


Figura 6 - Aspecto de germinação de sementes do clone T4B6-T3 de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi após quatro semanas de cultivo a) planta não-transformada em meio contendo higromicina, b) planta não transformada em meio sem antibiótico c) planta transformada com gene de *V. unguiculata* em meio contendo higromicina, e d) planta transformada com gene de *V. unguiculata* em meio MS sem antibiótico. Escala: 1 cm.

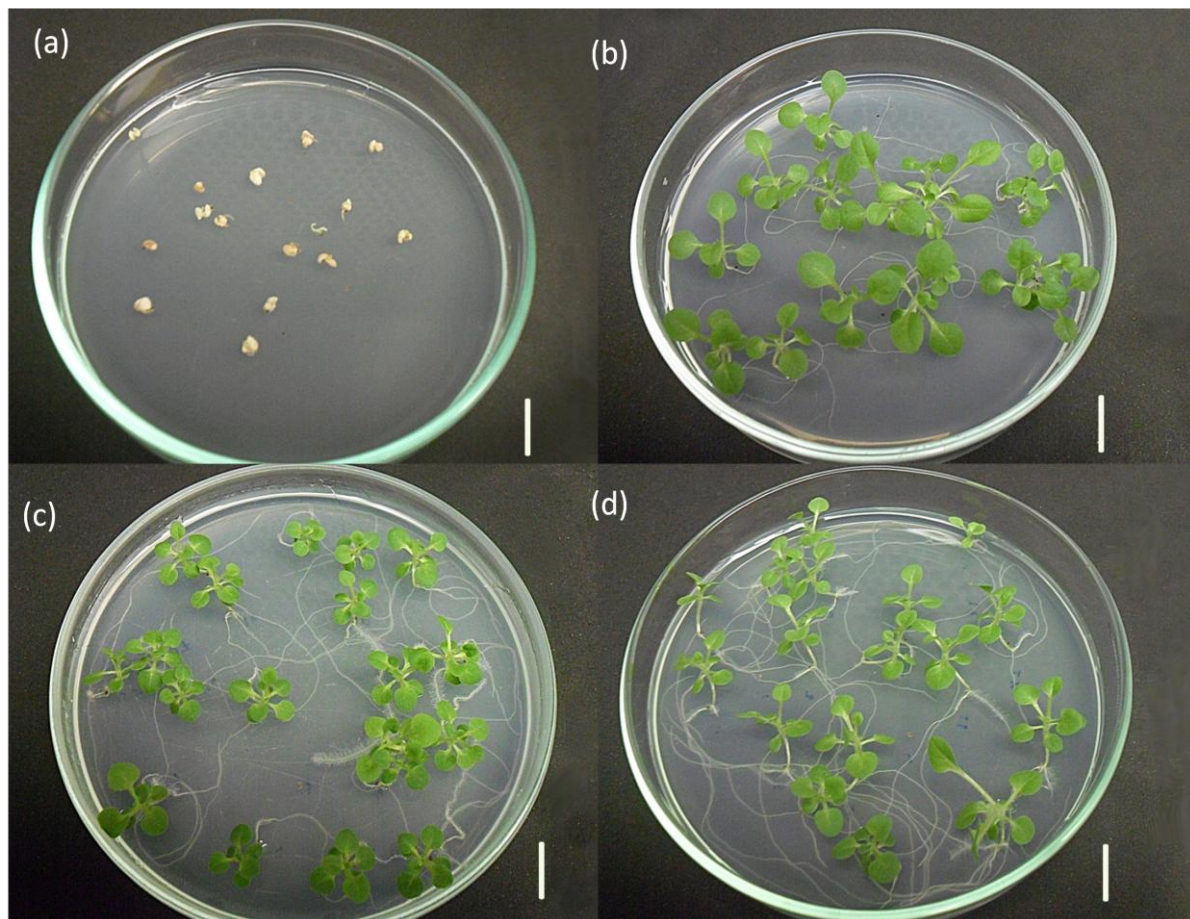


Figura 7 - Percentual de germinação das sementes do clone T4B6-T2 (em porcentagem) na geração T₂. Controle (MS0): planta de fumo não transformada em meio sem antibiótico. Controle (MSH): planta de fumo não transformada em meio contendo higromicina. T4B6-T2 (MS0): planta de fumo transformada em meio sem antibiótico. T4B6-T2 (MSH): planta de fumo transformada em meio contendo antibiótico.

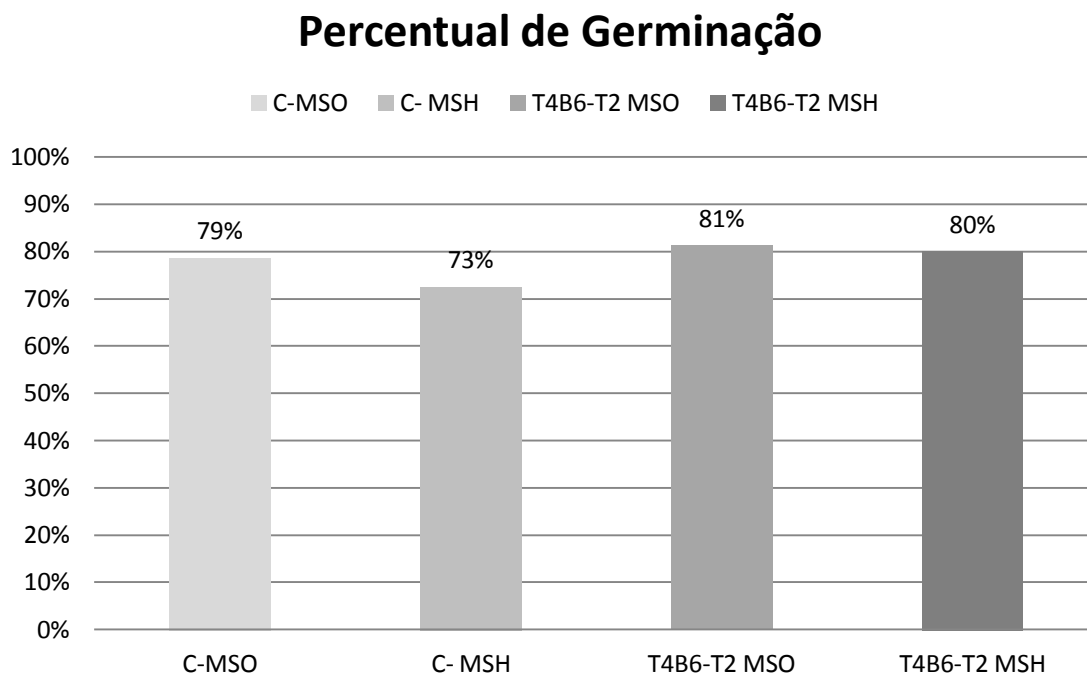


Figura 8 - Comprimento médio das radículas emitidas em quatro semanas (mm) na geração T₂. Controle (MS0): planta de fumo não transformada em meio sem antibiótico. Controle (MSH): planta de fumo não transformada em meio contendo higromicina. T4B6-T2 (MS0): planta de fumo transformada em meio sem antibiótico. T4B6-T2 (MSH): planta de fumo transformada em meio contendo antibiótico.

