

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

**Quitinases de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.):
identificação, caracterização e atividade no controle do
Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*.**

Daniel Oliveira Jordão do Amaral

Recife , 2012

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

**Quitinases de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.):
identificação, caracterização e atividade no controle do
Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*.**

Daniel Oliveira Jordão do Amaral

Tese apresentada ao Centro de Ciências Biológicas, programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte do requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Vera Lucia de Menezes Lima
Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Márcia Vanusa da Silva
Prof^ª. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Recife, 2012

Amaral, Daniel Oliveira Jordão do

Quitinases de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.): identificação, caracterização e atividade no controle do *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*/ Daniel Oliveira Jordão do Amaral– Recife: O Autor, 2012.

115 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Vera Lúcia de Menezes Lima

Coorientadoras: Márcia Vanusa da Silva e Maria Tereza dos Santos Correia

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2012.

Inclui bibliografia e anexo

- 1. Murcha de fusarium do tomate 2. *Fusarium oxysporum* 3. Melhoramento genético em plantas I. Lima, Vera Lúcia II. Silva, Márcia Vanusa da III. Correia, Maria Tereza dos Santos IV. Título.**

579.5677

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-113

DANIEL OLIVEIRA JORDÃO DO AMARAL

Quitinases de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.): identificação, caracterização e atividade no controle do *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Tese apresentada ao Centro de Ciências Biológicas, programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte do requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Data da Aprovação _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Vera Lucia de Menezes Lima
Departamento de Bioquímica – UFPE (Presidente)

Dr. Antônio Félix da Costa
Laboratório de Fitossanidade – IPA (Membro externo)

Prof. Dr. Leonardo Sousa Cavalcanti
Lab. de Química Orgânica e Bioquímica Vegetal – UNIVASF (Membro externo)

Dra. Marleide Magalhães de Andrade Lima
EMBRAPA Algodão (Membro externo)

Profa. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira
Departamento de Bioquímica – UFPE (Membro externo)

Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva
Departamento de Bioquímica – UFPE (Suplente)

Prof^ª. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Departamento de Bioquímica – UFPE (Suplente)

Recife, 2012

**Aos meus pais Rogéria e
Ednaldo, às minhas irmãs,
Raquel e Isabel, que de alguma
forma contribuíram me
incentivando e estimulando em
todas as etapas de minha vida.**

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus

À minha família, pela ajuda e pelo estímulo, que foi uma das maiores incentivadoras dessa etapa vencida.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a Vera Menezes e Co-orientadora Prof^a. Dr^a. Tereza Correia pela orientação, oportunidade, confiança, sugestões e amizade.

À grande amiga e Co-orientadora Prof^a Dr^a. Márcia Vanusa por compartilhar seu vasto conhecimento na área da biotecnologia, dedicação generosa do seu tempo, auxílio na análise dos resultados obtidos na metodologia, sugestões e paciência em todos os momentos.

À Dr. Francisco J. L. Aragão e Dr^a. Clébia Almeida pela atenção, disponibilidade e auxílio durante todo desenvolvimento deste estudo.

Aos Laboratório de genoma (IPA) e Laboratório de Transformação Genética (LTG-EMBRAPA/CENARGEN) e por ceder a infra-estrutura dos laboratórios durante o transcorrer do trabalho.

Aos professores e funcionários da UFPE, IPA e EMBRAPA que contribuíram direta ou indiretamente para o meu crescimento profissional.

Aos companheiros do curso de doutorado em ciências biológicas pela amizade e apoio durante todo o curso.

Quero fazer agradecimentos especiais à Amizadai Leal, Diogo Lins, Gustavo Santos, Igor Lins, Leonardo Lourenço e Luiz Gustavo.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE	
ABREVIATURAS E	
SIGLAS	
1. INTRODUÇÃO	
1.1	Tomaticultura..... 13
1.2	Murcha de fusário..... 16
1.3	Técnicas moleculares para identificação de acesso da diversidade genética de <i>Fol</i> e análise da expressão gênica 19
1.3.1	Marcadores RAPD..... 20
1.3.2	Marcadores RFLP-IGS..... 21
1.3.3	PCR em tempo real (qRT-PCR)..... 22
1.4	Genes de resposta de defesa em plantas..... 24
1.4.1	Proteína-RP..... 26
1.4.2	Quitinases..... 28
1.5	Transformação genética de plantas para resistência a doenças.. 30
2. JUSTIFICATIVA	 34
3. OBJETIVOS	
3.1	Objetivo geral..... 36
3.2	Objetivos Específicos..... 36
4. REFERÊNCIAS	
BIBLIOGRÁFICAS	 37
CAPÍTULO 1	
	Genetic variability among races of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> using molecular markers..... 49
CAPÍTULO 2	
	Isolation and characterization of chitinase from tomato infected by <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 67
CAPÍTULO 3	
	Transformação genética de tomateiro mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> visando resistência a murcha do fusário..... 83
CONCLUSÕES	 102
ANEXO	
	Normas da revista 103

RESUMO

A murcha de fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), é uma importante doença para a cultura do tomate, sendo a utilização de cultivares resistentes a melhor estratégia para o controle desse patógeno. A transformação genética de plantas constitui instrumento biotecnológico essencial para o melhoramento, pela introdução de genes exógenos, manutenção das características originais da variedade e encurtamento do tempo para obtenção de uma nova cultivar. Um dos maiores obstáculos para a manutenção dessa resistência reside na busca de genes alvos envolvidos na defesa em plantas e monitoramento da variabilidade dos fitopatógenos. Assim, este estudo foi conduzido com o objetivo de determinar a variabilidade genética de diferentes isolados das três raças de *Fol*, mediante marcadores moleculares, caracterizar um gene diferencialmente expresso isolado de um genótipo resistente não comercial submetido ao ataque de fusário e de transferir, via transformação genética, esse gene para uma cultivar comercial sensível ao fungo. Analisando a variabilidade genética de isolados pertencentes às três raças de *Fol* utilizando marcadores moleculares RAPD e IGS, foi demonstrado que a raça 3 é distinta das demais raças, estabelecendo um agrupamento das raças 1 e 2. Devido ao fato das cultivares comerciais com resistência às raças 2 e 3 de *Fol*, ainda não estarem amplamente disponíveis, com o objetivo de identificar genes envolvidos em defesa, foi construída uma biblioteca de cDNA usando hibridização subtrativa supressiva (Suppressive Subtractive Hybridization, SSH) a partir de um genótipo resistente (genótipo BRH) desafiado com a raça 2 de *Fol*. Dentre os genes identificados, uma quitinase (*SolChi*) foi selecionada para verificar respostas no nível da expressão gênica das plantas BRH submetidas à inoculação com a raça 2 de *Fol*, utilizando a técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR), em que a normalização da expressão desse gene foi feita a partir da expressão do fator de alongação $\alpha 1$ (EF-1 α) de tomate, classificado como gene *housekeeping*. Observou-se o aumento da expressão do gene *SolChi* após 24 horas da inoculação do fitopatógeno em tecido radicular quando comparado com as plantas controles. O gene *SolChi* foi transferido para a cultivar comercial Santa Clara, sensível à murcha de fusário, por transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe EHA 105, sob o controle do promotor 35S de CaMV duplicado, superexpressando esse gene. Mudanças transgênicas (T0) foram confirmadas por PCR, usando primers específicos, para o transgene e a frequência de transformação obtida foi de 7%. A transformação e transcrição dos transgenes foram confirmadas em T1 por PCR e transcrição reversa-PCR (RT-PCR) respectivamente. A resistência ao patógeno será, posteriormente, avaliada pela inoculação de isolado da raça 2 de *Fol* em plantas mantidas *in vivo*. Isolado da raça 2 de *Fol* induz a expressão diferenciada do gene de *SolChi* em raízes de tomateiro genótipo BRH, sugerindo uma possível participação no mecanismo de defesa do tomateiro contra o fusário, indicando um importante alvo para programas de melhoramento, em que também faz-se necessário o estudo constante da variabilidade genética do patógeno.

