



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CAROLINA BARBOSA MALAFAIA

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA E SECREÇÃO DE QUITINASES EM DIFERENTES
CULTIVARES DE TOMATEIRO À MURCHA DE FUSÁRIO

Recife, 2012

CAROLINA BARBOSA MALAFAIA

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA E SECREÇÃO DE QUITINASES EM DIFERENTES
CULTIVARES DE TOMATEIRO À MURCHA DE FUSÁRIO

Dissertação de Mestrado apresentada à
Coordenação do Programa de Pós-
graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco, como
parte dos requisitos à obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas, área de
concentração em Biotecnologia.

Profª Drª Maria Tereza dos Santos Correia
Orientadora

Profª Drª Márcia Vanusa da Silva
Co-orientadora

Recife, 2012

Malafaia, Carolina Barbosa

Avaliação da resistência e secreção de quitinases em diferentes cultivares de tomateiro à murcha de fusário/ Carolina Barbosa Malafaia– Recife: O Autor, 2012.

50 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadora: Márcia Vanusa da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biotecnologia, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

1. Murcha de fusarium do tomate 2. Patologia vegetal 3. Enzimas I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientadora) II. Silva, Márcia Vanusa (coorientadora) III. Título

635.64293

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2012- 197

CAROLINA BARBOSA MALAFAIA

**AVALIAÇÃO DA RESISTENCIA E SECREÇÃO DE QUITINASES EM DIFERENTES
CULTIVARES DE TOMATEIRO À MURCHA DE FUSARIO**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Coordenação do Programa de Pós-graduação
em Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, como parte dos
requisitos à obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biológicas, área de concentração em
Biotecnologia.

Data da Aprovação ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA
Departamento de Bioquímica - UFPE

Profa. Dra. PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA
Departamento de Bioquímica - UFPE

Dra. MARIA LUIZA RIBEIRO BASTOS DA SILVA
Laboratório de genoma – IPA

Recife, 2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter abençoado minha vida com saúde e amor de tantas pessoas queridas.

Meus agradecimentos a CAPES pelo apoio financeiro e as professoras doutoras Tereza Correia e Márcia Vanusa, pela orientação e atenção dada ao longo desse trabalho.

Aos meus pais Maria das Graças e Jason Malafaia, pelos primeiros ensinamentos, por ter construído a base do meu caráter com seu amor e por tudo que fizeram por mim. A meus irmãos, primos e tios, pelo apoio durante todos os passos na minha vida.

A Clébia Almeida pela atenção, disponibilidade e auxílio durante o desenvolvimento deste estudo.

Agradeço especialmente a Túlio Diego, pela pessoa maravilhosa que é, pelo carinho, atenção e principalmente pelo amor. Por estar comigo em todos os momentos, por suas contribuições em meus trabalhos apoiando e confiando.

A todos os companheiros do laboratório de Genoma do IPA pela ajuda e atenção.

Enfim, por todos vocês que participaram da minha vida e que contribuíram de alguma forma para minha formação acadêmica, meu muito obrigada!

RESUMO

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é uma hortaliça de grande importância econômica no Brasil que apresenta diversos problemas fitossanitários que reduzem a sua produtividade, destacando-se, dentre eles, a murcha de fusário causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). As quitinases são descritas em muitas plantas como participantes na defesa contra patógenos e o seu acúmulo em tecidos vegetais inoculados poderá servir como marcador bioquímico para seleção de progênie resistente no programa de melhoramento do tomateiro. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resistência de genótipos de tomate em relação ao isolado da raça fisiológica 2 de Fol, bem como acompanhar a influência durante a interação planta-patógeno sobre a atividade de proteínas relacionadas à patogênese (RP) das classes das quitinases. Mudanças com 30 dias de idade dos genótipos Ourovivo, Viradouro, Redenção, Belmonte, BHRS e IPA-06 foram inoculadas pelo método *dipping* que consiste no corte de raízes e imersão na suspensão de conídios do patógeno. A avaliação foi realizada 21 dias após inoculação (dai) e os genótipos agrupados em resistentes ou sensíveis. Apenas o genótipo BHRS se comportou como resistente ao isolado da raça 2 de Fol. Para o acompanhamento da secreção de quitinases durante o processo de interação tomateiro x Fol dois genótipos, BHRS (resistente) e IPA-6 (sensível), foram avaliados quanto a secreção desta enzima extraídas dos tecido foliar e radicular com 1, 2, 4, 6, 9 e 11 dai. Observou-se maior atividade da enzima em plantas desafiadas do genótipo BHRS, principalmente no tecido radicular aos 6 dai. O genótipo BHRS poderá servir como fonte de genes de resistência à raça 2 de Fol.

Palavras chave: *Solanum lycopersicum*; *Fusarium oxysporum*; interação planta-patógeno; atividade quitinolítica.

ABSTRACT

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is a plant of great economic importance in Brazil with several phytosanitary problems that reduce its productivity, especially the fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). Chitinases are described in many plants as participants in the defense against pathogens and their accumulation in inoculated plant tissues may serve as a biochemical marker for selection of resistant progeny in the tomato breeding program. This study aimed at evaluating the resistance of tomato genotypes in relation to the isolate from the physiological race 2 of Fol, and monitoring the influence during plant-pathogen interaction on the activity of pathogenesis-related proteins (PR) of chitinases classes. Seedlings of 30 days age of genotypes Ourovivo, Viradouro, Redemption, Belmonte, BHRS and IPA-06 were inoculated by the dipping method that consists in cutting roots and immersion in the conidial suspension. The evaluation was performed 21 days after inoculation (dai) and genotypes were grouped into resistant or susceptible. Only the genotype BHRS behaved as resistant to the isolate from race 2 of Fol. To evaluate the chitinase secretion in the process of tomato x Fol interaction, two genotypes, BHRS (resistant) and IPA-6 (sensitive), were evaluated for secretion of this enzyme extracted from leaf and root tissues at 1, 2, 4, 6, 9 and 11 dai. We observed higher enzyme activity in challenged plants of BHRS genotype, mainly in root tissue at 6 dai. The BHRS genotype may serve as a source of resistance genes to race 2 of Fol.

Keywords: *Solanum lycopersicum*; *Fusarium oxysporum*; plant-pathogen interaction; chitinolytic activity.

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1: Esquema generalista de sintomas apresentados pelo tomateiro frente a doenças. Em (A) planta saudável, metabolismo básico funcionando normalmente; em (B) observa-se os principais sintomas presentes em muitas doenças vegetais. Fonte: adaptado de AGRIOS, 2005.	12
Figura 2: Esquema do ciclo da murcha de fusário do tomateiro causada pelo <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> . Fonte: adaptado de AGRIOS, 2005.	16
Figura 3: Tomateiro apresentando a murcha de fusário. Em (A) corte longitudinal do caule evidenciando o sistema vascular escurecido (seta) devido à colonização pelo <i>F. oxysporum</i> ; Em (B) planta doente em estágio avançado de murcha. Fonte: AGRIOS, 2005.	17
Figura 4: Esquema geral do processo de interação planta-patógeno. Mostrando a germinação do esporo fúngico, com reconhecimento por receptores de membrana, desencadeando a resposta de defesa celular. Fonte: Própria.	20
Figura 5: (a) estrutura química da quitina. A caixa cinza indica uma N-acetilglicosamina subunidade da cadeia de quitina. (b) os dois principais tipos de quitina são caracterizados por um arranjo antiparalelo (α -quitina) ou paralelo (β -quitina) da cadeia de quitina. Fonte: SEIDL, 2008.	22
Figura 6 Esquema da clivagem por enzimas quitinolíticas. As subunidades da cadeia de quitina são mostradas em azul claro. Abaixo possíveis produtos formados pela ação da clivagem de quitinases. Fonte: Adaptado de SEIDL, 2008.	23

CAPÍTULO I

Figura 1: Evaluation of tomato's resistance sources to <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> in the different cultivars 21 days after inoculation. In (A) symptoms of fusarium wilt in the shoot and (B) symptoms of discoloration of vascular tissues (xylem tracheids and xylem) in the infected plants	47
Figura 2: Analysis of chitinolytic activity of roots and leaves proteins over time for BHRS (resistant) and IPA-6 (sensitive) genotypes of challenged ($\longrightarrow$) and unchallenged ($\dashrightarrow$) tomatoes by <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> . In A and B are shown the activity of leaves and roots of the BHRS genotype respectively; and the activity in leaves and roots from IPA-06 genotype in C and D respectively. Lowercase letters indicate statistically significant relationships between samples of each tissue ($p < 0.05$).	47
Figura 3: Temporal profile of chitinases isoenzymes secretion in roots of BHRS (A) and IPA-6 (B) tomato, non- inoculated (control) and after inoculation (1, 2, 4, 6, 9, 11 dai) with the race 2 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> in SDS-PAGE with gel containing 1% glycol-chitin. Samples containing 15 μ g proteins/well.	48

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1: Relação das doenças e pragas que causam prejuízos à cultura do tomateiro.	13
Tabela 2: Famílias de proteínas relacionadas à patogênese.	21

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCSEM	Associação Brasileira do Comercio de sementes e mudas
APG	Grupo Filogenético das Angiospermas / Angiosperm Phylogene Group
Avr	Gene de avirulência
BDA	Batata Destrose Agar
BSA	Albumina sérica bovina
dai	dias após a inoculação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária
f. sp.	<i>Formae specialis</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
Fol	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
IBGE–SIDRA	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema de recuperação automática
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco
IUB – MB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular / International Union of Biochemistry and Molecular Biology
NacGlc	N-acetilglicosamina
PIB	Produto Interno Bruto
R	Gene de resistência
RH	Resposta de hipersensibilidade
RP	Relacionadas a patogênese
SDS – PAGE	Eletroforese em gel de poliácridamida – dodecil sulfato de sódio / Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SlChit	<i>Solanum lycopersicum</i> Chitinases

SUMÁRIO

Pág.

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1 Tomaticultura	10
1.2 Murcha de fusário do tomateiro	14
1.3 Interação planta – patógeno	18
1.4 Quitinases: proteínas relacionadas à patogênese	21
2. OBJETIVOS	25
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

CAPÍTULO I

MANUSCRITO	33
ABSTRACT	35
1. INTRODUCTION	36
2. MATERIAL AND METHODS	37
2.1 Plant material	37
2.2 Isolated from race 2 of <i>FoI</i> and inoculation preparation	37
2.3 Genotypes selection	37
2.4 Extraction and quantification of total proteins	37
2.5 Chitinolytic activity	38
2.6 Gel with chitinolytic activity SDS – PAGE	39
3. RESULTS	39
4. DISCUSSION	40
5. CONCLUSION	41
6. ACKNOWLEDGEMENTS	42
7. REFERÊNCIAS	43

ANEXOS

ATIVIDADE CIENTÍFICA COMPLEMENTAR	50
-----------------------------------	----

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Tomaticultura

O tomateiro é originário da Cordilheira dos Andes, das regiões de altitude (800 a 1.000 metros) do norte do Chile até o Equador. Essa hortaliça foi disseminada pelos indígenas antes da era pré-colombiana. Em sua região de origem, os Incas cederam a planta aos Maias, habitantes da América Central até o México que, possivelmente, foram disseminadores da hortaliça até o povo Asteca. Os espanhóis o denominaram tomate, e o introduziram na Europa entre 1523 e 1554 como planta ornamental. Porém seu uso na culinária foi retardado por ser uma hortaliça pertencente à família Solanaceae que possui representantes considerados tóxicos como a Zabumba (*Datura stramonium* L.) e a trombeta (*D. suaveolens* L.) (FILGUEIRA, 2003; CAMARGO et al., 2006). No Brasil o tomateiro foi introduzido por imigrantes europeus no final do século XIX e o consumo de seu fruto *in natura* ou de derivados é muito apreciado no país (ALVARENGA, 2004).

Segundo a *Angiosperm Phylogene Group* – APG II (2003), o tomateiro é classificado taxonomicamente como pertencente ao clado Euasterídeas I, ordem Solanales e família Solanaceae. A classificação do tomateiro dentro da família Solanaceae foi polêmica desde o século XVIII. Linnaeus, em 1753 incluiu o tomateiro no gênero *Solanum*, sendo denominado de *Solanum lycopersicum*, enquanto Miller, um contemporâneo de Linnaeus, em 1754, incluiu tomate no novo gênero *Lycopersicum*, sendo renomeado para *Lycopersicum esculentum*. Posteriormente, a maioria dos botânicos seguiu a classificação de Miller que é baseada na morfologia ou em estudos de cruzamentos. Entretanto, recentes investigações moleculares utilizando DNA mitocondrial, têm demonstrado que tomates são muito mais relacionados filogeneticamente com outras Solanaceas como a batata apoiando assim sua inclusão no gênero *Solanum* proposto por Linnaeus (CAMARGO et al., 2006). Assim o nome atualmente usado e adotado neste trabalho é *Solanum lycopersicum*.