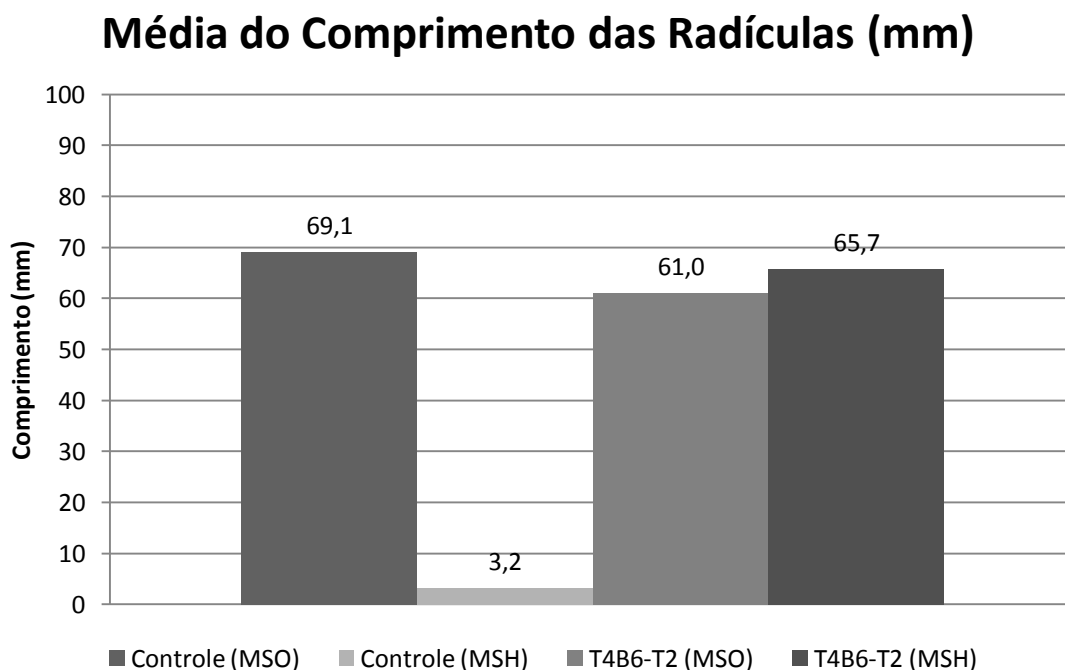


Figura 9 - Percentual de germinação das sementes (em porcentagem) na geração T₃.

Controle (MS0): planta de fumo não transformada em meio sem antibiótico. Controle (MSH): planta de fumo não transformada em meio contendo higromicina. T4B6-T3 (MS0): planta de fumo transformada em meio sem antibiótico. T4B6-T3 (MSH): planta de fumo transformada em meio contendo antibiótico.

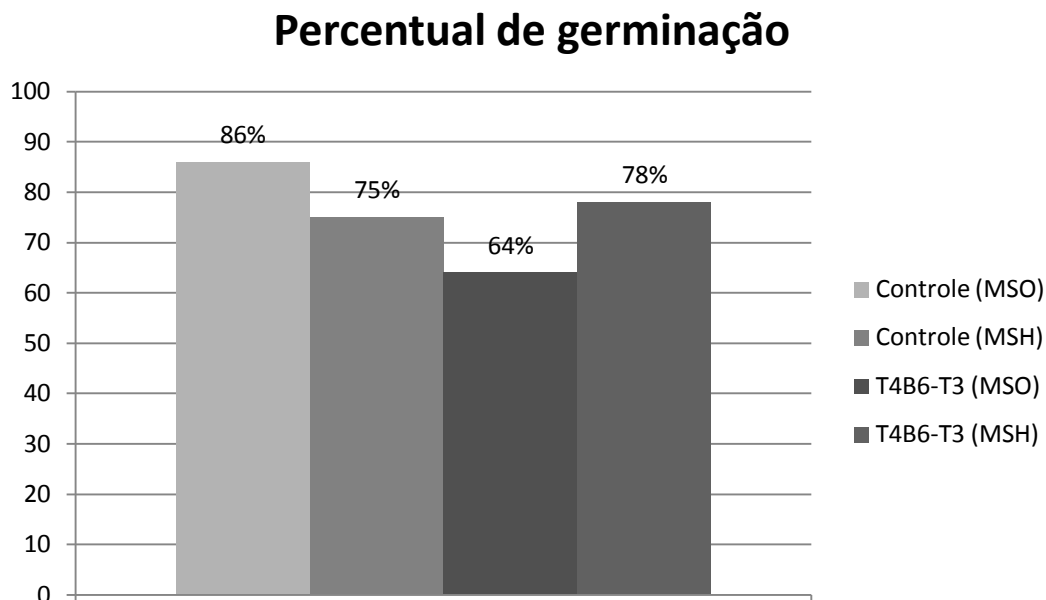
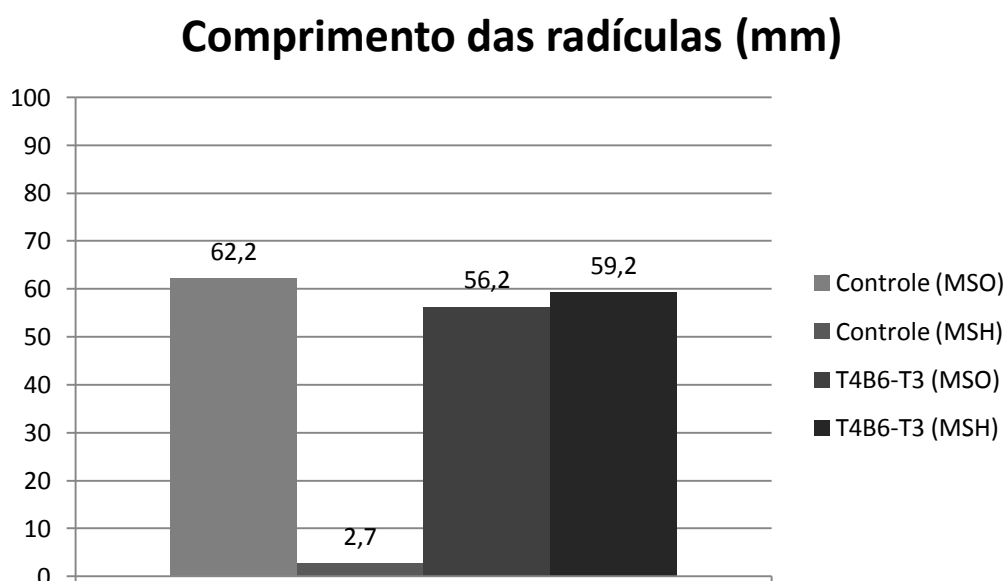


Figura 10 - Comprimento médio das radículas emitidas em quatro semanas (mm) na geração T₃.