Palavras-chave: tomate, fusariose, marcador molecular, transformação genética, quitinase, PCR em tempo real.

ABSTRACT

Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) is an important disease in tomato crops and the use of resistant cultivars is the best strategy to control this pathogen. The genetic transformation of plants is an essential biotechnological tool for breeding by the introduction of exogenous genes, maintaining of original characteristics of the variety and shortening the time required to obtain a new cultivar. One of the biggest obstacles to maintaining this resistance is the search for target genes involved in plants defense and monitoring the variability of phytopathogens. Thus, this study was conducted to determine the genetic variability of different isolates of the three *Fol* breeds by molecular markers, characterize a differentially expressed gene isolated from a non-commercial resistant genotype use submitted to attack by *Fusarium* and transfer via gene transformation, this gene to a commercial cultivar sensitive to the fungus. By analyzing the genetic variability of isolates belonging to the three races of *Fol* using RAPD and IGS molecular markers, it was demonstrated that race 3 is distinct from other races, establishing a group of races 1 and 2. Due to commercial cultivars with resistance to races 2 and 3 of *Fol* are not yet widely available, with the aim at identifying genes involved in defense, it was constructed a cDNA library using suppressive subtractive hybridization (SSH) from a resistant genotype (BRH genotype) challenged with race 2 of *Fol*. Among the identified genes, a chitinase (*SolChi*) was selected to check for responses at the level of gene expression of BRH plants submitted to inoculation with race 2 of *Fol*, using the real-time PCR technique (qRT-PCR), in which the normalization of this gene expression was made from the expression of $\alpha 1$ elongation factor (EF-1 α) of tomato, classified as housekeeping gene. It was observed increased expression of the gene *SolChi* after 24 hours of phytopathogen inoculation in root tissue compared to control plants. The *SolChi* gene was transferred to the commercial cultivar Santa Clara, sensitive to fusarium wilt, for genetic transformation via *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA 105, under the control of the duplicated CaMV 35S promoter overexpressing this gene. Transgenic seedlings (T0) were confirmed by PCR using specific primers for transgene and the transformation frequency obtained was 7%. The transformation and transcription of transgenes were confirmed in T1 by PCR and reverse transcription-PCR (RT-PCR) respectively. The resistance to the pathogen will then be evaluated by inoculating isolate of race 2 of *Fol* in plants growing in vivo. Isolate of race 2 of *Fol* induces differential expression of *SolChi* gene in tomato roots BRH genotype, suggesting a possible participation on the defense mechanism of tomato crops against *Fol*, indicating an important target for breeding programs, which also makes necessary the constant study on the pathogen's genetic variability.

Keywords: Tomato, Fusarium wilt, molecular marker, genetic transformation, chitinase, real-time PCR.

LISTA DE FIGURAS

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	14
FIGURA 2	Esquema do ciclo da murcha de fusário do tomateiro causada pelo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .	17
FIGURA 3	Sintomas causados pelo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> . a- Amarelecimento do tomateiro; b- Corte longitudinal do caule.	18
FIGURA 4	Representação esquemática da ação do SYBR Green na molécula de DNA.	23
FIGURA 5	Alterações metabólicas em plantas provocadas por patógenos. Legenda: E = eliciador; R = receptor; CY = ciclo de Yang; SOD = superóxido dismutase; RET = receptor do etileno; PL = peroxidação de lipídeos; CTR 1 = proteína quinase ligada ao RET; AS = ácido salicílico; AJ = ácido jasmônico; RH = reação de hipersensibilidade; CAT = catalase; FAL = fenilalanina amônia-liase; PFO = polifenoloxidase.	25
FIGURA 6	Clivagem de enzimas quitinolíticas. As subunidades da cadeia de quitina são mostradas em azul claro. Abaixo possíveis produtos formados pela ação da clivagem de quitinases.	29
FIGURA 7	Esquema do processo infeccioso, mostrando todos os passos da transferência do DNA da bactéria para a planta hospedeira.	31
CAPÍTULO 1		
FIGURE 1	Amplified RAPD fragments of the races of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> with primers OPB07, OPA08, OPA 18, OPA 20. M, marker 100 bp; R1, race 1, R2, race 2, R3, race 3. Circles indicate polymorphic RAPD markers.	61
FIGURE 2	Dendrogram obtained by UPGMA method, based on the Simple Matching coefficient, having been used 79 RAPD fragments detected in three races of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .	62
FIGURE 3	IGS-RFLP profiles after digestion on Hinf-I-Rsa I, Alu I and Hae III. Line 1 M, marker (1kb), R1, race 1, R2 race 2 and R3 race 3.	63
FIGURE 4	Phylogram based on the IGS region of the three races of <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> using the neighbor-joining method with the software MEGA4. The numbers on the branches indicate the bootstrap test values (1000 resamplings).	63
CAPÍTULO 2		
FIGURE 1	Analysis of the SolChi gene in the tomato plants genomic DNA. Panel (A) agarose gel electrophoresis. (B) Autoradiographed Hybridized membrane. Genomic DNA was digested with restriction enzymes BamHI (1), EcoRI (2), HindIII (3), KpnI (4), PstI (5), XbaI (6), (M) molecular weight marker in Kb. As probe we used the cDNA fragment of 550 bp. Hybridization was proceeded with the kit ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection Systems (Amersham Biosciences). The numbers on the left of the gels represent the size in Kb.	78
FIGURE 2	Real-time PCR analysis of <i>SolChi</i> gene expression in tomato inoculated with race 2 of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i> . EF-1a gene was chosen as an endogenous control. Data represent the average of three independent experiments with standard errors.	79