A tomaticultura é altamente exigente quanto à fertilidade do solo mais especificamente com relação ao teor de nutrientes. Adapta-se a diversos tipos textura de solo, mas os de textura média e pH em torno de 6,0 a 6,5 são os que obtêm os melhores resultados na produção. As flores do tomateiro são hermafroditas e agrupam-se em cachos, essas características contribuem para a alta taxa de autogamia na espécie. Os frutos são do tipo baga, com peso e tamanhos variados podem apresentar de 2 a 10 lóculos dependendo da cultivar, além disso são ricos nas vitaminas A, B e C, e sais

minerais como fósforo, ferro, potássio e magnésio e são fontes de licopeno, um antioxidante natural comprovadamente associado à proteção contra alguns tipos de câncer, como o de próstata. Suas sementes são pilosas, pequenas e envolvidas por mucilagem, quando dentro do fruto (DORAIS; GOSSELIN; PAPADOULOS, 2001; LOPES, 2005; CARVALHO; PAGLIUCA, 2007; FILGUEIRA, 2008).

Em consequência de sua região de origem, o tomateiro, como toda Solanacea, é sensível à variação extrema de temperatura, sendo suas temperaturas ótimas entre 21 e 28°C durante o dia e 15 e 20°C à noite. O excesso de calor provoca abortamento ou inibição da floração e baixas temperaturas retardam a germinação, a emergência da plântula e o crescimento vegetativo, e em temperaturas próximas a zero grau centígrado, ocorre à morte das folhas (CAMARGO et al., 2006; FILGUEIRA, 2008). Entretanto, a planta pode desenvolver-se em climas do tipo tropical de altitude, subtropical e temperado, permitindo seu cultivo em diversas regiões do mundo (EMBRAPA, 2009). A planta ao natural ocorre na forma de moita, porém, devido a as necessidades do processo de colheita o tomate para consumo *in natura* é cultivado estaqueado (ou envarado), enquanto o tomate para consumo industrial é rasteiro. Em consequência dessa especificidade, as cultivares de tomate são melhoradas visando o local, a forma de cultivo e sua finalidade para o consumo (CAMARGO et al., 2006).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO, na safra de 2009 a produção mundial de tomate chegou a aproximadamente 153 milhões de toneladas numa área plantada de cerca de 4,6 milhões de hectares, dando a cultura a 11^a posição no ranking dos alimentos produzidos no mundo. O Brasil ocupa a posição de nono lugar na lista dos maiores produtores dessa hortaliça (FAO, 2011), com uma área plantada de 700 mil hectares que geram cerca de três milhões de empregos diretos (ABCSEM, 2010), produzindo mais de 4,1 milhões toneladas do fruto na safra de 2009 (IBGE–SIDRA, 2011) destes 65% são cultivados para o consumo *in natura* e 35% destinados as indústrias de processamento. A cadeia produtiva de tomate possui importante relevância econômica no agronegócio brasileiro, por movimentar uma cifra anual superior a R\$ 2 bilhões, cerca de 16% do PIB – Produto Interno Bruto – gerado pela produção de hortaliças no Brasil (ABCSEM, 2010).

A região nordeste do Brasil representou cerca de 15% da produção nacional de tomate em 2009. Os estados com maior produção de tomate são Goiás (33,1%), São Paulo (16,9%), Minas Gerais (11,1%), Bahia (7,3%), Paraná (7,0%), Rio de Janeiro (5,0%), Santa Catarina (4,2%) e Pernambuco (3,6%). Este último, com safra de 165 mil

toneladas, numa área de 4.020 hectares no ano de 2009. Em Pernambuco, a maior parte do tomate é plantado nas regiões agreste e sertão, destacando-se os municípios de Brejo Pernambucano, Sertão do Moxotó, São Francisco Pernambucano, Camocim de São Félix e Petrolina. Esta atividade é de importância econômica e social para o estado, pois geraram uma receita de aproximadamente R\$100 milhões no ano de 2009 (IBGE – SIDRA, 2011), além de absorver um grande contingente de mão de obra na região.

A cultura do tomateiro é acometida por muitas doenças e pragas que causam grande redução na produtividade e na qualidade do produto. Os principais sintomas encontrados na maioria das doenças que acometem o tomateiro como podridão das raízes, formação de galhas, amarelecimento ou manchas nas folhas, murcha, cancro e podridão dos frutos causam grandes perdas na produção, além de desviarem o metabolismo para a defesa prejudicando o crescimento e desenvolvimento do vegetal como um todo ou dos frutos durante o período de frutificação (Figura 1). O conhecimento da etiologia, da sintomatologia e dos métodos gerais de controle permite a identificação precoce e o tratamento preventivo das doenças. As mais frequentes são causadas por bactérias, fungos, vírus, nematóides e as pragas que atacam a cultura são causadas por várias espécies de insetos (EMBRAPA, 2009) (Tabela 1).

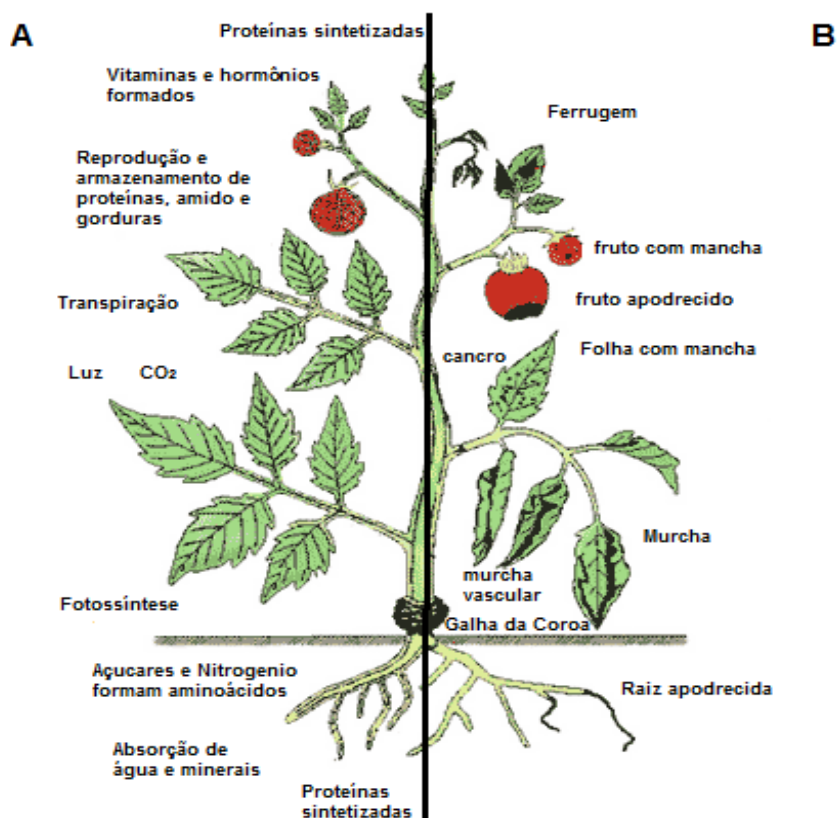


Figura 1: Esquema generalista de sintomas apresentados pelo tomateiro frente a doenças. Em (A) planta saudável, metabolismo básico funcionando normalmente; em (B) observa-se os principais sintomas presentes em muitas doenças vegetais.

Fonte: adaptado de AGRIOS, 2005.

Dentre as doenças que acometem a cultura, a murcha de fusário também chamada fusariose apresenta significativa importância, sendo uma doença vascular causada pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) que pode trazer graves prejuízos econômicos com perdas de até 100% da produção quando atacam cultivares sensíveis (MARTINS, 2005, REIS et al., 2009). Os métodos utilizados para o controle dessa doença não são muito eficientes ou são de difícil aplicação. Sendo assim, a maneira mais eficiente de controlar a murcha de fusário do tomateiro é a seleção de cultivares resistentes (SILVA; BETTIOL, 2005).

Tabela 1: Relação das doenças e pragas que causam prejuízos à cultura do tomateiro.

Agentes	Doenças / Pragas
Bactérias	Cancro bacteriano - <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
	Mancha bacteriana - <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
	Pinta bacteriana - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
	Murcha bacteriana - <i>Ralstonia solanacearum</i>
	Talo oco e podridão mole dos frutos - <i>Erwinia</i> spp.
Fungos	Mancha de estenfilio - <i>Stemphyllium</i> spp.
	Mela de rizoctonia - <i>Rhizoctonia solani</i>
	Murcha de fusário - <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
	Murcha de verticílio - <i>Verticillium dahliae</i>
	Pinta preta - <i>Alternaria solani</i>
	Podridão de esclerócio - <i>Sclerotium rolfsii</i>
	Podridão de esclerotínia - <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
	Requeima - <i>Phytophthora infestans</i>
	Septoriose - <i>Septoria lycopersici</i>
Vírus	Virose do complexo do vira cabeça do tomateiro
	Mosaico do fumo e mosaico do tomateiro
	Risca do tomateiro e mosaico (Potyvirus)
	Topo amarelo e Amarelo baixeiro
	Geminivirose
Nematóide	Galhas - espécies do gênero <i>Meloidogyne</i>
Insetos	Traça do tomateiro - <i>Tuta absoluta</i>
	Mosca branca - <i>Bemisia argentifolii</i>
	Ácaro do bronzeamento - <i>Aculops lycopersici</i>
	Larva minadora - <i>Liriomyza huidobrensis</i> , <i>L. trifolii</i> , <i>L. sativae</i>
	Trips - <i>Frankliniella</i> spp. e <i>Thrips</i> spp.
	Pulgões - <i>Myzus persicae</i> e <i>Macrosiphum euphorbiae</i>
	Lagarta rosca - <i>Agrotis</i> spp
	Broca grande - <i>Helicoverpa zea</i>
	Lagarta militar - <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>S. littoralis</i>
	Broca pequena - <i>Neoleucinodes elegantalis</i>
	Burrinho - <i>Epicauta suturalis</i> e <i>E. attomaria</i>

Fonte: Embrapa Hortaliças – Cultivo de Tomate para Industrialização – Doenças, 2011.

1.2 Murcha de fusário do tomateiro

Os fungos têm grande importância ecológica, sendo algumas espécies responsáveis pela degradação da matéria orgânica morta, propiciando a ciclagem dos nutrientes, contribuindo assim, de modo fundamental, no ciclo da matéria nos ecossistemas. Além disso, muitos fungos são economicamente importantes por serem empregados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, com a produção de antibióticos como a penicilina, e de fermentação, como por exemplo, na produção de álcool, no controle biológico de pragas, entre outras. Apesar desses aspectos positivos, os fungos também provocam grandes prejuízos econômicos por possuírem também espécies parasitas de animais e plantas (DESJARDINS et al., 2000; GODOY; COLOMBO, 2004).

O gênero *Fusarium* pertence ao reino Fungi, divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Hyphomycetes. Sendo esse gênero caracterizado pelo seu crescimento rápido, colônias com coloração pálida ou colorida (violeta à púrpura escuro ou do creme à laranja), com micélio aéreo e difuso. Inclui espécies que produzem macroconídios hialinos, geralmente septados, possuindo as células basal e apical diferenciadas. Esta última característica é de grande importância para sua taxonomia devido a sua fase teleomórfica ser desconhecida (LESLIE; SUMMERELL, 2006; ANDRIÓN, 2009).

As espécies de *Fusarium* têm ampla distribuição geográfica, sendo algumas espécies cosmopolitas e outras restritas a determinadas regiões. Ocorrem predominantes nas regiões tropicais e subtropicais, mas também em condições de clima frio das regiões temperadas (ALEXOPOULOS; BLACKWELL, 1996). São encontradas em todos os tipos de solo ou associadas a inúmeras espécies vegetais. Estes fungos podem sobreviver por longos períodos de forma saprofítica sobre a matéria orgânica do solo e quando possível podem causar inúmeras doenças em diferentes espécies vegetais, sobretudo em culturas de importância econômica, causando grandes prejuízos (REIS et al., 2005). Este grupo de fungos é ainda responsável por inúmeras toxinas e micoses em animais e humanos, como por exemplo, a moniliformina uma potente cardiotoxina produzida por várias espécies de *Fusarium* como *F. oxysporum*, *F. guttiforme* e *F. graminearum* (DESJARDINS et al., 2000; FREIRE et al., 2007).