Controle (MS0): planta de fumo não transformada em meio sem antibiótico. Controle (MSH): planta de fumo não transformada em meio contendo higromicina. T4B6-T3 (MS0): planta de fumo transformada em meio sem antibiótico. T4B6-T3 (MSH): planta de fumo transformada em meio contendo antibiótico.



A estabilidade do gene marcador de seleção *hptII* foi manifestada em sua hereditariedade como um gene dominante de acordo com as leis de Mendel nas duas gerações do clone T4B6 analisadas. Considerando o nível de significância de 5%, as progênies oriundas do clone T4B6-T2 (geração T₂) e T4B6-T3 (geração T₃) apresentaram padrão de segregação Mendeliano na proporção 3:1.

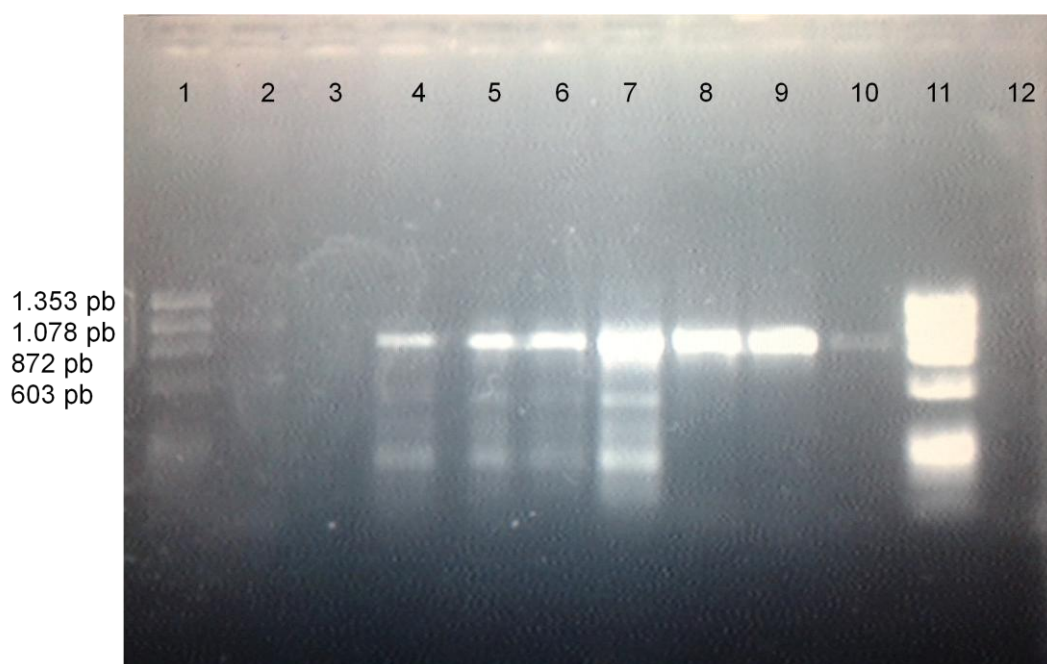
Apesar do desenvolvimento das plântulas e sua capacidade de resistir a pressão seletiva imposta pelo antibiótico, em 1997 Zhan e colaboradores, verificaram que sistemas de seleção não são completamente eficientes, o que pode resultar em escapes e na seleção de plantas não transformadas, que não apresentam resistência ao agente seletivo. Isso pode ocorrer uma vez que células não transformadas não fiquem diretamente expostas a ação do antibiótico e estejam protegidas pela atividade de células próximas transformadas.

5.4 Análise dos transcritos (RT-PCR)

A partir das amostras confirmadas por PCR, os clones T4B6 obtidos da geração T2 e T3 foram selecionados para extração de RNA para verificar a expressão do gene da Vuchil, utilizando a técnica de RT-PCR. Após a extração as amostras foram quantificadas e posteriormente, aplicadas em gel de agarose 1,0% para verificar a integridade das amostras. Bandas 28S e 18S do RNA ribossomal apresentaram-se claramente visíveis no gel de eletroforese de agarose, confirmando a integridade das amostras de RNA.

Estas amostras de RNA íntegras foram submetidas à reações de RT-PCR, onde foi visualizado por eletroforese a presença do mesmo fragmento verificado na reação de PCR, de 898 pb, correspondentes à sequência de VuChil (Figura 11), confirmando a expressão do gene da quitinase nas quatro gerações do clone T4B6. Não foi observado amplificação do fragmento equivalente a partir de RNA extraído de planta não transformada, utilizado como controle da reação.

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1,0% de cDNA extraído de folhas de plantas de fumo transformadas com a VuChil de *Vigna unguiculata* e plantas de grupo controle, obtidos através de RT-PCR. 1 e 11: Marcador ϕ X174 DNA digerido com *Hae*III. 2: Controle negativo, cDNA de planta não transformada. 3: Nesse poço não foi aplicada nenhuma amostra. 4: cDNA de planta de fumo transformada (geração T1) clone T4A3. 5 e 6: cDNA de planta de fumo transformada (geração T0) clone T4B6. 7: cDNA de planta de fumo transformada (geração T1) clone T4B6. 8: cDNA de planta de fumo transformada (geração T2) clone T4B6. 9: cDNA de planta de fumo transformada (geração T3) clone T4B6. 10: C+: Controle positivo (Amostra de clone T4B6 anteriormente confirmada). Em todos os poços foram aplicados 500 ng de cDNA. 12: Branco.



5.5 Cromatografia de afinidade

Quando submetida à cromatografia de afinidade em coluna de quitina, ambos os extratos de proteínas obtidas a partir de plantas transformadas (Figura 12) e não transformadas (Figura 13), apresentaram dois picos eluídos, respectivamente, com ácido acético 0,1 M e ácido acético 0,5 M. As frações correspondentes aos picos cromatográficos foram coletadas e analisadas separadamente por eletroforese. As frações obtidas no processo cromatográfico foram analisadas quanto a atividade de clivar polímeros de quitina.