CAPÍTULO 3

FIGURA 1	Diferentes estágios de desenvolvimento do tomate transgênico através da regeneração mediada por cotiledono; a. explantes cotiledonares Co-cultivados; b. Explante em regeneração; c. folhas regeneradas; d. Enraizamento contendo as raízes secundárias e terciárias; e. mudas transgênicas cultivadas em vaso.	95
FIGURA 2	Padrão da eletroforese do vetor TOPO TA . M-Marcado de peso molecular 1 kb ladder; 1- Fragmento de Chitinase próximo a 1000 bp.	96
FIGURA 3	Padrão da eletroforese do vetor Pbs-35s AMV NOS 2 e pCAMBIA 2300. M- Marcado de peso molecular 1 kb ladder; 1- Fragmento resgatado e purificado do vetor Pbs-35s AMV NOS 2 de aproximadamente 1200bp; 2- Fragmento resgatado e purificado do vetor pCAMBIA 2300 de aproximadamente 8600bp.	95
FIGURA 4	Representação esquemática do T-DNA presente no vetor Pbs-35 s Chi AMV NOS 2 utilizado para transformar folhas de tomate mediado por <i>A. tumefaciens</i> . Borda esquerda (BE), terminador 35S (35Ster), gene (npt II) que confere resistência à Canamicina, promotor 35S (35Spro), terminador (nost), cassete de expressão do gene Chitinase (<i>Chit</i>), vírus do mosaico da alfafa (AMV), promotor 35S duplicado (d35Spro), borda direita (BD). Setas representando primer's específicos utilizados para confirmação das plantas transgênica, primer's 35S AMV-F, NPT 470c; 35S AMV-F, tnos-R; 35S AMV-F, Chit-R.	97
FIGURA 5	Análises de PCR do tomate. M – Marcador de peso molecular (1 kb Ladder); linhas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11, 12 – plantas transgênicas	97
FIGURA 6	Análise das prováveis plantas transgênicas (T1) de tomate para a presença do gene de <i>quitinase</i> . M - marcador (1 kb), 1 controle positivo, 2–10 prováveis plantas transgênica.	98
FIGURA 7	Análise RT-PCR das prováveis plantas de tomate para a presença do gene de quitinase. M Marcador (1 kb), 1–10 plantas transgênicas, 11 cultivar Santa Clara convencional (Controle negativo).	98

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

TABELA 1	Relação das doenças e pragas que causam prejuízos à cultura do tomateiro.	15
-----------------	---	----

TABELA 2	Famílias de proteínas relacionadas à patogênese.	27
-----------------	--	----

CAPITULO 1

TABLE 1	RAPD primers selected for DNA amplification of races (1, 2 and 3) of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> with their base sequences, number of amplicons and detected polymorphism.	60
----------------	--	----

CAPITULO 2

TABLE 1	Sequences of oligonucleotides used in the RT-PCR and qPCR reactions	78
----------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado (“Amplified Fragments Length Polymorphism”)

CaMV- Vírus do mosaico da Couve-flor (“Cauliflower mosaic vírus”)

cDNA – DNA complementar ao mRNA

SolChi – Quitinase

Ct - Ciclo de detecção (“cycle threshold”)

DNA – ácido desoxiribonucleico

EF-1 α - fator de alongamento

f. sp. - forma specialis

Fol - *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*

ha - hectare

HR - Reação de hipersensibilidade (“hypersensitive respons”)

IGS – espaço intergênico (“intergenic spacer”)

ITS – espaço interno transcrito (“internal transcribed spacer”)

ng – nanograma

nptII – Neomicina Fosfotransferase II (“neomycin phosphotransferase II”)

°C – graus Celsius

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction”)

Proteína-RP – Proteína relaciona à patogênese

qRT-PCR – PCR quantitativo em tempo real (“quantitative Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction”)

RAPD – polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (“random amplified polymorphic DNA”)

rDNA – DNA ribossômico

RFLP – polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (“restriction fragment length polymorphism”)

RNA – ácido ribonucleico

rRNA - RNA ribossômico

RT-PCR - Transcriptase reversa-PCR

SAR - Resistência Sistêmica Adquirida (“Systemic Acquired Resistance”)

SSH - hibridização subtrativa por supressão (“Suppression Subtractive Hybridization”)

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tomaticultura

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.), originário da América do Sul, é cultivado em quase todo o mundo, e sua produção global duplicou nos últimos 20 anos. Um dos principais fatores para a expansão da cultura é o crescimento do consumo. O tomate é um alimento funcional devido aos altos teores de vitaminas A e C, além de ser rico em licopeno, substância que ajuda na prevenção de cânceres relacionados ao aparelho digestivo (CARVALHO, 2007).

O tomateiro é uma dicotiledônea pertencente à família *Solanaceae* (FILGUEIRA, 2003) e atualmente ao gênero *Solanum*. Essa nomenclatura foi alterada recentemente devido a trabalhos filogenéticos utilizando sequência de DNA que têm mostrado uma alta correlação genética entre *Lycopersicon esculentum* (antigo nome) e espécies do gênero *Solanum*, sendo assim reclassificado como *Solanum lycopersicum* L.. (PERALTA; SPOONER, 2000; PERALTA; SPOONER, 2001; SPOONER et al., 2003; SPOONER et al., 2005; PERALTA et al., 2006).

O maior produtor mundial de tomate é a China, seguida dos Estados Unidos e da Índia. Atualmente o Brasil ocupa o nono lugar no *ranking* da produção mundial (FAO, 2011). Segundo Figueira (2000), o tomate é o segundo produto olerícola cultivado no mundo, sendo superado apenas pela batata, desempenhando importante papel na economia.

A produção de tomate no Brasil, em 2009, alcançou 4,3 milhões de toneladas numa área plantada em torno de 67.000 ha, sendo concentrada nos estados de Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Pernambuco (IBGE, 2011). No estado de Pernambuco, a tomaticultura é uma importante atividade agrícola, merecendo grande destaque pela geração de mão-de-obra e fixação do homem no campo, gerando uma receita estimada de R\$100 milhões no ano de 2009 (ANDRADE; MICHEREFF, 2000; IBGE – SIDRA, 2011). O principal pólo de produção de tomate industrial em Pernambuco se concentra no Vale submédio do São Francisco, enquanto, a produção de tomate de mesa no estado concentra-se na região Agreste. A produção para esses dois casos diverge desde as variedades escolhidas para o plantio até as formas de cultivo empregadas (CAMARGO et al., 2006).