A identificação e classificação tradicional de espécies no gênero *Fusarium*, baseada apenas nas características morfológicas não é confiável devido a plasticidade das características fenotípicas e patogênicas do gênero que resultaram em uma classificação complexa dividida em seções, *formae speciales* (f. sp.) e raças (OLIVEIRA;

COSTA, 2002). O conceito de f. sp. foi aplicado por Snyder e Hansen (1954) para reconhecer isolados patogênicos que foram morfologicamente semelhantes a isolados saprofiticos de mesma espécie, mas que se diferenciam em sua habilidade para parasitar hospedeiros específicos. Isolados patogênicos de *F. oxysporum* estão classificados dentro de mais de 120 f. sp. e raças.

O agente causador da murcha de fusário do tomateiro recebeu inicialmente a denominação de *F. oxysporum* Achl. subsp. *lycopersici* Sacc., em 1886. Depois o denominaram *F. lycopersici* Sacc. em 1935. O patógeno foi novamente classificado, recebendo a seguinte denominação: *F. bulbigenum* (Cke. & Mass.) *lycopersici* (Brushi) Wr. & Reinking. Finalmente, o nome do patógeno foi reclassificado e fixado como sendo *F. oxysporum* Schelecht f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder e Hansen, em 1940 (VALE et al., 2000).

A murcha de fusário do tomateiro foi constatada pela primeira vez em 1895 na Inglaterra e causou grandes perdas em varias regiões do mundo como as registradas em Israel e nos Estados Unidos, nos estados das regiões central e sul do país, tanto em campo como em casas de vegetação. No Brasil, a doença foi detectada pela primeira vez em 1939, na cidade de São Paulo. Hoje, ela ocorre em todas as regiões onde o tomate é cultivado (VALE et al., 2000), podendo se manifestar em quaisquer estádios de desenvolvimento da planta, embora mais comumente no início do florescimento e frutificação (VALE et al., 2004).

Quando plantas saudáveis crescem em solo contaminado os tubos germinativos dos esporos ou o micélio penetram na raiz diretamente, através de ferimentos ou em pontos de formação de raízes secundárias. O micélio avança através do córtex radicular intracelularmente e quando chega aos vasos do xilema penetra através dos orifícios. O micélio então permanece exclusivamente nos vasos e viaja através deles, principalmente no sentido ascendente da planta. Enquanto nos vasos, o micélio se ramifica e produz microconídeos que são destacados e conduzidos no sentido ascendente no fluxo da seiva. O microconídeo germina no ponto onde se fixa e o micélio penetra na parede superior do vaso e mais microconídeos são produzidos no vaso seguinte. O micélio também avança lateralmente penetrando neles através poros dos vasos. A combinação desses processos provoca o entupimento dos vasos por micélio, esporos, géis, gomas, há formação de calos e o esmagamento dos vasos por proliferação adjacentes células do parênquima. Esse entupimento leva a quebra do fluxo de água da planta infectada. Quando as folhas transpiram mais água do que as raízes e o caule podem transportar, os

estômatos se fecham e as folhas murcham e, finalmente, a planta morre. O fungo, em seguida, invade todos os tecidos da planta extensivamente, atingindo a superfície da planta morta e esporula (Figura 2) (AGRIOS, 2005).

Às vezes, quando a umidade do solo é alta e o temperatura relativamente baixa, as plantas infectadas ainda podem produzir bons rendimentos de colheita, no entanto, em tais casos, o fungo pode atingir o fruto das plantas e contaminar as sementes (AGRIOS, 2005; KUROZAWA; PAVAN, 2005) e muitas vezes a planta pode apresentar também crescimento retardado (LOPES; REIS; BOITEUX, 2005).

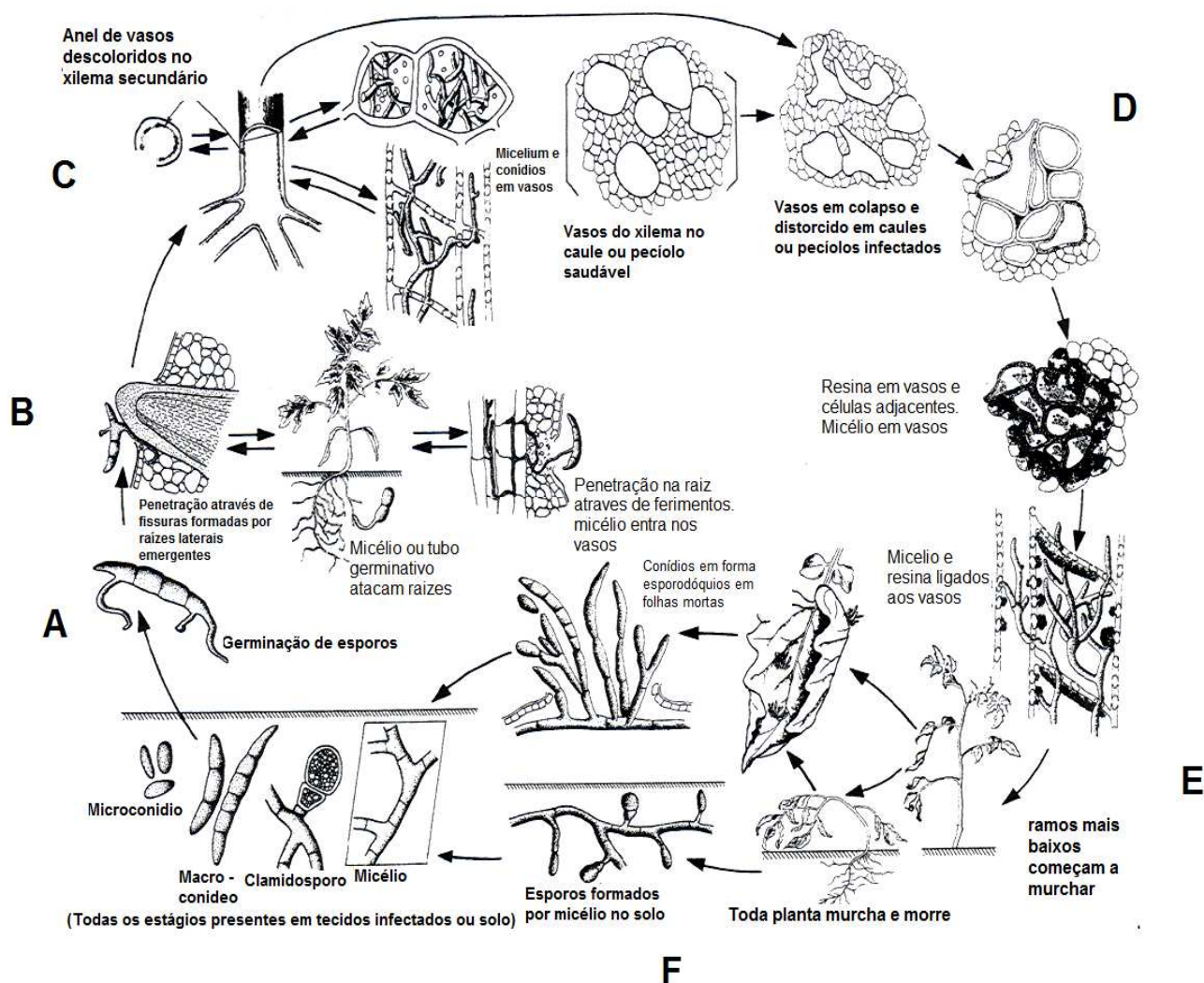


Figura 2: Esquema do ciclo da murcha de fusário do tomateiro causada pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Fonte: adaptado de AGRIOS, 2005.

Plantas de tomate com essa doença apresentam inicialmente um amarelecimento e murcha das folhas mais velhas, principalmente nas horas mais quentes do dia. A doença progride para as folhas mais novas e, muitas vezes, observa-se murcha ou

amarelecimento em apenas um lado da planta ou da folha. As folhas secam, mas não se desprendem do caule. Os frutos não se desenvolvem, amadurecem ainda pequenos e a produção é reduzida. Cortando-se o caule próximo às raízes verifica-se necrose do sistema vascular, ao cortar o caule longitudinalmente, constata-se uma coloração marrom típica acompanhando os vasos lenhosos (Figura 3) (KUROZAWA; PAVAN, 2005; AGRIOS, 2005).

Temperaturas altas (em torno de 28°C) e solos arenosos com pH baixo favorecem a instalação da doença, uma vez que são as condições ideais para o desenvolvimento do fungo no solo (KUROZAWA; PAVAN, 2005; EMBRAPA, 2009). Os clamidósporos podem ser disseminados na área de plantio, ou novas áreas através do movimento de solo provocado por vento, água ou implementos. A disseminação local também ocorre através da água de irrigação, mudas infectadas ou solo infestado da sementeira. Acredita-se que a disseminação de longa distância ocorra através de mudas infectadas, mas muito provavelmente via sementes, no interior ou na superfície das mesmas (AGRIOS, 2005; KUROZAWA; PAVAN, 2005).



Figura 3: Tomateiro apresentando a Murcha de fusário. Em (A) corte longitudinal do caule evidenciando o sistema vascular escurecido (seta) devido à colonização pelo *Fusarium oxysporum*; Em (B) planta doente em estágio avançado de murcha.
Fonte: AGRIOS, 2005.

Como em toda doença vascular de plantas a murcha de fusário do tomateiro não tem um controle químico eficiente, uma vez que o patógeno se desenvolve no xilema das plantas infectadas e sobrevive no solo por mais de dez anos na forma de clamidósporos

(VALE et al., 2000; COSTA; LOVATO; SETE, 2010). Medidas de controle como rotação de cultura, tratamento de sementes com benomyl, tiofanato metílico ou tiabendazole (substâncias fungitóxicas comumente usadas) e plantio em áreas indenidas são aplicadas, porém, a única medida seguramente eficaz de controle da doença é o emprego de cultivares resistentes (KUROSZAWA; PAVAN, 2005).

Já foram constatadas, pelo menos, três raças fisiológicas desse fungo que são determinadas de acordo com a habilidade dos isolados em infectar uma série de cultivares diferenciadoras que incluem os genótipos: Ponderosa (suscetível a todas as raças), IPA 5 (resistente à raça 1), Floradeide (resistente às raças 1 e 2) e BHRS-2,3 (resistente às três raças). No mundo existe a predominância da raça 1, mas, em muitas regiões, a raça 2 tem aumentado significativamente de importância e a raça 3 apresenta uma distribuição geográfica mais restrita, sendo primeiramente registrada no Brasil no estado do Espírito Santo (AGRIOS, 2005; REIS et al., 2005), esta foi encontrada afetando cultivos comerciais de tomate nos municípios de São José de Ubá e Itaocara, ambos no Estado do Rio de Janeiro, reforçando a hipótese da transmissão via semente deste patógeno (REIS; BOITEUX, 2007). A interação gene a gene foi proposta entre *F. oxysporum* e cultivares hospedeiras, sendo a resistência monogênica e dominante (VALE et al., 2000).

1.3 Interação planta – patógeno

Na natureza os vegetais estão sujeitos ao ataque de um grande número de inimigos potenciais, devido à grande variedade de vírus, bactérias, fungos, nematoides, insetos, mamíferos e outros herbívoros e patógenos presentes nos ecossistemas e não podem se defender destes simplesmente deslocando-se ou convocando anticorpos para a região do ataque de patógenos, como nos sistemas animais, por isso as plantas dispõem de outras formas de proteção (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A interação entre planta e patógenos pode ser dividida em dois tipos básicos: a interação compatível e a interação incompatível. Na interação compatível, o patógeno invade o tecido vegetal, multiplica-se e provoca a doença na planta. Na interação incompatível, o patógeno, ao penetrar no tecido vegetal, ativa as defesas da planta e estas ativadas impedem a multiplicação do patógeno levando à resistência (CORDEIRO; SÁ, 1999). Muitas vezes dentro da espécie, alguns indivíduos diferem quanto à resistência a patógenos microbianos. Tais diferenças frequentemente dizem respeito à

velocidade e a intensidade das reações da planta. Plantas resistentes respondem mais rapidamente e vigorosamente aos patógenos do que aquelas sensíveis (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As plantas além de apresentarem adaptações morfológicas, como a presença de espinhos, depósitos cuticulares, epiderme espessada, abundância de cristais, tricomas e fibras na folha, sintetizam um grupo de compostos conhecidos como metabolitos secundários que as defendem contra vários herbívoros e microrganismos patogênicos (LAM; NG, 2001). Ao longo da evolução as plantas desenvolveram mecanismos sofisticados de respostas a danos e doenças que podem ser induzidos a partir do reconhecimento das agressões, pois demandam um investimento de recursos menor por parte da planta, ou podem já estar presentes constitutivamente, porém, precisam ser ativadas para serem efetivas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As alterações que constituem a resposta de defesa das plantas, devido ao estresse causado por patógenos, têm sido intensamente estudadas com o objetivo de compreender a interação planta – patógeno, contribuindo assim para o melhoramento genético de plantas cultivadas de grande importância econômica (PRITSCH et al., 2000; FLUHR, 2001; DAVIS et al., 2002).