Após a obtenção dos dois picos observados, Vcpl, primeiro pico eluído com ácido acético 0,1 M e pico dois, VcplII, segundo pico eluído com ácido acético 0,5 M foram concentrados por liofilização. O mesmo ocorreu com os picos obtidos a partir do extrato protéico de plantas não transformadas (Figura 13). No cromatograma, (Figura 13), vê-se que o VcplII atinge uma absorvância medida a 280 nm de 2,330 , enquanto que na amostra controle, não transformada, o pico com maior absorvância detectada foi o primeiro pico após o pico não retido, Cpl, de 0,249.

A eletroforese contendo os extratos totais de plantas transformadas e não transformadas juntamente com os picos obtidos em ambas as cromatografias foi realizado porém os dados obtidos não foram conclusivos, tendo em vista que as amostras aplicadas não estavam concentradas o suficiente para que as bandas esperadas pudessem ser detectadas utilizando Comassie Brilliant Blue. Broekaert em 1988 observou duas isoformas de quitinases em folhas de tabaco, com peso molecular de 34 kDa e 32 kDa. Assim como Shinshi (1987) detectou também a presença de duas isoformas de quitinases em tecido medular de tabaco.

Figura 12 - Fracionamento de amostra protéica de tecido foliar de plantas transformadas.

A coluna de quitina foi equilibrada e o pico não retido foi eluído com acetato de sódio 50 mM pH 5,2 , o pico 1 foi eluído usando ácido acético 0,1 M e o pico 2 foi eluído utilizando ácido acético 0,5 M. A cromatografia foi realizada em uma coluna de 50 mL, utilizando um fluxo de 1 mL/min e coletando frações de 1 mL.

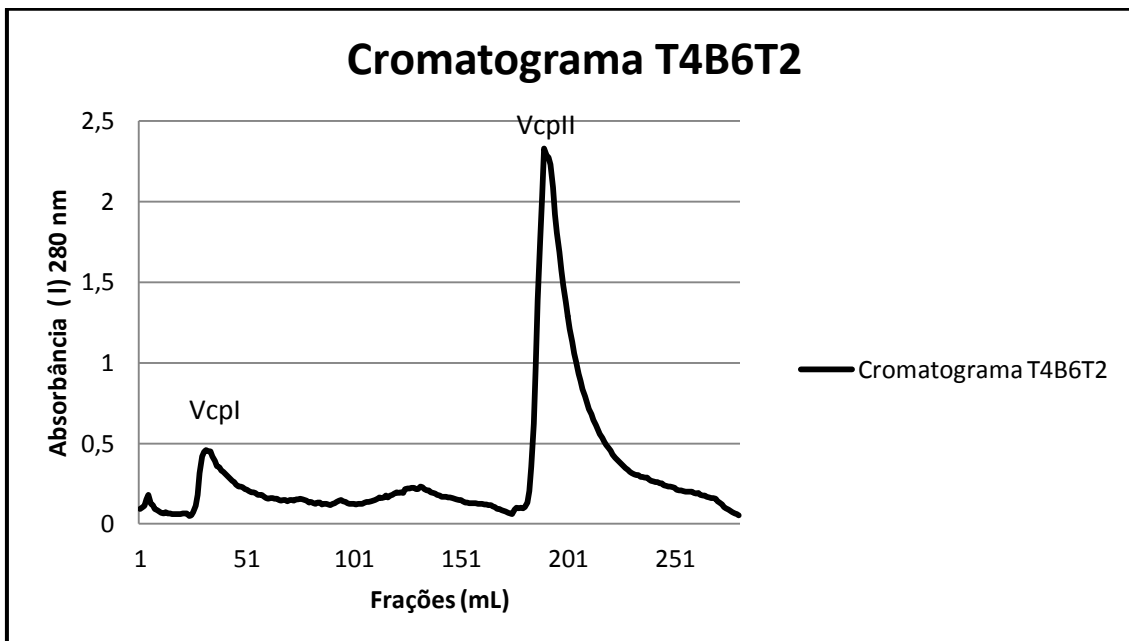
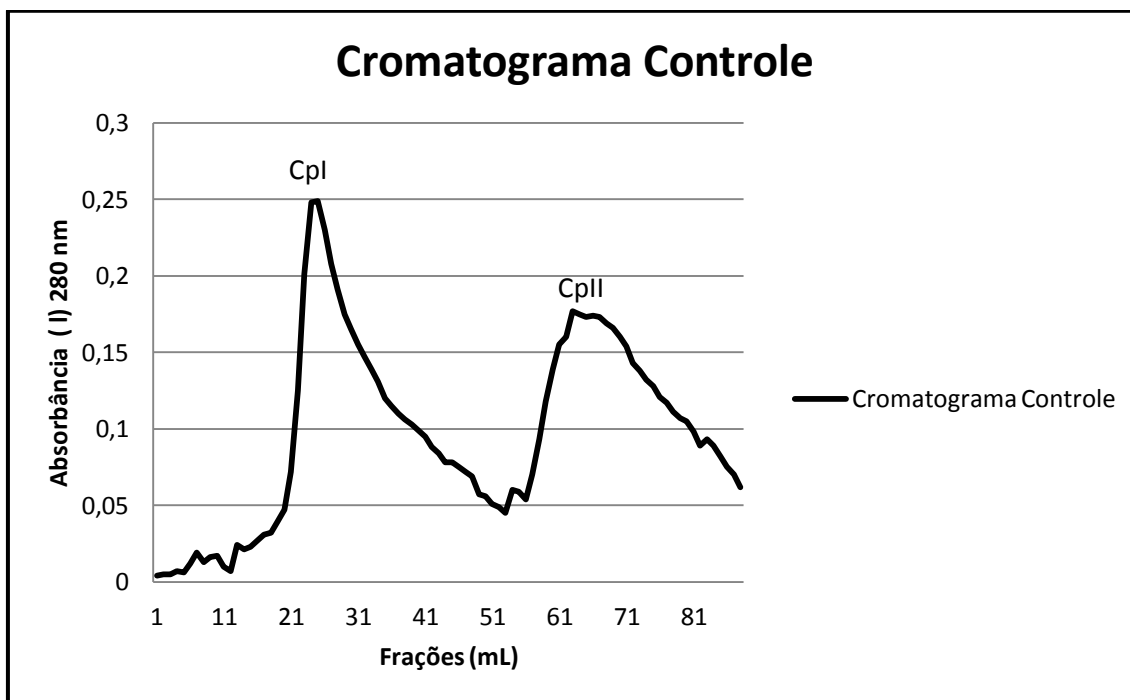


Figura 13 - Fracionamento de amostra protéica de tecido foliar de plantas não transformadas. A coluna de quitina foi equilibrada e o pico não retido foi eluído com o acetato de sódio 50 mM pH 5,2 , o pico 1 foi eluído usando ácido acético 0,1 M e o pico 2 foi eluído utilizando ácido acético 0,5 M. A cromatografia foi realizada numa coluna de 50 mL, utilizando um fluxo de 1 mL/min e coletando frações de 1 mL.