O tomate é uma espécie profundamente estudada, tornando-se uma alternativa de modelo experimental utilizado em plantas, em relação à planta-modelo *Arabidopsis*

thaliana (MEISSNER et al., 1997), pois, além de possuir muitas das características vantajosas de *Arabidopsis*, apresenta algumas características diferenciadas como a produção de frutos suculentos, tem valor comercial elevado, sendo uma espécie importante no mercado de vegetais frescos, possui genoma diplóide e de pequeno tamanho (950 Mb) rico em características e marcadores mapeados (CAMPOS et al., 2010), passando a ser objeto de intensa investigação tais como: genômica funcional, proteômica e metabolômica (KHOUDI et al., 2009), além de ser utilizado como um excelente modelo de sistema de interação planta-patógeno (EMAMANUEL; LEVY, 2002; ARIE et al., 2007).

Seu cultivo é bastante sensível a problemas fitossanitários, estando sujeito ao ataque de mais de uma centena de doenças de causas bióticas (fungos, bactérias, vírus e nematoides) (Figura 1) e abiótica (seca, calor, frio, salinidade, entre outros), afetando e limitando a produção dessa hortaliça em todo o mundo (LOPES; ÁVILA, 2005). Algumas delas só podem ser controladas eficientemente quando é adotado um adequado programa de manejo integrado, que envolve o uso de variedades resistentes e a adoção de medidas de exclusão, erradicação e proteção (KUROSZAWA; PAVAN, 2005). Várias dessas doenças podem ocorrer ao mesmo tempo, resultando em grandes danos e prejuízos ao agricultor (Tabela 1).

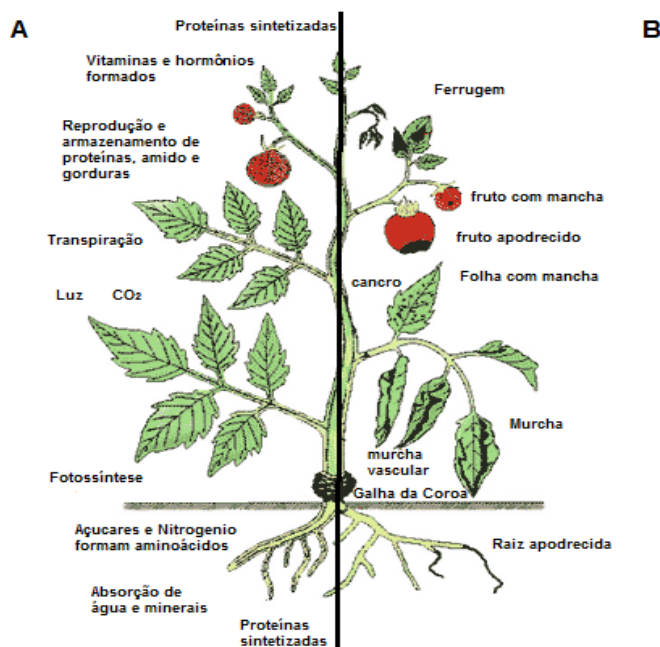


Figura 1: Esquema generalista de sintomas apresentados pelo tomateiro frente a doenças. Em A planta saudável, metabolismo básico funcionando normalmente; em B observa-se os principais sintomas presentes em muitas doenças vegetais. Fonte: adaptado de AGRIOS, 2005.

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> fsp. <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	Víroses 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
	Geminivíroses
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

Mais da metade das doenças do tomateiro são fúngicas, podendo infectar todos os órgãos da planta. Algumas das mais preocupantes atacam as plantas a partir do sistema radicular. Os agentes causais dessas doenças podem sobreviver no solo por longos períodos de tempo, sendo o controle químico e cultural muito difícil, o que pode limitar o plantio de tomate em determinadas áreas (JONES, 1991; DI PIETRO et al., 2003; LOPES et al., 2003; LOPES; REIS; BOITEUX, 2005)

O *Fusarium* pertence à classe *Hyphomycetes* da subdivisão *Deuteromycotina*, sendo o gênero *Fusarium* 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 (DOMSCH et al., 1980). A maioria das espécies de *Fusarium* é composta por fungos de solo com distribuição cosmopolita e ativo na decomposição de substratos celulósicos, sendo que alguns isolados são parasitas de plantas (DESJARDINS et al., 2000; LESLIE et al., 2001; ZEMANKOVA; LEBEDA, 2001).

Dentro do gênero *Fusarium* há uma série de variações nas características morfológicas e patogênicas, resultando em uma classificação complexa, dividida em seções, *formae speciales* e raças (OLIVEIRA; COSTA, 2002).

O conceito *formae speciales* foi aplicado por Snyder e Hansen (1953) para reconhecer isolados patogênicos que foram morfológicamente semelhantes a isolados saprofíticos de mesma espécie, mas que diferenciam em sua habilidade para parasitar hospedeiros específicos. Isolados patogênicos de *F. oxysporum* estão classificados dentro de mais de 120 *formae speciales* e raças.

A murcha de fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) (Snyder e Hansen), é uma doença que ocorre em todas as regiões onde o tomate é cultivado, podendo se manifestar em quaisquer estádios de desenvolvimento da planta, embora mais comum no início do florescimento e frutificação, sendo o tomate o único hospedeiro desse fungo de solo (KUROZAWA; PAVAN, 2005).

Em plantas saudáveis que se desenvolvem em solos contaminados, os tubos germinativos dos esporos ou o micélio penetram na raiz diretamente ou 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 ramifica e produz microconídios 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, a 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, morrerem, seguida de morte do resto da planta. O fungo, em seguida, invade todos os tecidos da planta extensivamente, atingindo a superfície da planta morta e esporula (Figura 2) (AGRIOS, 2005).