A ativação de respostas de defesa se inicia pelo reconhecimento do patógeno. Este pode ser mediado pela interação entre os genes de resistência da planta (R): que produzem receptores específicos; e genes de avirulência (Avr): que são expressos apenas na presença de proteínas elicitoras de alta especificidade presentes no hospedeiro. Há ainda a participação de elicitores não específicos no reconhecimento da infecção, como carboidratos, lipídeos e peptídeos presentes na parede celular ou secretados pelo patógeno. O reconhecimento do patógeno pela planta pode ocorrer tanto a nível de membrana plasmática, geralmente reconhecendo fungos, quanto a nível intracelular para certos eliciadores bacterianos e virais. A exemplo desses receptores não específicos, encontramos os de etileno, ácido salicílico, jasmonatos, β -glucanas e quitina, sendo esses dois últimos fortemente ligados ao reconhecimento de fungos devido a composição da parede celular desses microrganismos (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

Após o reconhecimento do patógeno através da interação eliciador – receptor o processo de defesa prossegue tendo início a transdução de sinais de forma direta ou indireta através de segundos mensageiros, fosforilações de proteínas e ativações de proteínas G; e por último a tradução do sinal em respostas celulares (CAVALCANTI;

BRUNELLI; STANGARLIN, 2005). Os mecanismos de defesa desencadeados após a infecção incluem o colapso da célula, constituindo a resposta de hipersensibilidade (RH) na qual as células adjacentes ao local da infecção morrem privando o patógeno de nutrientes; a produção de espécies reativas de oxigênio que podem se acumular rapidamente no início da infecção, ocasionando a explosão oxidativa e atuam inibindo o desenvolvimento do patógeno, fortalecendo a parede celular do vegetal por favorecer as ligações cruzadas entre proteínas estruturais e reduzindo a fluidez da membrana da planta; a síntese de fitoalexinas, que são compostos antimicrobianos quimicamente diversos capazes de impedir ou reduzir a atividade do agente patogênico, e de forma geral atuam sobre fungos causando granulação do citoplasma, ruptura da membrana plasmática e inibição das enzimas fúngicas as mudanças na parede celular devido ao aumento da lignificação reforçando as barreiras físicas impedindo a disseminação do patógeno (TAIZ; ZEIGER, 2004) (Figura 4); e a ativação de genes de defesa que culminam na síntese de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas – RP), responsáveis pelas maiores mudanças quantitativas nos teores de proteína solúvel durante as respostas de defesa. Estas apresentam propriedades físico-químicas típicas como estabilidade em pH baixo, resistência a ação de enzimas proteolíticas, estabilidade térmica (60–70°C) geralmente mostram-se como monômeros (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

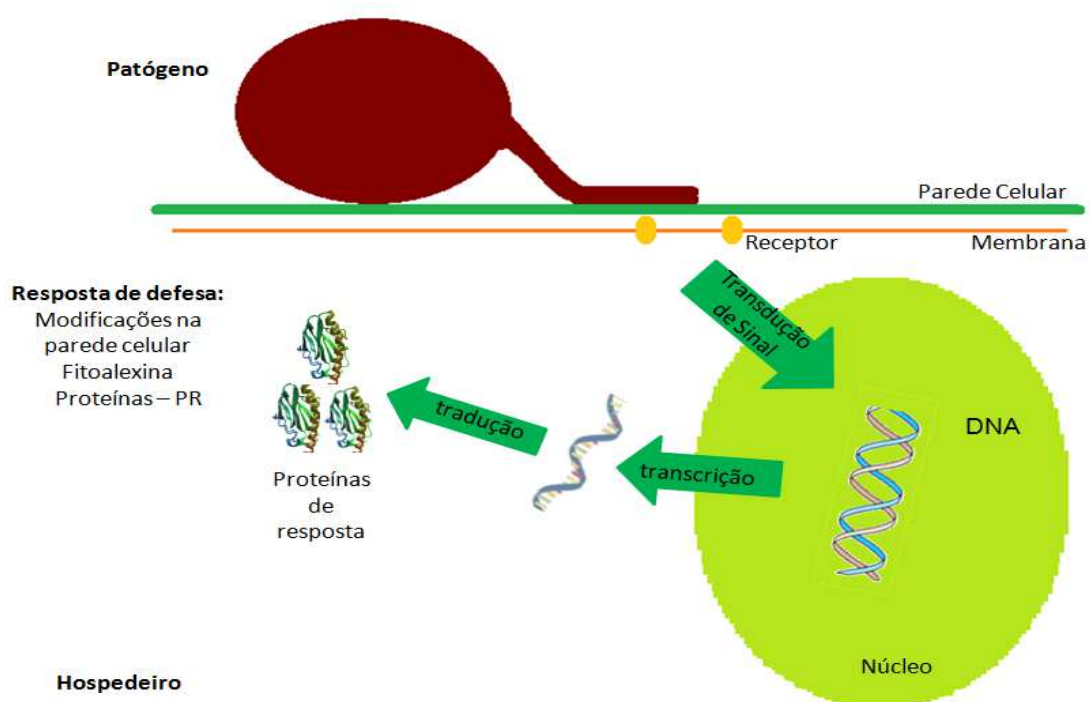


Figura 4: Esquema geral do processo de interação planta-patógeno. Mostrando a germinação do esporo fúngico, com reconhecimento por receptores de membrana, desencadeando a resposta de defesa celular.

As proteínas RP constituem uma das principais formas de defesa das plantas a fitopatógenos e sabe-se que a expressão de algumas delas é constitutiva, regulando o desenvolvimento de tecidos ou órgãos específicos. Atualmente essas proteínas foram classificadas em 17 famílias (Tabela 2) agrupadas com base nas suas características como peso molecular, correspondência de aminoácidos e função (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

Tabela 2: Famílias de proteínas relacionadas à patogênese.

Família	Membro tipo	Característica	Referência
RP-1	RP-1 ^a de fumo	Atividade antifúngica	Antoniw et al. (1980)
RP-2	RP-2 de fumo	B-1,3 glucanase	Antoniw et al. (1980)
RP-3	P e Q de fumo	Quitinase	Van Loon (1982)
RP-4	“R” de fumo	Atividade antifúngica	Van Loon (1982)
RP-5	“S” de fumo	Atividade antifúngica	Van Loon (1982)
RP-6	Inibidor I de tomate	Inibidor de protease	Green Ryan (1972)
RP-7	P ₆₉ de tomate	Endoprotease	Vera e Conejero (1988)
RP-8	Quitinase de pepino	Atividade de quitinase e lisozima	Métraux et al (1988)
RP-9	Peroxidase de fumo	Atividade de peroxidase	Lagrimini et al. (1987)
RP-10	RP1 de salsa	Similar a ribonuclease	Somssich et al. (1986)
RP-11	Quitinase V de fumo	Atividade de quitinase e quitosanase	Melchers et al (1994)
RP-12	Rs-AFP3 de rabanete	Defensina	Terras et al. (1992)
RP-13	THI2.1 de <i>Arabidopsis</i>	Tionina	Epple et al. (1995)
RP-14	LTP4 de cevada	Proteína envolvida NE transferência de lipídeos	Garcia-Olmedo et al (1995)
RP-15	OxOa (germin) de cevada	Oxalato oxidase	Zhang et al. (1995)
RP-16	OxOLP de cevada	Similar a oxalato oxidase	Wei et al. (1995)
RP-17	RPp27 de fumo	Desconhecida	Okushima et al. (2000)

Fonte: Reproduzida de CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN (2005).

1.4 Quitinases: proteínas relacionadas à patogênese

A quitina é o segundo carboidrato mais abundante da biosfera perdendo apenas para a celulose. É um homopolissacarídeo linear, com ligações do tipo β -1,4, de N-acetilglicosaminas (NacGlc) e encontra-se presente no exoesqueleto de insetos, na carapaça de crustáceos e muitos invertebrados e na parede celular de fungos e bactérias. Na natureza ocorrem dois tipos de quitina, que são caracterizadas pelo arranjo das

cadeias, sendo, antiparalela - α -quitina - e paralela - β -quitina (Figura 5). (DUO-CHUAN, 2006; SEIDL, 2008; CHEN; SHEN; LIU, 2010; AAM et al., 2010).

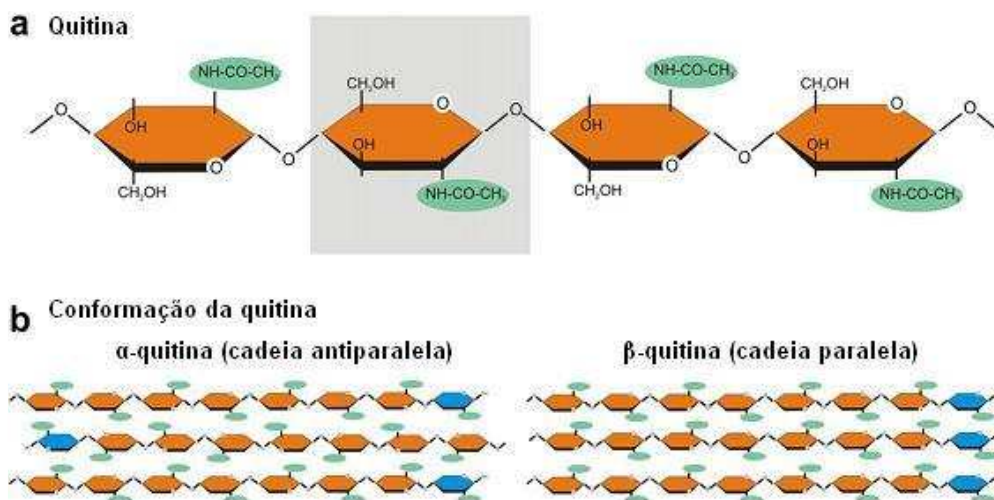


Figura 5: (a) **estrutura química da quitina.** A caixa cinza indica uma N-acetilglicosamina subunidade da cadeia de quitina. (b) os dois principais tipos de quitina são caracterizados por um arranjo antiparalelo (α -quitina) ou paralelo (β -quitina) da cadeia de quitina.

Fonte: SEIDL, 2008.

Diferentes organismos produzem uma ampla variedade de enzimas hidrolíticas que exibem especificidades por diferentes substratos e outras propriedades úteis a várias funções (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000). A exemplo dessas enzimas, as quitinases são produzidas por vários organismos e dependendo da origem, estas enzimas têm funções diferentes.

As quitinases bacterianas estão envolvidas principalmente em processos de nutrição degradando a quitina e entregando carbono e nitrogênio às células e na morfogênese (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE 2000). Em leveduras e vários fungos filamentosos, estas enzimas participam da morfogênese, na remodelagem da estrutura de parede celular e na separação das células filhas, e também em alguns processos patogênicos (SHIMONO; MATSUDA; KAWAMUKAI, 2002). Em artrópodes, as quitinases agem degradando o exoesqueleto de quitina na cutícula ou concha durante a ecdise. A atividade quitinolítica também foi observada em vírus, porém sua função nesses organismos ainda não está esclarecida. Apesar de, a quitina não estar presente em vertebrados e plantas, são encontradas quitinases nesses organismos, que atuam principalmente na defesa contra ataque de patógenos (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000).