5.6 Atividade Quitinolítica dos Picos da Cromatografia

Com a obtenção de picos dos extratos proteicos a atividade enzimática das frações obtidas foram testadas. A atividade foi realizada para o picos obtidos na cromatografia em coluna de quitina com extratos proteicos de amostras não transformadas Cpl e Cpll, e para extratos proteicos de plantas transformadas Vcpl e Vcpll, quanto para extratos totais de plantas transformadas e não transformadas.

Ensaio da atividade quitinolítica foram realizados novamente, agora com os extratos proteicos de folhas e as amostras obtidas na cromatografia de afinidade. Os picos foram dialisados contra água e depois concentrados por liofilização e dosados pelo método de Bradford para o cálculo da atividade quitinolítica específica. Uma grande variação, tanto na quantidade de proteína total solúvel quanto nas atividades quitinolíticas total e específica foi detectada no grupo das plantas transformadas, embora os dados demonstrem pouca diferença desses parâmetros em relação às plantas não transformadas e transformadas, o que pode ser explicado pela presença de quitinases endógenas em tecidos de *N. tabacum* (Figura 14 e 15).

Figura 14 - Atividade quitinolítica total contra o substrato quitina coloidal. Reações foram realizadas em duplicatas. EXT C: Extrato protéico da planta não transformada. Cpl: Pico I da planta não transformada. CplI: Pico II da planta não transformada. EXT T4B6: Extrato protéico da planta transformada clone T4B6-T2. Vcpl: Pico I da planta transformada clone T4B6-T2. VcplI: Pico II da planta transformada clone T4B6-T2. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de NAcGlc por minuto.

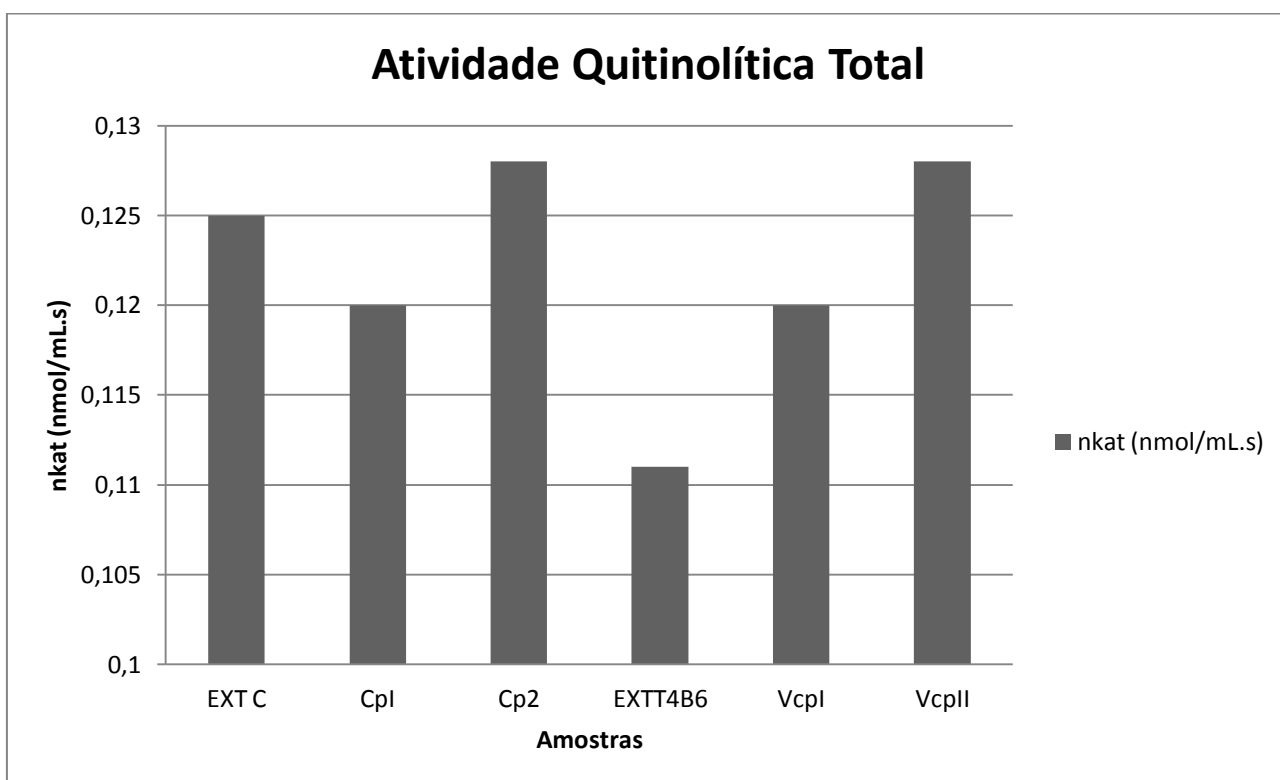
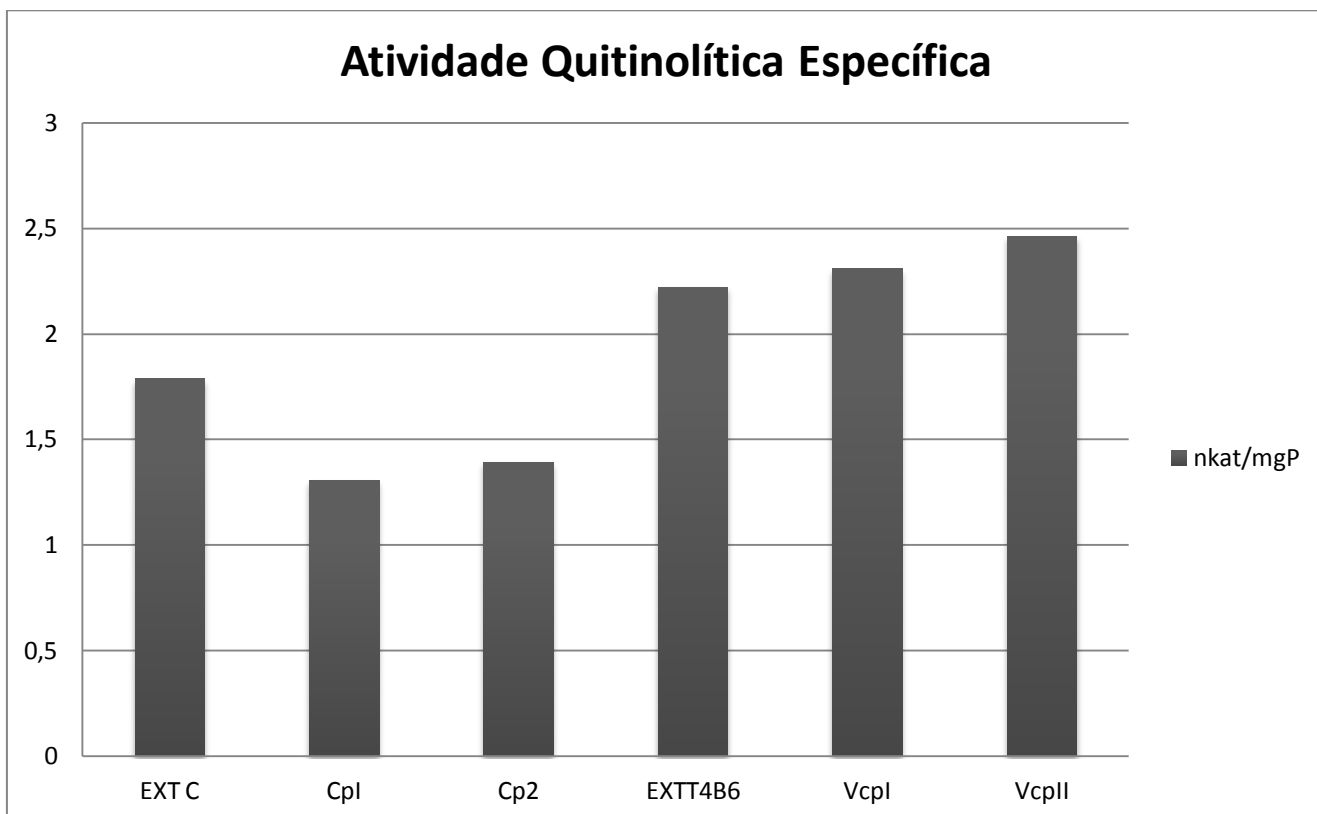