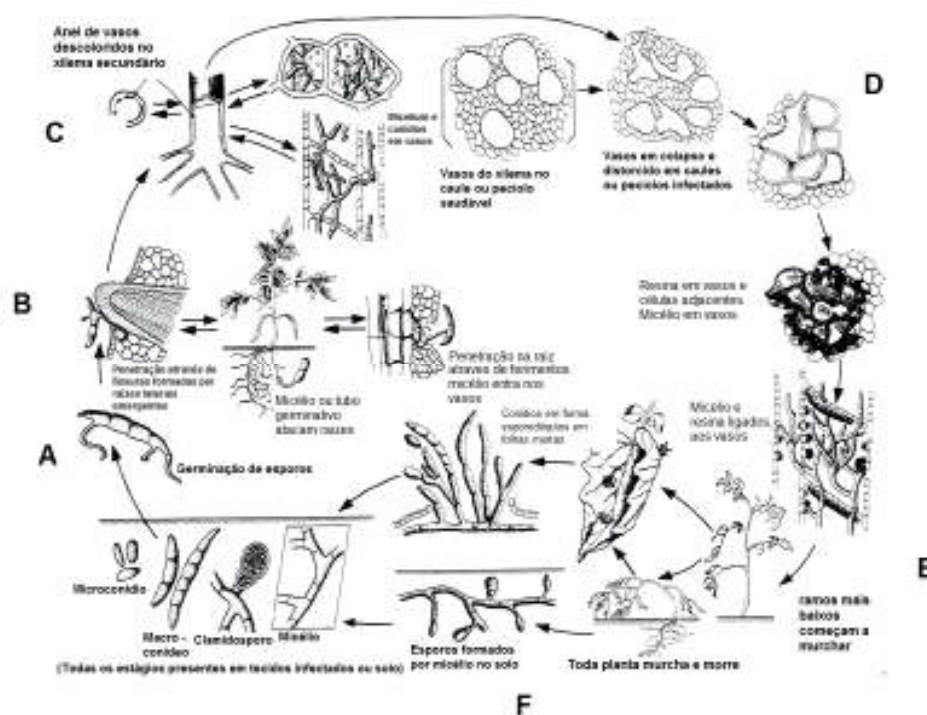


Figura 2: Esquema do ciclo da murcha de fusário do tomateiro causada pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. Fonte: adaptado de AGRIOS, 2005.

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 longitudinalmente, constata-se uma coloração

marrom típica acompanhando os vasos lenhosos (Figura 3), resultado da produção de substâncias químicas tóxicas, como o ácido fusárico (NELSON, 1981; BECKMAN 1987).



Figura 3 - Sintomas causados pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. a- Amarelecimento do tomateiro; b- Corte longitudinal do caule (AGRIOS, 2005).

O *Fol* é agrupado em três raças fisiológicas (1, 2 e 3, em ordem de descoberta) conforme as suas habilidades de infectar e causar doença em uma série de cultivares diferenciadoras, possuidoras de genes de resistência em diferentes *loci* (BOHN; TUCKER, 1940). No Brasil, o primeiro relato da raça 1 de *Fol* foi descoberto no estado de São Paulo (ARRUDA, 1941). Até 2005 não havia no país nenhum caso confirmado da raça 3, mas após um estudo realizado pela Embrapa ficaram comprovados os primeiros casos na região do Espírito Santo (REIS et al., 2005) e Rio de Janeiro (REIS; BOITEUX, 2007).

Em Pernambuco, em levantamentos realizados em 50 áreas de plantio de tomateiro da região Agreste, foi constatada a prevalência da murcha de fusário em 72% das áreas avaliadas, em muitos casos, causando destruição quase total das plantas ou reduzindo drasticamente o período de colheita (ANDRADE; MICHEREFF, 2000).

O fungo é disseminado a longas distâncias por sementes contaminadas, sendo o vento, a água e os implementos agrícolas são os principais responsáveis pela disseminação à curta distância. O desenvolvimento da doença é favorecido por temperaturas entre 21 a 33°C, sendo 28°C a temperatura ótima. Plantas cultivadas em

solos ácidos, pobres, com pouca água e deficientes em cálcio tendem a ser mais afetadas (AGRIOS, 2005).

Nenhuma medida de controle químico é efetiva e economicamente viável ao controle da furasiose em tomateiro (BLANCARD, 1996), sendo o uso de genótipos resistentes o único meio seguro e eficiente de controle da doença (KUROZAWA; PAVAN, 2005). Nas áreas onde a murcha de fusário ainda não está presente, o manejo pelo princípio da exclusão, visando o impedimento da entrada do patógeno na área de cultivo, é o mais importante (COSTA et al. 2007). Outras medidas também podem ser tomadas como: manipulação da fertilidade do solo (adicionar calcário para obter pH no mínimo 7,0; evitar o uso de micronutrientes; evitar o uso excessivo de fósforo e magnésio; usar nitrogênio na forma de nitrato, evitando a forma amoniacal; aplicar fertilizantes em bandas próximo às raízes e não diretamente na cova); impedir a drenagem de água de local infestado para novas áreas de plantio; permitir que o solo repouse antes do plantio; uso da rotação de culturas com plantas não hospedeiras por cinco a sete anos; prevenir a disseminação do patógeno eliminando o movimento de solo infestado, bem como o trânsito de máquinas, animais e operários de lavouras doentes para áreas livres da doença; eliminar os restos culturais diminuindo (VALE et al., 2004; ANDRADE; SOUZA; ASSIS, 2008/2009). Em áreas onde o patógeno já se encontra estabelecido, um dos métodos mais eficazes na redução de perdas causadas pelo fungo é o controle genético, pelo plantio de cultivares resistentes (REIS et al., 2005; SOUZA et al., 2010).

1.3 Técnicas moleculares para identificação de acesso da diversidade genética e análise da expressão gênica

Técnicas moleculares têm sido aplicadas na análise de genes específicos, bem como para aumentar a compreensão da ação gênica, gerar mapas genéticos e ajudar no desenvolvimento de tecnologias de transferência de genes. Essas técnicas também desempenham papéis importantes em estudos de filogenia e evolução das espécies, e têm sido aplicadas para aumentar a nossa compreensão da distribuição e da extensão da variação genética dentro e entre espécies. Ferramentas moleculares fornecem dados valiosos sobre a diversidade pela sua capacidade de detectar a variação ao nível do DNA. Essa identificação é de importância fundamental, pois para a avaliação da

diversidade de espécies, é essencial que os indivíduos possam ser classificados com precisão (MONDINI et al., 2009).

Marcadores moleculares podem ou não se correlacionar com expressão fenotípica de uma característica do genoma. Eles oferecem inúmeras vantagens em relação às alternativas convencionais, baseada em fenótipo, por serem estáveis e detectáveis em todos os tecidos, independentemente do crescimento do estado de diferenciação, do desenvolvimento ou defesa da célula (BENALI et al., 2011).

Os principais marcadores empregados em estudos de fitopatógenos incluem polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), espaço interno transcrito (ITS) e o espaço intergênico (IGS).

1.3.1 Marcadores RAPD

Os marcadores RAPD baseiam-se na amplificação via PCR de segmentos aleatórios de DNA, através de iniciadores (“primers”) pequenos, com cerca de dez nucleotídeos, e de sequência arbitrária com um conteúdo de G + C entre 50 e 70%. Os primers ligam-se às sequências complementares em fitas opostas do DNA alvo e ocorre a amplificação in vitro do segmento de DNA entre dois primers adjacentes, distanciados no máximo de 3 mil pares de bases, na presença da enzima Taq polimerase e de nucleotídeos (FRITSH; RIESEBERG, 1996).