Várias enzimas têm sido estudadas como agentes antifúngicos em potencial. A ação fungicida deve-se principalmente a hidrólise dos componentes da parede celular, levando a lise celular (WONG et al., 2010; LIU, 2011). A parede celular de fungos é

sensível à ação de enzimas quitinolíticas por ser composta, principalmente, por quitina caracterizando assim o potencial biotecnológico das quitinases a ser estudado no combate de doenças fúngicas de animais e plantas. Sela-Buurlage et al. (1993) verificaram a atividade antifúngica de diferentes isoformas de quitinases em tabaco que apresentaram atividade contra esporos de *F. solani*. Ji e Kùc (1995) descreveram a atividade destas enzimas em pepino (*Cucumis sativus* L.) sobre o fungo *Colletotrichum lagenarium* (FLEURI; SATO, 2008).

As quitinases são glicosil hidrolases (EC 3.2.1.x) evolucionariamente conservadas (OBER; CHUPP, 2009), definidas como qualquer enzima que catalisa a hidrólise das ligações β -1,4 formada entre os monômeros de NacGlc nos polímeros e oligômeros de quitina resultando na liberação de multímeros ou monômeros (Figura 6) (DUO-CHUAN, 2006; SEIDL, 2008). O conjunto de enzimas quitinases podem conter endoquitinases (EC 3.2.1.14), exoquitinases (EC 3.2.1.52), quitobiosidases (EC 3.2.1.30) e N-acetilglicosaminidases (EC 3.2.1.96), que em conjunto atuam na degradação total da parede fúngica durante processos de defesa em plantas (CHEN; SHEN; LIU, 2010). As quitinases de plantas são classificadas como pertencentes às famílias RP-3, RP-8 e RP-11 dentre as 17 famílias de proteínas – RP (KASPRZEWSKA, 2003; CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

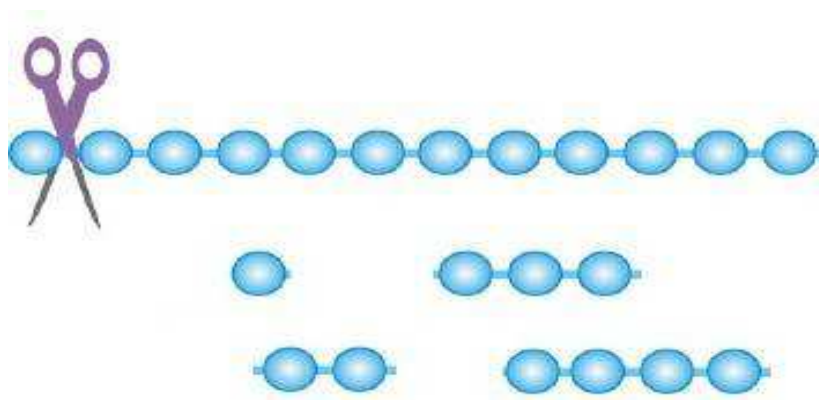


Figura 6: Esquema da clivagem por enzimas quitinolíticas. As subunidades da cadeia de quitina são mostradas em azul claro. Abaixo possíveis produtos formados pela ação da clivagem de quitinases.

Fonte: Adaptado de SEIDL, 2008.

As glicosil hidrolases são um amplo grupo de enzimas que realizam a hidrólise glicosídica entre dois ou mais carboidratos, ou entre um agrupamento carboidrato e um não-carboidrato e podem ser encontradas nos três domínios Archaeobacteria, Eubacteria e Eucaria. Um primeiro sistema de classificação enzimática IUB-MB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) de glicosil hidrolases é baseada em sua

especificidade por substrato e, ocasionalmente, em seu mecanismo molecular, tal classificação, não reflete e não se destina as características estruturais destas enzimas (RUBINI, 2009).

Uma segunda classificação para glicosil hidrolases, leva em conta a similaridade das sequências de aminoácidos, sua arquitetura de dobramento e foi proposta há alguns anos por Henrissat (1991), onde se observou que a arquitetura de dobramento é mais conservada que as sequências, estas podendo ser agrupadas e organizadas em clãs (grupo de enzimas que apresentam semelhante conformação tridimensional). Utilizando o sistema de classificação para hidrolases proposto por Henrissat, baseado na semelhança de sequências e estruturas de dobramento, foram definidas 115 famílias diferentes (RUBINI, 2009).

Com Base na similaridade da sequência de aminoácidos as quitinases são atualmente agrupadas nas famílias 18, 19 e 20 das glicosil hidrolases. A família 18 é evolutivamente diversa compreendendo quitinases de bactérias, fungos, vírus, animais e algumas de plantas. A família 19 consiste de quitinases de plantas e algumas bactérias. A família 20 inclui as β -N-acetilhexosaminidases de bactérias, Streptomicetos e humanos (DAHIYA; TEWARI; HOONDAL, 2006).

As enzimas quitinolíticas podem ser aplicadas no controle biológico de fungos fitopatogênicos e insetos, para a produção de quitino–oligossacarídeos biologicamente ativos, fonte de proteínas unicelulares e protoplastos fúngicos (PATIL; GHORMADE; DESHPANDE, 2000; FLEURI; SATO, 2008). Apesar das intensas pesquisas em quitinases de plantas e considerando as propriedades destas enzimas, a sua real função nas reações de defesa nas plantas ainda não está totalmente esclarecida.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a resistência de genótipos de tomate em relação ao isolado da raça fisiológica 2 do *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), bem como acompanhar esta interação planta-patógeno sobre a atividade de proteínas relacionadas à patogênese (RP) das classes das quitinases.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar pelo menos uma cultivar resistente a murcha de fusário;
- Comparar a atividade de quitinases entre uma cultivar resistente e uma sensível;
- Determinar as possíveis isoformas de quitinases em plantas resistentes.

3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AAM, B. B. et al. Production of Chitoologosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1482-1517, 2010.

ABCSEM - Associação Brasileira do Comercio de sementes e mudas. **Tomate lidera crescimento e lucratividade no setor de hortaliças**, 2010. Disponível em <<http://www.abcsem.com.br/noticia.php?cod=284>>. Acesso em: 08 out. 2011.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2005.

ALEXOPOULOS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4 ed. Estados Unidos: J.W.& Sons, Inc. 1996.

ALVARENGA, M. A. R.; Origem, botânica e descrição da planta. In: ALVARENGA, M. A. R. et al. **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: Editora UFLA, 2004. p. 15–18.

ANDRIÓN, E. E. B. Supressividade natural de solos do nordeste brasileiro à murcha-de-fusário e rizoctoniose do caupi. **Tese: Doutorado em Fitopatologia**, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP II (APG II). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399–436, 2003.

CAMARGO, A. M. M. et al. Desenvolvimento do sistema agroindustrial do tomate. **Informações Econômicas**, v. 36, n. 6, p. 53-57, 2006.

CARVALHO, J. L.; PAGLIUCA, L. G. Tomate: um mercado que não pára de crescer globalmente. **Revista Hortifruti Brasil**, v. 6, n. 58, p. 6-14, 2007.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. 1. ed. Piracicaba:FEALQ. 2005. p. 81-124.

CHEN, J. K.; SHEN, C. R.; LIU, C. L. N-acetylglucosamine: Production and Applications. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2493-2516, 2010.

CORDEIRO, M. C. R.; SÁ, M. F. G. Biotecnologia e resistência a patógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, n. 10, p. 34-39, 1999.

COSTA, M. D.; LOVATO, P. E.; SETE, P. M. Mycorrhizal inoculation and induction of chitinases and β -1,3-glucanases and fusarium resistance in grapevine rootstock. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 4, p. 376-383, 2010.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 773–782, 2006.

DAVIS, K. R. et al. Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. **Plant Journal**, v. 17, n. 6, p. 603–610, 2002.

DESJARDINS, A. E. et al. Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1377-1383, 2000.

DORAIS, M.; GOSSELIN, A.; PAPADOPOULOS, A. P. Greenhouse tomato fruit quality. **Horticultural Reviews**, v. 26, p. 239-310, 2001.

DUO-CHUAN, L. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**, v. 161 p. 345–360, 2006.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria. **Embrapa Hortaliças**, 2011. Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/>>. Acesso em: 25 set. 2011.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivo de Tomate para Industrialização – Doenças**, 2009. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_tomate_industrializacao/doencas.htm#topo> Acesso em: 08 out. 2011.

FAO – FAOSTAT - Agricultural Statistics Database. **World Agricultural Information Centre**, 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 26 set. 2011.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2003. p. 193–214.

FILGUEIRA, F. A. R. Solanáceas II - Tomate: a hortaliça cosmopolita. In: **Novo Manual de Olericultura - Agrotecnologia Moderna na Produção e Comercialização de Hortaliças**. 3. ed. Viçosa: Editora UFV, 2008. p.189-221.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. β -1,3 glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 4, p. 1224-1231, 2008.

FLUHR, R. Sentinels of Disease: Plant Resistance Genes. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1367–1374, 2001.

FREIRE, F. C. O. et al. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. **Documentos Embrapa: Embrapa Agroindustrial Tropical**, v. 110, p.48. 2007.

GODOY, P.; COLOMBO, A. L. Biologia e Relevância Clínica das Espécies de *Fusarium* spp. **Prática Hospitalar**, v. 34, p. 136-140, 2004.

HENRISSAT, B. A Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 380, p. 309-316, 1991.

IBGE – SIDRA Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Sistema de recuperação automática - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2011. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 25 set. 2011.

JI, C., KÙC. J. Purification and characterization of an acidic β -1,3-glucanase from cucumber and its relationship to systemic disease resistance induced by *Colletotrichum lagenarium* and tobacco necrosis virus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 8, p. 899-905, 1995.

KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases – Regulation and Function. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 8, p. 809-824, 2003.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do Tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill). In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**, 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 2005, p.690-719.

LAM, S. K.; NG, T. B. Isolation of a small chitinase-like antifungal protein from *Panax notoginseng* (sanchi ginseng) roots. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, p. 287–292, 2001.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. 1. Ed. Ames: Blackwell, 2006.

LIU, Y. et al. Preparation and characterization of α -galactosidase-loaded chitosan nanoparticles for use in foods. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1162–1168, 2011.

LOPES, C. A. Introdução geral. In: LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. p. 11–15.

LOPES, C. A.; REIS, A.; BOITEUX, L. S. Doenças fúngicas. In: LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. p. 19–51.

MARTINS, M. K. Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira. **Tese: Doutorado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Universidade de São Paulo USP, 2005.

OBER, G.; CHUPP, G. L. The chitinase and chitinase-like proteins: A review of genetic and functional studies in asthma and immune – mediated diseases. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 9, n.5, p.401-408, 2009.

OLIVEIRA, V. C.; COSTA, J. L. S. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 631-634, 2002.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: An exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 473-483, 2000.

PRITSCH, C. et al. Fungal Development and Induction of Defense Response Genes During Early Infection of Wheat Spikes by *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 2, p. 159–169, 2000.

REIS, A.; BOITEUX, L. S. Outbreak of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in commercial fresh-market tomato fields in Rio de Janeiro State, Brazil. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 451-454, 2007.

REIS, A. et al. Novel sources of multiple resistance to three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in *Lycopersicon* germplasm. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 495-502, 2004.

REIS, A. et al. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 426-428, 2005.

REIS, A. et al. Seleção de Híbridos e Acessos de Tomate para Resistência a f. sp Raça 3. **EMBRAPA: Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, n. 62, 19p. 2009.

RUBINI, M. R. Clonagem, expressão heteróloga e caracterização funcional de uma endoglicanase de *Penicillium echinulatum*. **Tese: Doutorado em Biologia Molecular** Universidade de Brasília UNB, 2009.

SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, p. 36-42, 2008.

SELA-BUURLAGE, M. B. et al. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinase and b-1,3-glucanase exhibit antifungal activity. **Plant Physiology**, v. 101, n. 3, p. 857-863, 1993.

SHIMONO, K.; MATSUDA, H.; KAWAMUKAI, M. Functional expression of chitinase and chitosanase, and their effects on morphologies in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, p. 1143-1147, 2002.

SILVA, J. C.; BETTIOL, W. Potential of Non-Pathogenic *Fusarium oxysporum* Isolates for control of *Fusarium* Wilt of tomato. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 409-412, 2005.

SNYDER, W. C.; HANSEN, H. N. Species concept, genetics and pathogenicity in *Hypomyces solani*. **Phytopathology**, v. 44, p. 338-342, 1954.

SOUZA, L. T. et al. Reação de genótipos de tomateiro às raças 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 102-106, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabolitos secundários e defesa vegetal. In: _____. **Fisiologia Vegetal** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 309-334.

VALE, F. X. R. et al. Doenças causadas por fungos em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. **Controle de Doenças de Plantas: Hortaliças**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. p. 699-756.