Figura 15 - Atividade quitinolítica específica contra o substrato quitina coloidal. Reações foram realizadas em duplicatas. EXT C: Extrato protéico da planta não transformada. Cpl: Pico I da planta não transformada. CpII: Pico II da planta não transformada. EXT T4B6: Extrato protéico da planta transformada clone T4B6-T2. Vcpl: Pico I da planta transformada clone T4B6-T2. VcpII: Pico II da planta transformada clone T4B6-T2. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar $1\mu\text{mol}$ de NAcGlc por mim por mg de proteína total.



Para maior compreensão, na obtenção dos resultados de atividade quitinolítica específica (Figura 15) as concentrações das amostras protéicas foram utilizadas para calcular a atividade específica. Com os valores de atividade total divididos pela concentração das proteínas é possível verificar diferença de atividade entre os resultados na atividade quitinolítica total e específica, uma vez que as amostras de Cpl e Cpll apresentam maior atividade quitinolítica total (Figura 14) quando comparadas as amostras restantes, no entanto, no momento em que esses valores são divididos pela concentração contida na amostra vê-se um aumento na atividade das frações Vcpl e Vcpll e do extrato total, os quais correspondem as amostras extraídas do clone T4B6 da geração T2 de plantas transformadas.

A grande variabilidade encontrada entre os diferentes clones de plantas transformadas pode ser explicada pela baixa especificidade e uniformidade do processo de integração do T-DNA no genoma da célula vegetal, ocorrendo de maneira aleatória e em um número indefinido de locais, sendo possível a integração do transgene na forma de repetições *in tandem*, embora sejam mais comumente descrita para protocolos de transformação genética envolvendo biobalística, eletroporação e microinjeção (DE LA RIVA et al., 1998; KUMAR E FLADUNG, 2001).

A análise ultra-estrutural de tecidos infectados por fungos de tipo selvagem e de plantas de canola transgênicas que expressam constitutivamente o gene da endoquitinase feijão, mostrou que as hifas invasoras de *R. solani* em plantas transgênicas são submetidos a decomposição da quitina, ruptura da parede ocasionando fuga de protoplasma (BENHAMOU et al, 1993) . Como esses recursos não foram vistos em infectados do tipo selvagem, , sugeriu-se que a expressão constitutiva da quitinase em plantas de canola é, pelo menos, parte responsável pela proteção aprimorada contra ataque de fungos.

As quitinases demonstram pontencial para aumentar os níveis de resistências contra a infecção à fungos fitopatogênicos. Estudos de atividade biológica da quitinase de classe I de feijão-de-corda são necessários para validar a eficiência da atividade dessa enzima em combater infecção desempenha pelo fungo.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho as plantas de fumo transformadas com o inserto VuChil, que codifica para uma quitinase de *Vigna unguiculata*, tiveram sua transformação e expressão do gene confirmadas. Análises de segregação mostraram que o transgene foi transmitido para a progênie segundo proporções mendelianas pelo teste do qui-quadrado. Atividade quitinolítica foi detectada e superior aos valores detectados em amostras de plantas não transformadas.

REFERÊNCIAS

- ARIE, M., HIKICHI, K., TAKAHASHI, K., ESAKA, M. Characterisation of basic chitinase which is secreted by cultured pumpkin cells. **Physiologia Plantarum**, v. 110, p. 232-239, 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BAYKAL, U., MOYNE, A.-L., & TUZUN, S. A frameshift in the coding region of a novel tomato class I basic chitinase gene makes it a pseudogene with a functional wound-responsive promoter. **Gene**, 376(1), 37–46, 2006.
- BAYSAL, Ö., SIRAGUSA, M., GÜMRÜKCÜ, E., ZENGİN, S., CARIMI, F., SAJEVA, M., DA SILVA, J.A.T. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum f. melongenae* by ISSR and RAPD markers on eggplant. **Biochem. Genet.** 48, 524–53., 2010.
- BENHAMOU N, BROGLIE KE, CHET I, BROGLIE R: Antifungal Action of a Bean Endochitinase Gene in Transgenic Canola Plants. **Plant Journal**, in press, 1993.
- BROGLIE K, CHET I, HOLLIDAY M, CRESSMAN R, BIDDLE P, KNOWLTON S, MALWAIS CJ, BROGLIE R. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *rhizoctonia solani*. **Science**, 254:1194--1197, 1991.
- CARVALHO, A. O., LIMA, O., MACHADO, T., DA, M., SANTOS, I. S., & GOMES, V. M. Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds, 39, 137–146, 2001.
- CASTRO, P.G. Produção em *Pichia pastoris* de uma quitinase de feijão-de-corda com atividade antifúngica. (Tese de Doutorado em Bioquímica). **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2011.
- CHEN, S.C., LIU, A.R., WANG, F.H., AHAMMED, G.J. Combined overexpression of chitinase and defensin genes in transgenic tomato enhances resistance to *Botrytis cinerea*. **Afr. J. Biotechnol.**, 2009.
- CLETUS, J.; BALASUBRAMANIAN, V.; VASHISHT, D.; SAKTHIVEL, N. Transgenic expression of plant chitinases to enhance disease resistance. **Biotechnol Lett V.** 35, p. 1719–1732, 2013.