Essa técnica tornou-se muito popular, principalmente, à sua acessibilidade tecnológica e seu baixo custo, podendo ser aplicada a um grande número de espécies. Ela é utilizada para detecção de polimorfismo genético, representado pelas diferenças em número ou comprimento das bandas entre isolados, decorrentes da diferença em número e localização de sítios de ligação no DNA (SWENSEN, 1995). Este método requer pouco material genômico para a amplificação do DNA (10-25 ng DNA/reação). Em adição, o RAPD é um método relativamente fácil e que requer prévio conhecimento da sequência de nucleotídeo.

Um dos primeiros trabalhos onde o método RAPD foi usado descreve a comparação de 21 isolados de *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*, raças 1 e 2 (CROWHURST et al., 1991). Os dois principais grupos de isolados diferenciados pelo método correspondiam a populações com fatores sexuais distintos, e o DNA produzido pelo PCR servia como sonda para identificar as referidas populações. Diversos estudos

têm utilizado essa técnica na avaliação da diversidade genética de isolados de fungos fitopatogênicos (MONGA et al. 2004; TANYOLAÇ, AKKALE, 2010; SUNDRAVADANA; THIRUMURUGAN; ALICE, 2011).

1.3.2 Marcadores RFLP-IGS

Estudos comparativos das sequências de nucleotídeos de genes do RNA ribossomal (rRNA) fornecem os meios para analisar as relações filogenéticas em uma ampla faixa de níveis taxonômicos. Os rDNA nos eucariotos estão presentes repetidas vezes, e cada unidade consiste de regiões codificadas para os genes rRNA 18S, 5.8S e 28S, e dois espaços internos (ITS 1 e ITS 2) que separam essas regiões. Cada unidade do rDNA é separada por um espaço intergênico (IGS). As regiões rDNA 18S e 28S são muito conservadas e podem ser utilizadas para diferenciação em nível de gênero e espécie (GOMES et al., 2002). Por outro lado, as regiões espaçadoras ITS e IGS acumulam mais variabilidade, sendo mais utilizadas na diferenciação de espécies ou entre linhagens da mesma espécie (OTERO et al, 2004).

Para a identificação de espécies de fusário, as características morfológicas são muitas vezes utilizadas, no entanto às vezes é difícil e requer considerável experiência. Portanto, abordagens moleculares, tais como: combinação de PCR (reação da Polimerase em Cadeia) e análise de restrição (RFLP) são amplamente utilizadas em estudos taxonômicos de fusário (HSUAN et al., 2010). RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism) é uma técnica em que os organismos podem ser diferenciados pela análise de padrões derivados da clivagem do seu DNA. Se dois organismos diferirem na distância entre os sítios de clivagem de uma endonuclease de restrição, o comprimento dos fragmentos produzidos vai diferir quando o DNA for digerido com uma enzima de restrição. As sequências da região espaçadora intergênica (IGS) têm sido usadas para refinar os dados gerados por RFLP em cepas de *F. oxysporum* patogênicas e não patogênicas (BALOGUN, 2007; SRINIVASAN et al. 2010; BAYONA et al. 2011). De acordo com Balogun (2007), a região IGS ribossomal pode ser considerada representativa o suficiente para ser usada na comparação de raças 1, 2 e 3 de (*Fol*).

1.3.3 PCR em tempo real (qRT-PCR)

Diferentes técnicas de análise de expressão gênica a partir de cDNA tem sido utilizadas para identificar genes que são diferencialmente na interação planta-patógeno. Estas análises têm permitido o isolamento de muitos genes de função ainda desconhecida; estudos ainda estão sendo conduzidos para se determinar como as proteínas codificadas por estes genes agem durante o estresse biótico (WANG et al., 2009).

Diversas técnicas vêm sendo empregadas para identificar os genes cuja expressão é diferencialmente regulada em resposta a estresses causados por patógenos. Tais métodos incluem a análise diferencial em reação de cadeia de polimerase (DD-PCR – differential display PCR), construção de bibliotecas subtrativas por hibridização (SSH – suppression subtractive hybridization), análise serial da expressão gênica (SAGE), chips de DNA e microarranjos, e AFLP (cDNA amplified fragment length polymorphism) (DIATCHENKO et al., 1996; SOARES, 1997).

Tais técnicas, apesar de oferecem dados importantes sobre perfis transcricionais, carecem de estratégias complementares mais acuradas no sentido de validação dos genes obtidos (GIULIETTI et al., 2001). Neste sentido, a invenção da PCR em tempo real (qRT-PCR) revolucionou o campo das análises de expressão gênica. Esta técnica é extremamente sensível, específica (JAIN et al., 2006).

A técnica de PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qRT-PCR) foi desenvolvida com o objetivo de estimar o número de cópias de um gene de interesse pela amplificação convencional de DNA ou cDNA, enquanto a detecção e monitoramento dos produtos de amplificação usando uma sequência de primer específico são feitos ao longo dos ciclos em tempo real, baseado na emissão e quantificação de um sinal fluorescente captado por um sistema óptico que é convertido em dados no software ligado ao aparelho (LIE; PETROPOULOS, 1998; GINZINGER, 2002; MACKAY, 2004; McKILLIP; DRAKE, 2004; NOVAIS; ALVES, 2004; WONG; MEDRANO, 2005).

A PCR em tempo real apresenta vantagens como: alta sensibilidade, menor tempo de análise, risco reduzido de contaminação e a possibilidade de automatizar a quantificação e o processamento de uma amostra (ROSSMANITH et al., 2006; ORAVCOVÁ; KUČHTA; KACLÍKOVÁ, 2007; LAMBERTZ et al., 2008).

Segundo Wong e Medrano (2005), a curva obtida na PCR-RT pode ser dividida em quatro fases: a) linear, b) exponencial inicial, c) logarítmica-linear e d) platô. A fase linear corresponde aos primeiros 10 a 15 ciclos, nos quais a fluorescência emitida não é suficiente para atingir o limiar de detecção (threshold line). Quando a emissão supera o limiar de detecção, inicia-se a fase exponencial inicial e então fica estabelecido o ciclo de detecção (cycle threshold - Ct), ou seja, o número de ciclos necessários para que essa detecção ocorra.

A fase logarítmica linear é caracterizada pelo aumento exponencial no sinal fluorescente emitido até que, por limitação dos componentes da reação, o sinal se torna constante (fase platô).