VALE, F. X. R. et al. Manejo integrado das doenças do tomateiro: epidemiologia e controle. In: ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. Lavras: Editora UFLA, 2004. p. 249-253.

WONG, J. H. et al. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 1221-1235, 2010.

CAPÍTULO I

Manuscrito submetido ao Periódico *Plant Science*

Fator de Impacto: 2.945

Elsevier Editorial System(tm) for Plant Science
Manuscript Draft

Manuscript Number: PSL-D-12-00563

Title: Evaluation of the resistance and differential induction of chitinases in tomato in response to inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Article Type: Full Length Article

Keywords: *Solanum lycopersicum*; *Fusarium*; Resistance; Chitinases.

Corresponding Author: Mrs Carolina Barbosa Malafaia, M.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Pernambuco

First Author: Carolina B Malafaia, M.D.

Order of Authors: Carolina B Malafaia, M.D.; Túlio D Silva, M.S.; Daniel Oliveira J Amaral, Sc.D.; Maria Luíza R. B da Silva, Sc.D.; Maria Tereza S Correia, Ph.D.; Márcia V Silva, Sc.D.

Abstract: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) causes fusarium wilt in tomato, a disease that significantly affects its production. The response of different tomato genotypes to fusarium wilt aiming at selecting sources of resistance, as well as the differential chitinases secretion during infection between resistant and sensitive cultivars were studied. Results show that the BHRS cultivar proved to be resistant to the disease and there was increased chitinolytic activity in the roots of this genotype six days after inoculation (dai). The BHRS genotype may serve as source of resistance genes to the race 2 of Fol. Chitinases are described in many plants as participants in the defense against pathogens and their accumulation in inoculated plant tissues may serve as a biochemical marker for selection of resistant progeny in the tomato breeding program.

Suggested Reviewers: Leonardo C Souza Sc.D.
leonardo.cavalcanti@univasf.edu.br

Rildo Sartori B Coelho Sc.D.
rsartori@oi.com.br

Elineide B da Silveira Sc.D.
elineidebs@yahoo.com

Ailton Reis
ailton@cnph.embrapa.br

Evaluation of the resistance and differential induction of chitinases in tomato in response to inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Carolina Barbosa Malafaia^{a,*}, Túlio Diego Silva^a, Daniel Oliveira Jordão do Amaral^a, Maria Luiza R. B. da Silva^b; Maria Tereza dos Santos Correia^c; Márcia Vanusa Silva^c.

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Centro de Ciências Biológicas CCB – Universidade Federal de Pernambuco; Rua Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária. CEP 50670-901 Recife – PE, Brasil. e-mail: carol08malafaia@hotmail.com; diegotulio1@gmail.com; danieljornal@yahoo.com.br;

^b Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA, CEP 50761-000, Recife, PE, Brasil, e-mail: luizabastos@ipa.br;

^c Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária 50670-420 Recife - PE Brasil. e-mail: marciavanusa@yahoo.com.br; mtscorreia@gmail.com;

* Corresponding author. Tel.: +55 81 2126 8547; fax: +55 81 2126 8576.

Email: carol08malafaia@hotmail.com (C. B. Malafaia)

Abstract

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* (Fol) causes fusarium wilt in tomato, a disease that significantly affects its production. The response of different tomato genotypes to fusarium wilt aiming at selecting sources of resistance, as well as the differential chitinases secretion during infection between resistant and sensitive cultivars were studied. Results show that the BHRS cultivar proved to be resistant to the disease and there was increased chitinolytic activity in the roots of this genotype six days after inoculation (dai). The BHRS genotype may serve as source of resistance genes to the race 2 of *Fol*. Chitinases are described in many plants as participants in the defense against pathogens and their accumulation in inoculated plant tissues may serve as a biochemical marker for selection of resistant progeny in the tomato breeding program.

Keywords: *Solanum lycopersicum*; *Fusarium*; resistance; chitinases.

1. Introduction

Tomato crops (*Solanum lycopersicum* L.) are remarkable for its worldwide economic and social importance. However, the tomato is affected by many diseases, one of which being the fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) which may cause losses of up to 100% of production in more sensitive cultivars. In this pathosystem, the use of resistant cultivars has been the only effective controlling alternative [1].

The classification of *Fol* into race is based on the differential reaction of tomato germplasms. Currently, three races are known: 1, 2 and 3. In Brazil, race 1 is the most frequent, being controlled with the use of resistant cultivars. Race 2 is growing in importance at the major producing states due to the susceptibility of commercial cultivars, and race 3 has a more limited geographical distribution. This disease has become important due to the fact that commercial resistant cultivars able to withstand race 2 and 3 are not yet widely available for planting [2-5].

Plants respond to the attack of pathogenic microorganisms by inducing the expression of a large number of genes that encode several proteins [6]. One of these defense compounds classes is represented by pathogenesis-related proteins – RP proteins [7], in which hydrolases such as chitinases (EC 3.2.1.14, EC 3.2.1.52) are found and reported mainly as inhibitors of fungal growth [8-12].

Despite the importance of tomato production in Brazil, there are few studies about new resistance sources to fusarium wilt directing and assisting the tomato breeding programs, mainly due to difficulties in obtaining these cultivars and to the use of specific-race type resistance with low durability [13].

This study aimed at evaluating the resistance of tomato genotypes to *Fol* and monitoring the plant-pathogen interaction at the activity of chitinases classes pathogenesis-related proteins (RP).

2. Material and methods

2.1 Plant Material

The tomato genotypes used to evaluate resistance to the isolate from race 2 of *Fol* were Ourovivo, Viradoro, Redenção, Belmonte, BHRS and IPA-6 all donated by the Plant Breeding Program of the Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).

2.2 Isolated from race 2 of *Fol* and inoculum preparation

The isolate from race 2 of *Fol* was obtained from tomato plants of Santa Clara cultivar (CMM-1252) with symptoms of fusarium wilt, collected in Camocim de São Félix – Pernambuco, Brazil. The pathogen inoculum was prepared into fungal culture discs of 5 mm in diameter, previously grown in PDA culture medium (potato/dextrose/agar) and transferred to Erlenmeyer flasks containing 250 ml of PD culture medium (potato/dextrose) [14]. After seven days in a BOD incubator at 28° C and continuous light, the inoculum suspension was homogenized in a mechanical shaker and filtered through two layers of sterile gauze. Thereafter, the count of microconidia in the suspensions was performed with the aid of a Neubauer chamber and the inoculum concentration adjusted to 1×10^6 microconidia/ml.

2.3 Genotypes selection

The experiment was conducted in a greenhouse. Initially, seeds of the cultivars were sown in polystyrene trays with 128 cells filled with sterile substrate (Plantmax ®). Seedlings with two pairs of fully expanded leaves (approximately 30 days after sowing) were removed from cells and the roots were washed on running water to remove the bonded substrate. The apical root portion (approximately 2cm) was cut with scissors and immersed for 10 min in microconidia suspension by the adapted method of Santos and Lima [15].

After inoculation, seedlings were transplanted to plastic pots containing 1.0 kg of the same sterilized substrate. The experimental design was completely randomized with three replications per treatment with four plants each. They were then kept in a greenhouse with average temperature of $5 \pm 28^\circ\text{C}$ and $60 \pm 10\%$ humidity. After 21 days, wilt symptoms caused by *Fol* were observed.

2.4 Extraction and quantification of total proteins

The protein extraction followed the method of Roberti et al. [16] with modifications. Leaf and root samples of tomato plants were macerated in a mortar with liquid nitrogen and, after spraying the tissue, extraction buffer was added (9.4 mM sodium acetate/acetic acid 1.4 mM, pH 5.5) 1:1 (w/v). Samples were mixed and transferred to microcentrifuge

tubes and centrifuged at 10.000xg for 30 min. at 4°C. Supernatants of samples were collected and stored in a freezer at -20°C. The determination of total proteins concentration was performed according to the method of Bradford [17] using BSA to construct the standard curve with limits between 0 and 100 µg/ml.

2.5 Chitinolytic activity

BHRS and IPA-6 plant cultivars were challenged against the isolate from race 2 of *Fol* as described above and the chitinolytic activity measured in leaves and roots of challenged and control plants at intervals of 1, 2, 4, 6, 9 and 11 dai. The collected plant tissues were stored at -80°C until analysis.

The chitinolytic activity was determined by final reduction quantification of NacGlc formed from the chitinolytic activity contained in 15 µg of total proteins from each sample on the 0.5 ml of colloidal chitin substrate (5%) [18,19] under spectrophotometer at 585 nm. The concentration of chitinase was calculated by comparison with a NacGlc standard curve. One unit of chitinase was defined as the amount of enzyme required to produce 10 µg/ml NacGlc from the substrate polymer per hour under the conditions described. Assays were performed in triplicate and the results were compared by factorial ANOVA (independent variables: plant tissue, genotype and dai, dependent variable: chitinolytic activity) and Tukey test *a posteriori*. Data normality and variances homogeneity were verified by the Shapiro-Wilk [20] and Levene [21] tests, respectively. All analyzes were performed by the software STATISTICA ver. 7.0 with $p < 0.05$ as significance level [22].

2.6 Gel with chitinolytic activity - SDS-PAGE

Chitinases were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis under native conditions [23] using 12.5% separation gel with addition of glycol-chitin substrate (0.01%) overlapped by a 4% gel. Samples were prepared using 15 µg protein of each extract that were then lyophilized and prepared in a 2X sample buffer (30% sucrose/0.2% bromophenol blue/4% SDS/0.1 M Tris-HCl pH 6.8) and loaded into wells of the stacking gels. After the electrophoresis (20 mA for 2 hours), the gels were incubated with folding buffer (0.1 M sodium acetate pH 5.3/1% (v/v) Triton X-100) for 20 h at 30°C under 50 rpm constant agitation. The gels were stained with Calcofluor White M₂R 0.01% (w/v) for 10 min. in the dark; subsequently destained in distilled water for 24 h and visualized under UV light showing chitinolytic activity in the samples [24].

3. Results

Among the tomato genotypes evaluated for reaction to the inoculation by the physiological race 2 of *Fol* in greenhouse conditions, only BHRS had become resistant without the observation of disease symptoms (Fig. 1A). On the other hand, the other genotypes Ourovivo, Viradoro, Redenção, Belmonte and IPA-6 behaved as sensitive (Fig. 1B), showing the typical disease symptoms such as wilting followed by plant death.

Contrasting genotypes, BHRS (resistant) and IPA-6 (sensitive), were compared regarding the chitinase secretion when inoculated with *Fol*, in different plant tissues and days after inoculation. The results showed significant differences in the enzyme activity between the two plant materials comparing the tissues and time intervals analyzed.

Increased chitinolytic activity was observed during the interaction of BHRS genotype with race 2 of *Fol* (Fig. 2A and B), mainly in the root tissue at six nine dai. However, there were no differences in chitinolytic secretion over the period analyzed in leaves of the same genotype. The BHRS genotype showed 110% of average increase on the chitinolytic activity of roots compared to uninoculated BHRS plants.

In IPA-6 genotype, the chitinolytic activity showed no significant differences during the *Fol* inoculation period in the analyzed plant tissues. Because of the wilting progress, there was decreased activity in plants challenged, bringing the level of activity to a similar level to plants of IPA-6 genotype without inoculation (Fig. 2C and D).

Analyzing the profile of the secreted chitinase isoforms in the interaction between BHRS genotype and race 2 of *Fol*, differences were observed over time, after the phytopathogen inoculation (Fig. 3A). In the BHRS tomato roots a wide variety of chitinases, including a form expressed constitutively (SIChit 1), and eight isoforms induced by the infection (SIChit 2, SIChit 3, SIChit 4, SIChit 5, SIChit 6, SIChit 7, SIChit 8, SIChitn 9), were found. In the interaction of IPA-6 genotype with the *Fol* race 2, it was observed that SIChit1 secretion remained constant over the 9 dai, and at 11 dai secretion decreased (Figure 3B). There was no secretion of the isoforms induced in the period analyzed. Since equal amounts of soluble proteins were loaded onto the gel, the intensity of bands represented the specific activity of chitinase.

The chitinase isoform denominated SIChit1, is shown to be constitutive, since it's expressed in both control and infected plants. However, it responds to infection, with its expression increasing during the infection process, with maximum activity at six dai. After this period the activity decreased. In addition, another eight chitinase isoforms responded to infection, increasing their activities on the 2nd dai, where once again there is maximal

activity of these enzymes at 6 dai, with the emergence of more isoforms than the other days.