COLINGE, D. B.; KRAGH, K. M.; MIKKELSEN, J. D.; NIELSEN, K. K.; RASMUSSEN, U. Plant chitinases. **Plant Journal**, v. 3, p. 31-40, 1993.

CUTT J.R, KLESSIG D.F. Pathogenesis-related proteins. In: Boller T, Meins F Jr (eds) *Genes Involved in Plant Defense*. **Springer-Verlag**, p. 209, 1992.

DAHIYA, N.; TEWARI R.; HOONDAL, G. S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Appl Microbiol Biotechnol** V. 71, p. 773–782, 2006.

DE JONG, A.J. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. **Plant Cell** 4, 425–433, 1992.

DE LA RIVA, G. A., GONZÁLES-CABRERA, J., VÁSQUEZ-PADRÓN, R. AYRA-PARDO, C. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. **Elect J Biotechnol** V, 1, p. 1-16, 1998.

DE LUCCA, A.J., CLEVELAND, T.E., WEDGE, D.E Plant-derived antifungal proteins and peptides, **Can. J. Microbiol.** 51 (12) 1001–1014, 2005.

DE LUCCA, A. J. Hongos patógenos comunes en la Agricultura y la Medicina. **Revista Iberoamericana de Micología**, 24(1), 2007. 3–13.

DING, X., GOPALAKRISHNAN, B., JOHNSON, L.B., WHITE, F.F., WANG, X., MORGAN, T.D., KRAMER, K.J., MUTHUKRISHNAN, S. Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. **Transgenic Research**, v. 7, p. 77-84, 1998.

DOES, M. P., CORNELISSEN, B. J. C.. Emerging strategies to control fungal diseases using transgenic plants. *Int. Crop Science Cong.* (V.L. Chopra, R.B. Singh and A. Varma, eds.), **Proc. Oxford IBH Pub. New Delhi**, pp. 233-244, 1998.

DONG, S., TREDWAY, L. P., SHEW, H. D., WANG, G.-L., SIVAMANI, E., & QU, R. Resistance of transgenic tall fescue to two major fungal diseases. **Plant Science**, 173(5), .2007 501–509, 2007.

GAO, A., HAKIMI, S.M., MITTANCK, C.A., WU, Y., WOERNER, M.B., STARK, D.M., SHAH, D.M., LIANG, J., ROMMENS, C.M.T. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. **Nat. Biotechnol.** 18, 1307e1310, 2000.

GOMES V.M., OLIVEIRA A.E.A., XAVIER-FILHO J., A chitinase and a α -1,3-glucanase isolated from the seeds of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp)

inhibit the growth of fungi and insect pests of the seed, **J. Sci. Food Agric.** 72 86–90, 1996.

GUO, P., WANG, Y., ZHOU, X., XIE, Y., WU, H., & GAO, X. (2013). Expression of soybean lectin in transgenic tobacco results in enhanced resistance to pathogens and pests. **Plant science: an international journal of experimental plant biology**, 2013.

HELGESON, J.P. Tissue and cell suspension culture. Em: BURK *et al.* (contribuidores) *Nicotiana* procedures for experimental use. **USDA**, USA, p. 52-59, 1979.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. **Calif. Agr. Exp. STA.** Cir, p. 347., 1950.

HORSCH, R. B.; FRY, J. E.; HOFFMANN, N. L.; EICHHOLTZ, D.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**. V. 227, p. 1229-1231, 1985.

JEREISSATI, E.S Transformação genética de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e tabaco (*Nicotiana tabacum*) com uma quitinase de classe I. (Tese de Doutorado em Bioquímica). **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular**, UFC, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2012.

JACH G, LOGEMANN S, WOLF G, OPPENHEIM A, CHET I, SCHELL J, LOGEMANN J: Expression of a bacterial chitinase leads to improved resistance of transgenic tobacco plants against fungal infection. **Biopractice** 1992, 1:33-40.

JACH, G. GORNHARDT, B. MUNDY, J. LOGEMANN, J. PINSDORF, E. LEAH, R. SCHELL, J. Mass, Enhanced quantitative resistance against fungal diseases by combinational expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco, **Plant Journal**. 8 97–109, 1995.

JI, C., KÚC, J. Antifungal activity of cucumber beta-1,3-glucanase and chitinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 257-265, 1996.

KAUFFMANN S, LEGRAND M, GEOFFROY P, FRITIG B (1987) Biological function of <pathogenesis-related> proteins: four proteins of tobacco have β -1,3-glucanase activity. **EMBO Journal** 6: 3209–3212.

KAUR, J., SAGARAM, U. S., & SHAH, D. Can plant defensins be used to engineer durable commercially useful fungal resistance in crop plants? **Fungal Biology Reviews**, 25(3), 2011, 128–135, 2011.

KERN, M. F. Expressão de uma quitinase de *Metarhizium anisopliae* em *Nicotiana tabacum*: Obtenção de plantas transgênicas resistentes à doenças fúngicas. 2003. Dissertação (Mestrado em genética e Biologia Molecular) – **Instituto de Biociência**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

KUMAR, S.; FLADUNG, M. Controlling transgene integration in plants. **Trends Plant Science** V. 6, p. 155-159, 2001.

LI, L.; YI, H. Differential expression of Arabidopsis defense-related genes in response to sulfur dioxide. **Chemosphere** V. 87, p. 718–24, 2012.

LINTHORST HJM Pathogenesis-related proteins of plants. **Crit Rev Plant Sci** 10: 123–150, 1991.

MALTSEVA, E., ISMAGUL, A., ISKAKOVA, G., CHIRKIN, A., SKIBA, Y., ISMAGULOVA, G., ELIBY, S. (2014). Wheat cisgenic transformation with class I chitinase gene. **Journal of Biotechnology**, 185(2014), S116–S117.

MANSOORI, B., KORD, M. Yellow death: a disease of date palm in Iran caused by *Fusarium solani*. **Journal Phytopathol.** 154, 125–127, 2006.

MAUCH, F., STAEHELIN, L.A.. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. **Plant Cell** 1, 447–457, 1989.

MELO, V. M. M., MEDEIROS D. A., RIOS, F. J. B., CASTELAR, L. I. M., CARVALHO F. F. U. Antifungal properties (agglutinins) from the red alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. **Botanica Marina**, v. 40, p. 281-284, 1997.

MURASHIGE T., SKOOG F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiol** 15: 473-479, 1962.