O valor do Ct é inversamente proporcional ao número de cópias do DNA alvo, ou seja, quanto maior a concentração do material genético na amostra, menor será o número de ciclos necessários para atingir o Ct (ciclo de detecção) (MOCELLIN et al., 2003).

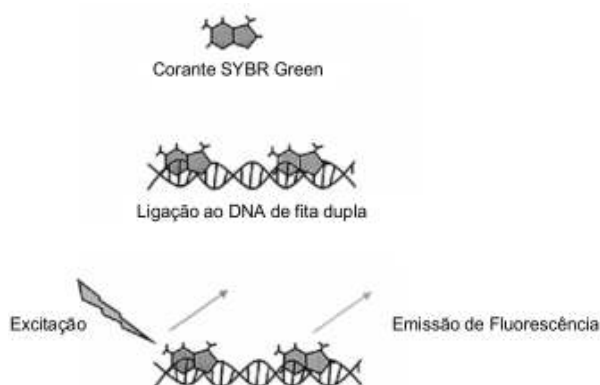


Figura 4 - Representação esquemática da ação do SYBR Green na molécula de DNA (GINZINGER, 2002).

A qRT-PCR baseia-se na detecção da fluorescência que é gerada por uma molécula repórter (fluoróforo) que aumenta enquanto a reação ocorre. Isso acontece devido ao acúmulo do produto de PCR em cada ciclo de amplificação (ORLANDO et al., 1998; WONG; MEDRANO, 2005).

Uma variedade de fluoróforos e sondas podem ser utilizados na detecção e quantificação por qRT-PCR, como o corante intercalante SYBR Green e as sondas Taqman, Beacons e Scorpions (GIULIETTI et al., 2001; GINZINGER, 2002; MACKAY, 2004). O SYBR Green é um corante que possui a capacidade de se intercalar à dupla fita de DNA e emitir fluorescência, quando excitado, em proporção

direta com a quantidade do produto final de cada amplificação (Figura 4) (DHAR; ROUX; KLIMPEL, 2001; GIULIETTI et al. 2001; BURGOS et al., 2002). Esse corante apresenta vantagem por poder ser utilizado com qualquer conjunto de primers e DNA, diminuindo os custos para a realização do método, entretanto, a falta de especificidade faz com que ele seja capaz de se ligar a produtos não específicos da reação e dímeros de primers (GIULIETTI et al., 2001).

As reações de qRT-PCR são realizadas com três repetições e o cálculo mais utilizado é pelo método $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), onde C_t é definido como o número de ciclos necessários para alcançar o limiar de detecção de fluorescência. Os níveis de expressão R foram calculados da seguinte forma: $R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde $\Delta\Delta C_t$ é igual a $(\Delta C_t \text{ da amostra} - \Delta C_t \text{ do calibrador}) = [(C_t \text{ da amostra} - C_t \text{ do housekeeping gene}) - (C_t \text{ do calibrador} - C_t \text{ do housekeeping gene})]$.

Há poucos estudos utilizando o qRT-PCR para avaliar a expressão dos genes de interação microrganismo-planta. A maioria dos trabalhos avalia os genes da planta em resposta a um microrganismo patogênico, sendo que é mais estudada a interação com fungos patogênicos como *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, agente causal da ferrugem do trigo (WANG et al., 2010), *Sclerotinia sclerotiorum* que causa podridão em canola (WANG et al., 2009) e *Pyrenophora teres* patógeno de cevada, causando mancha reticular (BOGACKI; OLDACH; WILLIAMS, 2008), por exemplos.

1.4 Genes de resposta de defesa em plantas

As plantas sofrem constantemente estresse biótico causado por doenças e/ou pragas e abiótico causados por mudanças climáticas, salinidade, entre outros e por isso desenvolvem diferentes meios para se defenderem dos mesmos, sendo eles estruturais, como ceras, cutícula, tricomas, bem como substâncias químicas envolvidas no processo de defesa da planta. Essas substâncias, como flavonóides, glicosídeos cianogênicos e inibidores protéicos são encontradas em altas concentrações antes da chegada do patógeno e são ativadas ou aumentam o nível de compostos pré-existentes após a infecção pelo patógeno. Esses mecanismos estão envolvidos na formação de barreiras estruturais, tais como halo, papila, camada de cortiça, lignificação, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, bem como na síntese de compostos que funcionam como barreiras bioquímicas, como espécies reativas de oxigênio, proteínas relacionadas à patogênese

(proteínas-RP) e fitoalexinas (Figura 5) (AGRIOS, 2005; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

O reconhecimento do patógeno por parte da planta é dado por meio de um eliciador, que, segundo Terry e Joyce (2004), é uma molécula ou um agente físico capaz de estimular a resposta de defesa das plantas. Essa ativação é um tipo de resistência em plantas que é conhecida como Resistência Sistêmica Adquirida (SAR).