4. Discussion

The present results corroborate previous ones found in other plants such as sorghum [25], ginseng [26] and lemon [27] and also in other studies with tomatoes using different evaluation techniques of overexpression, such as Differential Display and real-time PCR [28,29]. In contrast, works on black pepper [6] and potato [30] reported that sensitive varieties produced chitinases at higher levels.

Chitinases have been found in many plant tissues, suspension cell cultures and protoplasts. They occur in several cultivated species, such as beans [31], pea [32], Indian mustard [33], potato [34], sweet potato [35], maize [36,37], onion [38], rice [25] and tomato [28,39] among others, and also in non-cultivated species such as *Arabidopsis thaliana* [40,41] and *Limonium bicolor* [42].

Many of these chitinases are constitutively expressed, generally at low levels. There is some evidence pointing to the involvement of chitinases not only on the defense against biotic and abiotic stresses, but also in the growth and plant development processes [43-45]. One example was found in carrots, which demonstrated that these enzymes improved the embryo somatic development, but that participation has not been fully elucidated [46].

There is often the induction of chitinases in plants under pathogen attack, since plant cells are very sensitive to specific oligosaccharides, including the N-acetylglucosamines - monomers of chitin - that cause a variety of responses including the induction of antifungal chitinases [44,47-48]. The present results show that BHRS tomato genotype, considered resistant, showed differential secretion of chitinases induced by *Fol* infection, while IPA-6 genotype (sensitive) showed no temporal change in chitinolytic activity, suggesting the involvement of chitinases on the resistance of BHRS tomato genotype to the fusarium wilt.

Different chitinase isoforms are known in plants; however, they might have different activities and specific roles, and could be induced by various agents or by signal transduction pathways. However, the protection effectiveness can be affected by specific activity, concentration, enzyme localization inside the cell, and the characteristics of host cell-fungi interactions [49-50]. The accumulation of pathogenesis-related proteins (PR proteins), such as chitinases, is an important feature of plant defense responses [47,50].

They are induced by pathogens and contribute to the plant's defense systems, selectively attacking pathogens [51].

After induction, chitinase can accumulate locally or systemically, depending on the pathogen causing the infection and its virulence on the host plant [43]. It is worthy of note that the BHRS genotype root tissue showed significant differential expression of chitinase in response to the pathogen infection, 52% greater than the activity found in the leaves, thus characterizing a local response at the root. The increased secretion of these enzymes in tomato roots may be related to the fact that the tissue will be directly involved in the recognition of the pathogen soil invasion. Thus, in order to increase the efficiency of tomatoes in protecting themselves against *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, the plant must provide mechanisms to prevent the entry of fungus from the roots, since once it enters the roots, it colonizes the vascular system, leading to wilt and subsequently plant death [6].

The determination of sensitivity or resistance of plants to diseases can be influenced by the rate of chitinase induction, its concentration on the tissues, and their location in the cells in relation to the pathogen growth. In some plant species, resistant tissues accumulate chitinases quickly and in some cases, the increased final concentration of this enzyme in sensitive tissues presents itself late, leading to a successful colonization [6,25,43].

Comparing the chitinase induction in tissues of BHRS (resistant) or IPA-6 (sensitive) genotypes to *Fusarium* regarding the rate of induction and the final activity in the tissues studied in this work, IPA-6 chitinases were almost unchanged in spite of being higher on challenged than on control plants. In many cases, resistant plants respond initially with a hypersensitivity reaction, with very fast localized cell death. The response to injury and stress of cells could have quickly induced the production of chitinases in adjacent cells or tissues [52,53]. The widespread occurrence of chitinases in plants and its induction by a wide range of biotic factors suggest that these enzymes should have some general functions related to stress and defense, or even roles in plant development or senescence [43-45].

5. Conclusion

The genotype BHRS stood out as an excellent source of resistance to *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2. A significant increase in the chitinase secretion was observed at 6 dai, especially in the root tissue, during the inoculation process.

6. Acknowledgements

The authors thank the Instituto Agronômico de Pernambuco – IPA for the availability of physical infrastructure to carry out this work, CAPES for granting the graduate scholarship, Banco do Nordeste and CNPq for funding the project and Edgar Alberto do Espírito Santo Silva for his assistance with the statistical analysis.

7. Reference

- [1] J.C. Silva, W. Bettiol, Potential of Non-Pathogenic *Fusarium oxysporum* Isolates for control of Fusarium Wilt of tomato, Fitopatol. Bras. 30 (2005) 409-412.
- [2] C. Kurozawa, M. A. Pavan, Doenças do Tomateiro, in: H. Kimati, L. Amorim, A. Bergamin Filho, L.E.A. Camargo, J.A.M. Rezende (Eds.), Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas, São Paulo, Agronômica Ceres, 2005, p.690-719.
- [3] A. Reis, H. Costa, L.S. Boiteux, C.A. Lopes, First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil, Fitopatol. Bras. 30 (2005) 426-428.
- [4] A. Reis, L.S. Boiteux, Outbreak of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in commercial fresh-market tomato fields in Rio de Janeiro State, Brazil, Hort. Brasil. 25 (2007) 451-454.
- [5] F. L'haridon, S. Aimé, S. Duplessis, C. Alabouvette, C. Steinberg, et al., Isolation of differentially expressed genes during interactions between tomato cells and a protective or a non-protective strain of *Fusarium oxysporum*, Physiol. Mol. Plant Pathol. 76 (2011) 9–19.
- [6] R.S. Varma, K.J. George, S. Balaji, V.A. Parthasarathy, Differential induction of chitinase in *Piper colubrinum* in response to inoculation with *Phytophthora capsici*, the cause of foot rot in black pepper, S. J. B. S. 16 (2009) 11–16.
- [7] S.K. Lam, T.B. Ng, Isolation of a small chitinase-like antifungal protein from *Panax notoginseng* (sanchi ginseng) roots, Int. J. Biochem. Cell Biol. 33 (2001) 287–292.
- [8] A. Stintzi, T. Heitz, V. Prasad, S. Wiedermann-Merdinoglu, S. Kauffmann, et al., Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens, Biochimie 75 (1993) 687–706.
- [9] L.C. Van Loon, E.A. Van Strien, The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins, Physiol. Mol. Plant Pathol. 55 (1999) 85–97.
- [10] R.S. Patil, V. Ghormade, M.V. Deshpande, Chitinolytic enzymes: An exploration, Enzyme. Microb. Tech. 26 (2000) 473–483.
- [11] L. Duo-Chuan, Review of fungal chitinases, Mycopathologia 161 (2006) 345–360.
- [12] V. Seidl, Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions, Fungal Biol. Rev. 22 (2008) 36–42.
- [13] A. Reis, L.B. Giordano, C.A. Lopes, L.S. Boiteux, Novel sources of multiple resistance to three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in *lycopersicon* germplasm, Crop. Breed. Appl. Biot. 4 (2004) 495–502.

- [14] O.D. Dhingra, J.B. Sinclair, Basic plant pathology methods, second ed., Boca Raton, Lewis Publishers, 1995.
- [15] J.R.M. Santos, C.A. Lopes, B.J.C. Lima, Cultivares de tomateiro diferenciadoras de raças de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, Hort. Brasil. 11 (1993) 27–29.
- [16] R. Roberti, A.R. Veronesi, A. Cesari, A. Cascone, I.D. Berardino, et al., Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*, Plant Sci. 175 (2008) 339–347.
- [17] M.M. Bradford, A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248–254.
- [18] J.L. Reissig, J.L. Strominger, L.F. Leloir, A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars, J. Biol. Chem. 217 (1955) 959–967.
- [19] F.R. Cavalcanti, M.L.V. Resende, R.B. Pereira, J.C.B. Costa, C.P.S. Carvalho, Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana, Pesq. Agropec. Bras. 41 (2006) 1721–1730.
- [20] S.S. Shapiro, M.B. Wilk, An analysis of variance test for normality (Complete samples), Biometrika 52 (1965) 591–611.
- [21] H.R. Levene, Test for equality of variances, in: I. Olkin (Ed.), Contributions to probability and statistics, Palo Alto, Stanford University Press, 1960, pp.278–292.
- [22] J.H. Zar, Biostatistical analysis, fourth ed., New Jersey, Prentice Hall Inc, 1999.
- [23] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227 (1970) 680–685.
- [24] J. Trudel, A. Asselin, Detection of chitinase activity after polyacrilamide gel electrophoresis, Anal. Biochem. 178 (1989) 362–366.
- [25] R.X. Yan, J.H. Hou, D.F. Ding, W.Q. Guan, C.Y. Wang, et al., In vitro antifungal activity and mechanism of action of chitinase against four plant pathogenic fungi, J. Basic. Microbiol. 48 (2008) 293–301.
- [26] S.K. Lam, T.B. Ng, Isolation of a small chitinase-like antifungal protein from *Panax notoginseng* (sanchi ginseng) roots, Int. J. Biochem. Cell. Biol. 33 (2001) 287–292.
- [27] N. Fanta, X. Ortega, L.M. Pérez, The development of *Alternaria alternata* is prevented by chitinases and β -1,3-glucanases from *Citrus limon* seedlings, Biol. Res. 36 (2003) 411–420.
- [28] D.O.J. Amaral, M.M.A. Lima, L.V. Resende, M.V. Silva, Differential gene expression, induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infection, in tomato, Pesq. Agropec. Bras. 43 (2008) 1017–1023.

- [29] S. Aimé, C. Cordier, C. Alabouvette, C. Olivain, Comparative analysis of PR gene expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and the biocontrol strain *F. oxysporum* Fo47, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 73 (2008) 9–15.
- [30] M. Schroder, K. Hahlbrock, E. Kombrink, Temporal and spatial patterns of 1,3-b-glucanase and chitinase induction in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*, *Plant J.* 2 (1992) 161–172.
- [31] S.Y. Wang, J.J. Zhou, B. Shao, Y.J. Lu, P.F. Rao, A thermostable chitinase with chitin-binding activity from *Phaseolus limensis*, *J. Food Sci.* 73 (2008) 452–457.
- [32] M.M. Chang, D. Horovitz, D. Culley, L.A. Hadwiger, Molecular cloning and characterization of a pea chitinase gene expressed in response to wounding, fungal infection and the elicitor chitosan, *Plant. Mol. Biol.* 28 (1995) 105–111.
- [33] Y. Guan, M. L. Chye, A *Brassica juncea* chitinase with two-chitin binding domains show anti-microbial properties against phytopathogens and Gram-negative bacteria, *Plant Signal. Behav.* 3 (2008) 1103–1105.
- [34] M.L. Chye, K.J. Zhao, Z.M. He, S. Ramalingam, K.L. Fung, An agglutinating chitinase with two chitin-binding domains confers fungal protection in transgenic potato, *Planta* 220 (2005) 717–730.
- [35] W.C. Hou, Y.C. Chen, Y.H. Lin, Chitinase activity of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam var. Tainong 57), *Bot. Bull. Acad. Sinica* 39 (1998) 93–97.
- [36] J.N. Neucere, T.E. Cleveland, C. Dischinger, Existence of chitinase activity in mature corn kernels (*Zea mays* L.), *J. Agricult. Food Chem.* 39 (1991) 1326–1328.
- [37] C. Ji, R.A. Norton, D.T. Wicklow, P.F. Dowd, Isoform Patterns of Chitinase and β -1,3-Glucanase in Maturing Corn Kernels (*Zea mays* L.) Associated with *Aspergillus flavus* Milk Stage Infection, *J. Agricult. Food Chem.* 48 (2000) 507–511.
- [38] K.J. Williams, D.W.M. Leung, Chitinase induction in onion tissue cultures. *Plant. Cell. Tiss. Org.* 32 (1993) 193–198.
- [39] V.I. Emel'yanov, A.P. Dmitriev, Induced Increase in Chitinase Activity in Tomato Cells (*Lycopersicon esculentum* L.), *Cytol. Genet.* 41 (2007) 284–287.
- [40] L.B.A. Gerhardt, G. Sachetto-Martins, M.G. Contarini, M. Sandroni, R.P. Ferreira, et al., *Arabidopsis thaliana* class IV chitinase is early induced during the interaction with *Xanthomonas campestris*. *FEBS Lett.* 419 (1997) 69–75.
- [41] T. Ohnuma, T. Numata, T. Osawa, M. Mizuhara, O. Lampela, et al., A class V chitinase from *Arabidopsis thaliana*: gene responses, enzymatic properties, and crystallographic analysis, *Planta* 234 (2011) 123–137.