NAKAJIMA N. , MURANAKA T. , LSHIGE F. , AKUTSU K. , OEDA K. : Fungal and bacterial disease resistance in transgenic plants expressing human lysozyme. **Plant Cell Rep** v 16: 674-679, 1997.

NTUI, V.O., AZADI, P., THIRUKKUMARAN, R.S., CHIN, D.P., NAKAMURA, I., MII, M. Increased resistance to *Fusarium* wilt in transgenic tobacco co-expressing chitinase and wasabi defensin genes. **Plant Pathol.** 60, 221 - 231, 2011.

NEUHAUS, J.M., FRITIG, B., LINTHORST, H.J.M., MEINS, F., MIKKELSEN, J.D., RYALS, J. A revised nomenclature for chitinase genes. **Plant. Mol. Biol. Report** 14, 102–104, 1996.

NEUHAUS, J.M., STICHER, L., MEINS, F., BOLLER, T.. A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 88, 10362–10366, 1991.

PATIL R.S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, V. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme Microb Technol** V. 26, p. 473-483, 2000.

PITT, J.I., HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**, Second ed. Blackie Academic and Professional, 1997..

PORTIELES, R., AYRA, C., GONZALEZ, E., GALLO, A., RODRIGUEZ, R., CHACON, O., LOPEZ, Y., RODRIGUEZ, M., CASTILLO, J., PUJOL, M., ENRIQUEZ, G., BORROTO, C., TRUJILLO, L., THOMMA, B.P., BORRAS-HIDALGO, O. Nmdef02, a novel antimicrobial gene isolated from *Nicotiana megalosiphon* confers high-level pathogen resistance under greenhouse and field conditions. **Plant Biotechnol. J.** 8, 678e690, 2010..

PUNJA ZK, RAHARJO S.H.T. : Response of transgenic cucumber and carrot plants expressing different chitinase enzymes to inoculation with fungal pathogens. **Plant Dis** v 80: p 999- 1005, 1996.

RAJULU, M. B. G.; THIRUNAVUKKARASU, N.; SURYANARAYANAN, T. S; RAVISHANKAR J. P.; GUEDDARI, N. E.; MOERSCHBACHER, B. M. Chitinolytic enzymes from endophytic fungi. **Fungal Diversity** V. 47, p. 43–53, 2010.

REISSING, J. L.; SROMENGER, J. L.; LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. **Biol. Chem.**, v. 217, p. 959-966, 1955.

RYAN, C.A., FARMER, E.E. Oligosaccharide signals in plant: a current assessment, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **Plant Mol. Biol.** 42 (1991) 651–674.

SAHAI, A.S., MANOCHA, M.S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host parasite interaction. **FEMS Microbiol Rev** 11:317–338, 1993.

SALMERON, J. M., & VERNOOIJ, B. Transgenic approaches to microbial disease resistance in crop plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v 1:347-352, 1998.

SHABANI, F., KUMAR, L., & ESMAEILI, A. Future distributions of *Fusarium oxysporum* f. spp. in European, Middle Eastern and North African agricultural regions under climate change. ***Agriculture, Ecosystems & Environment***, 197, 96–105, 2014.

SAMSON, R.A., HOEKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O., 2004. Introduction to Food and Airborne Fungi, Seventh Edition. **Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)**, Utrecht, Netherlands, 2010..

STANGARLIN, J. R. Et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. ***Scientia Agraria Paranaensis***, v. 10, n.1, 2011, p. 18-46.

SELA-BUURLAGE M.B. , PONSTEIN A.S. , BRES-VLOEMANS S.A. , MELCHERS L.S., VAN DEN ELZEN P.J.M. , COMELISSEN B.J.C. : Only specific tobacco (*Nicotiane tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. ***Plant Physiol*** 1993, 101:857-863.

SIVAN, A.; CHET, I. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of . ***Journal Gen. Microbiol.*** V. 135(3), p. 675-682, 1989.

SHINSHI, H.; NEUHAUS, J. M.; RYALS, J.; MEINS, F. Structure of a tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequence encoding a cysteine-rich domain. ***Planta Molecular Biology***, v. 14, p. 357-368, 1990

SURYANTO, D.; INDARWAN, A.; MUNIR, E. Examination of chitinolytic bacteria in alginate chitosan encapsulation on chili seed against damping off caused by *Fusarium oxysporum*. ***American Journal of Agricultural and Biological Sciences***, V. 7 (4), p. 461-467, 2012.

TAKAKURA, Y., ITO, T., SAITO, H., INOUE, T., KOMARI, T., KUWATA, S. Flower- predominant expression of a gene encoding a novel class I chitinase in rice (*Oryza sativa* L.). ***Plant Mol. Biol.*** 42, 883–897, 2000.

THEIS, T., STAHL, U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. ***Cellular and Molecular Life Sciences***, v. 61, p. 437-455, 2004.

SHAKHBAZAU, A.V. E KARTEL, N.A. Chitinases in Bioengineering Research. ***Russian Journal of Genetics***, v. 44, p. 881-889, 2008.

VAN LOON, L.C., REP, M., PIETERSE, C.M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. ***Annu.Rev. Phytopathol.*** 44, 135 -162, 2006.

VERLAG, F., MOHAMMADI, M., & KARR, A. L. -1 , 3-Glucanase and chitinase activities in soybean root nodules, **J. Plant Physiol.** 159. 245–256, 2002.

VIEIRA, F. A., CARVALHO, A. O., VITÓRIA, Â. P., RETAMAL, C. A., & GOMES, V. M. Differential expression of defence-related proteins in *Vigna unguiculata* (L. Walp.) seedlings after infection with *Fusarium oxysporum*. **Crop Protection**, 29(5), 440–447, 2010.

WANG, S., WU, J., RAO, P., NG, T. B., & YE, X. A. Chitinase with antifungal activity from the mung bean. *Protein expression and purification*, 40(2), 230–6, 2005.

WANG, Y., NOWAK, G., CULLEY, D., HADWIGER, L.A., FRISTENSKY, B. Constitutive expression of Pea Defense Gene DRR206 Confers Resistance to Blackleg (*Leptosphaeria maculans*) Disease in Transgenic Canola (*Brassica napus*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, p. 410-418, 1999.

WARD, O. P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. **Biotechnology Advances** 30, 1119–1139, 2012.

XAVIER-FILHO J., SALES M.P., FERNANDES K.V.S., GOMESV.M., The resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) is due to the association of variant vicilins (7S storage proteins) to chitinous structures in insect's midgut. **Arq. Biol. Tecnol.** 7 693–699, 1996.

ZHANG, J.; KOPPARAPU N. K.; YAN Q.; YANG, S.; JIANG Z. Purification and characterisation of a novel chitinase from persimmon (*Diospyros kaki*) with antifungal activity. **Food Chemistry** V. 138, p. 1225–1232, 2012.