- [42] Z.H. Liu, C.P. Yang, X.T. Qi, L.L. Xiu, Y.C. Wang, Cloning, heterologous expression, and functional characterization of a chitinase gene, Lbchi32, from *Limonium bicolor*, *Biochem. Genet.* 48 (2010) 669–679.
- [43] Z.K. Punja, Y.Y. Zhang, Plant Chitinases and Their Roles in Resistance to Fungal Diseases, *J. Nematol.* 25 (1993) 526–540.
- [44] G.W. Gooday, Aggressive and defensive roles for chitinases, in: P. Jollès, R.A. Muzzarelli (Eds.), *Chitin and Chitinases*, Birkhäuser Verlag, PO, 1999, pp.157–169.
- [45] A. Kasprzewska, Plant chitinases – Regulation and Function, *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8 (2003) 809–824.
- [46] A.J.D. Jong, J. Cordewener, F.L. Schiavo, M. Terzi, J. Vandekerckhove, et al., A Carrot Somatic Embryo Mutant Is Rescued by Chitinase, *Plant Cell* 4 (1992) 425–433.
- [47] A.D. Campos, M.M.V. Hampe, A.G. Ferreira, I.F. Antunes, L.A.S. Castro, Induction of systemic resistance to anthracnose in common bean by the avirulent delta race of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Pesq. Agropec. Bras.* 44 (2009) 15–21.
- [48] L.P. Boava, O.J. Kuhn, S.F. Pascholati, R.M.D. Piero, E.L. Furtado, Chitinase and peroxidase activity in different stages of eucalypt leaves after inoculation with *Puccinia psidii* and acibenzolar-S-metil, *Trop. Plant. Pathol.* 35 (2010) 124–128.
- [49] J.H. Wong, T.B. Ng, R.C. Cheung, X.J. Ye, H.X. Wang, et al., Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87 (2010) 1221–1235.
- [50] E.F. Couto, R.S.B. Coelho, N.D. Suassuna, S.M.A. Oliveira, Avaliação de indutores de resistência em algodoeiro à murcha de fusário: atividade enzimática e índice de infecção, *Trop. Plant. Pathol.* 34 (2009) 352–356.
- [51] Z. Minic, Physiological roles of plant glycoside hydrolases, *Planta* 227 (2008) 723–740.
- [52] R.S. Goswami, Z.K. Punja, Molecular and biochemical characterization of defense responses in ginseng (*Panax quinquefolius*) roots challenged with *Fusarium equiseti*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 72 (2008) 10–20.
- [53] L.D. Huang, D. Backhouse, Analysis of chitinase isoenzymes in sorghum seedlings inoculated with *Fusarium thapsinum* or *F. proliferatum*, *Plant Sci.* 171 (2006) 539–545.

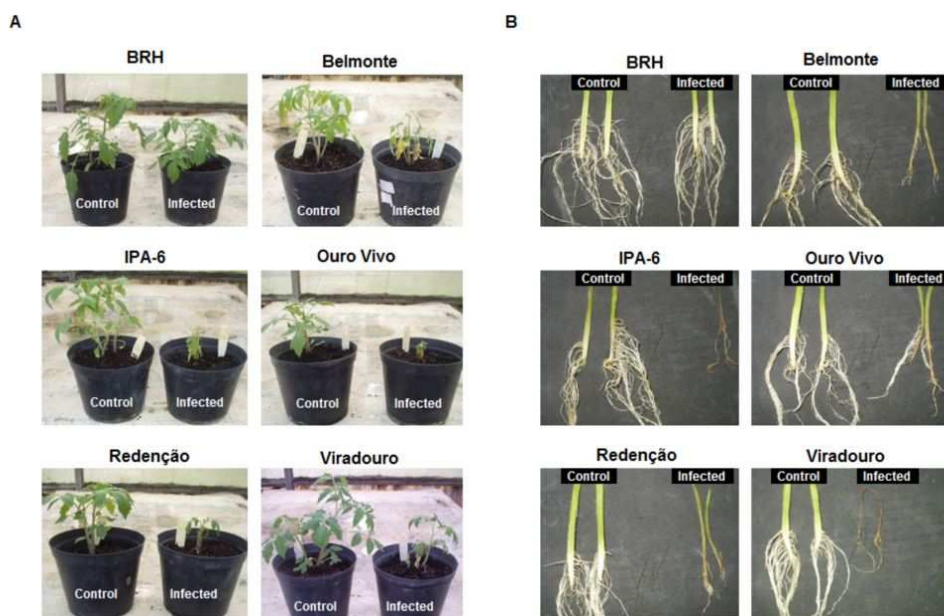


Fig. 1: Evaluation of tomato's resistance sources to *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* in the different cultivars 21 days after inoculation. In (A) symptoms of fusarium wilt in the shoot and (B) symptoms of discoloration of vascular tissues (xylem tracheids and xylem) in the infected plants.

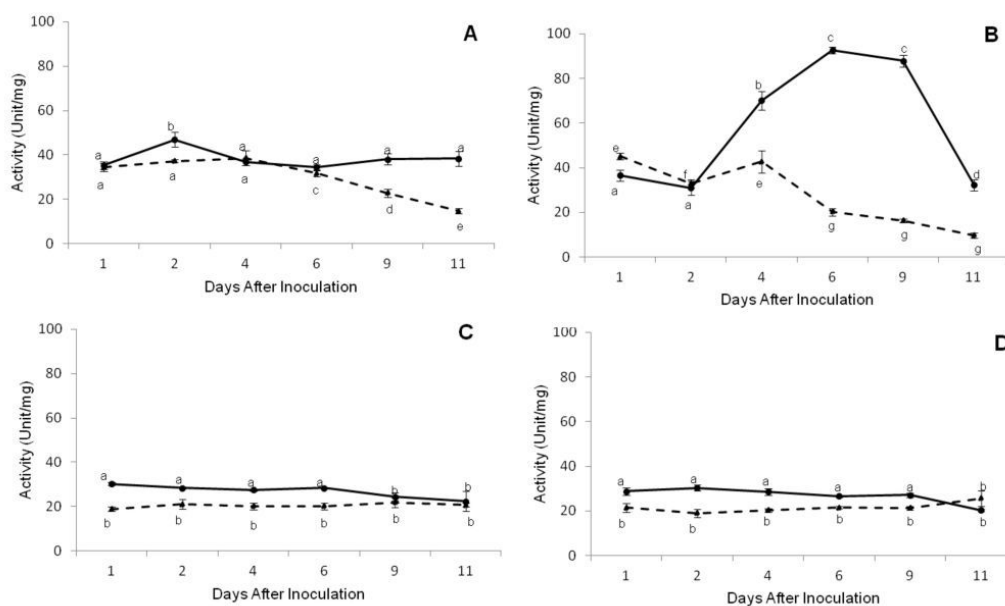


Fig. 2: Analysis of chitinolytic activity of roots and leaves proteins over time for BHRS (resistant) and IPA-6 (sensitive) genotypes of challenged (—●—) and unchallenged (---●---) tomatoes by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. In A and B are shown the activity of leaves and roots of the BHRS genotype respectively; and the activity in leaves and roots from IPA-06 genotype in C and D respectively. Lowercase letters indicate statistically significant relationships between samples of each tissue ($p < 0.05$).

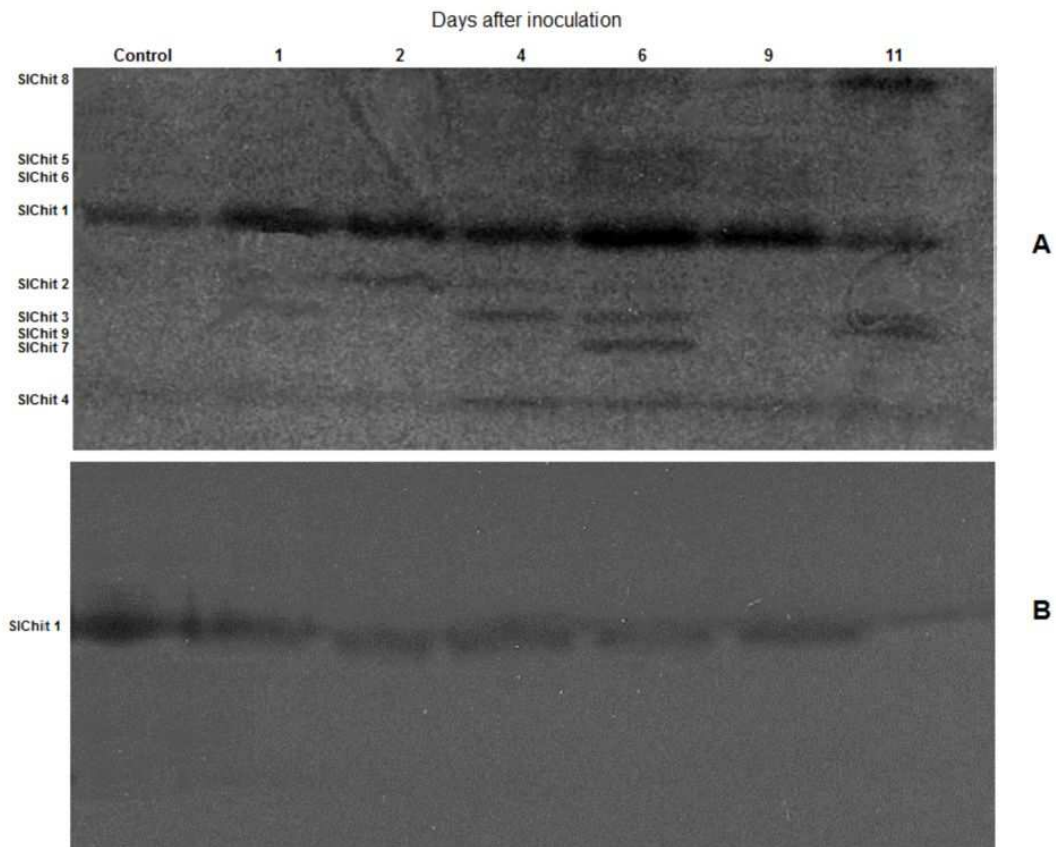


Fig. 3: Temporal profile of chitinases isoenzymes secretion in roots of BHRS (A) and IPA-6 (B) tomato, non- inoculated (control) and after inoculation (1, 2, 4, 6, 9, 11 dai) with the race 2 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* in SDS-PAGE with gel containing 1% glycol-chitin. Samples containing 15 µg proteins/well.

ANEXOS



ATIVIDADE CIENTIFICA COMPLEMENTAR

Resumo enviado ao Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental – ENAMA

Atividade antifúngica de extratos de plantas da caatinga contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Malafaia, CB¹; Nascimento, LCS¹; Silva, AG²; Silva, MV³. ¹Pós-graduação em Ciências Biológicas/UFPE, ²Doutorando em Botânica – Escola Nacional de Botânica Tropical, ³Centro de Ciências Biológicas/Departamento de Bioquímica/UFPE. Email: marcia.vanusa@ufpe.br

Palavras-chave: Controle alternativo, extratos aquosos, propriedades fungitóxicas.

A procura por novos agentes antimicrobianos, a partir de plantas, é intensa devido à crescente resistência dos microrganismos patogênicos frente aos produtos sintéticos. Além disso, o uso destes pesticidas em longo prazo causa impactos negativos para a sociedade e para o meio ambiente devido à poluição causada pelos resíduos químicos. Este trabalho teve como objetivos avaliar, *in vitro*, a fungitoxicidade dos extratos brutos aquosos (EBAs) de plantas da caatinga na inibição do crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, fungo de solo causador da murcha-de-fusário em tomateiro. Para verificar a atividade antifúngica, os EBAs foram utilizados na forma aquosa e adicionados ao meio de cultura BDA nas concentrações de 0 (Testemunha), 10, 20 e 30%. O crescimento micelial foi avaliado pela medida do diâmetro da colônia fúngica. Os resultados indicaram que, os extratos vegetais avaliados, nas concentrações testadas, se mostraram com potencial no controle de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, pela inibição do seu crescimento micelial. Destaca-se para os extratos de *Libidibia ferrea*, *Anadenanthera colubrina* e *Pityrocarpa moniliformis*, concentração de 30%, sendo mais eficiente que as demais. A utilização de extratos de plantas medicinais da caatinga está se tornando cada vez mais promissora no controle de doenças.

Apoio Financeiro: Rede Nanobiotec Brasil/CAPES