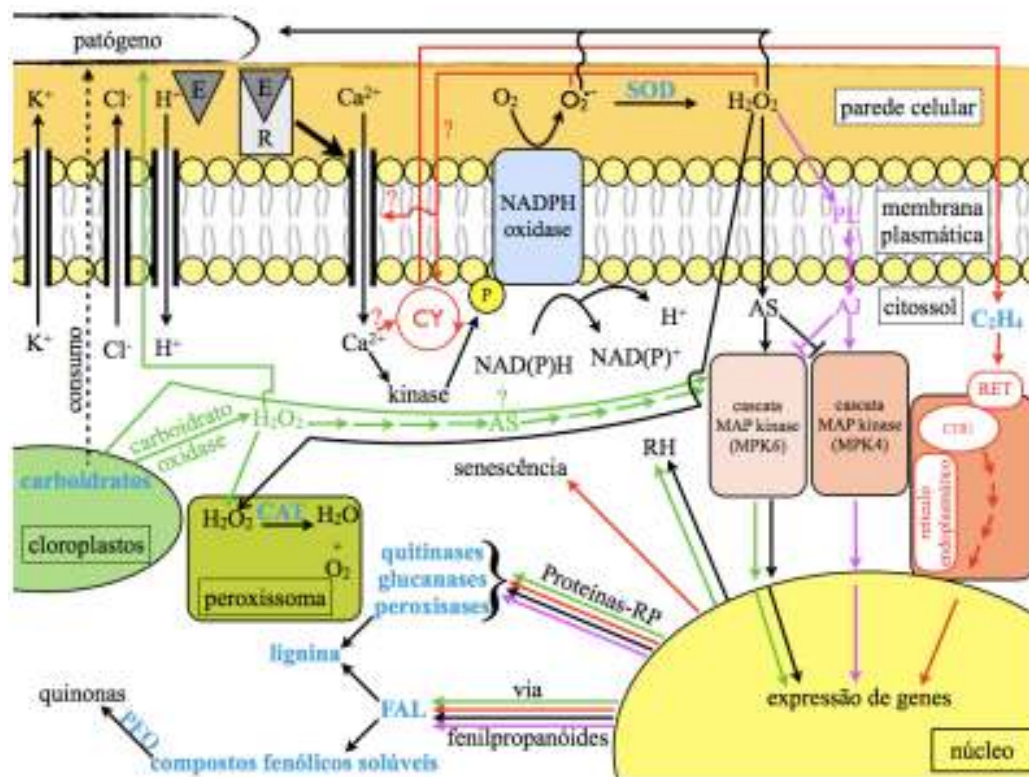


Figura 5 - Alterações metabólicas em plantas provocadas por patógenos. Legenda: E = eliciador; R = receptor; CY = ciclo de Yang; SOD = superóxido dismutase; RET = receptor do etileno; PL = peroxidação de lipídeos; CTR 1 = proteína quinase ligada ao RET; AS = ácido salicílico; AJ = ácido jasmônico; RH = reação de hipersensibilidade; CAT = catalase; FAL = fenilalanina amônia-liase; PFO = polifenoloxidase (BOSTOCK, 2005).

A resposta hipersensitiva (HR) ou reação de hipersensibilidade em plantas é considerada como um dos principais eventos da resposta de defesa da planta contra o ataque de patógenos envolvendo sucessivos eventos e sinais, caracterizando-se por ser uma resposta rápida, com localizado colapso do tecido vegetal ao redor do sítio de infecção do patógeno, ocasionado pela liberação de compostos tóxicos, os quais também atuam, em alguns casos, diretamente sobre o patógeno, ocasionando sua morte (AGRIOS, 2005).

Para que ocorra a SAR, a infecção inicial precisa resultar na formação de lesões necróticas, decorrentes da HR (acúmulo de peróxido de hidrogênio) ou como sintoma

da doença (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000). Posteriormente, essa resistência passa a ocorrer em locais da planta distantes do local da infecção pelo patógeno caracterizando, assim, o mecanismo da SAR que deve envolver uma cascata de eventos e sinais, levando a uma alteração no metabolismo celular, enviando sinais moleculares dirigidos para outras partes da planta, atuando de forma inespecífica, promovendo a redução da severidade da doença (PENG et al., 2003; DURRANT; DONG, 2004; AGRIOS, 2005).

Dentre as principais alterações decorrentes da HR está a indução da produção de um grande número de proteínas solúveis, que são conhecidas como proteínas-RP destacando-se as peroxidases, quitinases e β -1,3-glucanases (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999; VERBENE et al., 2000; GAULIN et al., 2002; FERNANDES, 2004; AMARAL et al., 2008).

1.4.1 Proteína-RP

O termo proteínas-RP foi primeiramente utilizado para descrever numerosas proteínas extracelulares que se acumulavam em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) infectadas com o vírus do mosaico do fumo (TMV) (VAN LOON; VAN KAMMEN, 1970). Bowles (1990) ampliou essa definição, incluindo proteínas localizadas intra e extracelularmente que se acumulavam em tecidos vegetais intactos ou em cultura de células após o tratamento com elicitores ou ataque de patógenos. Algumas dessas proteínas-RP encontram-se expressas, embora em baixos níveis, de forma constitutiva em plantas, ou seja, sob condições normais. Entretanto, seus níveis são aumentados quando as plantas são submetidas a condições de estresses. Há outras que, embora não sejam detectadas em condições fisiológicas normais, têm seus genes correspondentes ativados, vindo a ser detectadas nos tecidos vegetais após o ataque de patógenos e/ou pragas ou sob condições de estresses ambientais do tipo salinidade, seca e baixas/altas temperaturas (MARTINS-MIRANDA, 2002). A indução dessas proteínas é mediada pela ação de substâncias sinalizadoras que são classificadas em dois tipos, conforme sua origem: elicitores endógenos, da própria planta, e elicitores exógenos do patógeno (WYATT et al., 1991; REPKA, 1996; VAN LOON; VAN STRIEN, 1999; L ATUNDE-DADA; LUCAS, 2001; CHRISTENSEN et al., 2002; FERNANDES et al., 2006; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

Muitas proteínas-RP possuem tanto atividade antifúngica como atividade antibacteriana *in vitro* como, por exemplo, quitinases, glucanases e proteínas que se ligam à quitina, tendo uma função lisozímica sobre a parede celular. A degradação de polissacarídeos estruturais da parede celular de fungos ou alterações na sua arquitetura, promovidas por essas enzimas, podem prejudicar o desenvolvimento do microrganismo, impedindo seu crescimento (ZAREIE et al., 2002).

Atualmente, as proteínas-RP estão classificadas em 17 grupos, variando de RP-1 até RP-17, de acordo com suas estruturas e atividades biológicas. características de cada proteína (Tabela 2) (CHRISTENSEN et al., 2002; VAN LOON; REP; PIETERSE; 2006; XIE et al., 2010). Elas apresentam algumas características que as distinguem das

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	Quitinase	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 _{6g} 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.

demais proteínas vegetais, tais como estabilidade em pH baixo, resistência à ação de proteases ácidas, estabilidade sob altas temperaturas, podendo ser localizadas no vacúolo, parede celular, e apresentam massa molecular variando entre 8 e 50 kDa (STINTZI et al., 1993; MARTINS, 2008). Estão localizadas na epiderme de folhas, mesófilos, células-guarda de estômatos, tricomas glandulares, vasos condutores e em

zonas de abscisão (VAN LOON; REP; PIETERSE; 2006). Elas são produzidas apenas em células sadias adjacentes ao local de infecção, podendo acumular em locais distantes, em resposta a ativação da SAR (DELANEY, 1997; RYALS et al., 1996).

1.4.2 Quitinases

As quitinase (EC 3.2.1.14), são proteínas-RP que pertencem às famílias RP-3, 4, 8 e 11 que hidrolisam polímeros de quitina, atuando diretamente nas células fúngicas, liberando fragmentos de oligossacarídeos da parede celular e, podendo elicitar respostas secundárias de defesa das (VAN LOON; VAN STRIEM, 1999; CAVALCANTI et al., 2006). A diferença existente entre essas classes de quitinases é a especificidade para com o substrato que elas hidrolisam, bem como suas propriedades físicoquímicas (KASPRZEWKA, 2003). As quitinases da família RP-8, por exemplo, apresentam atividade de lizosima, ou seja, agem sobre bactérias. As quitinases que apresentam atividade sobre quitosana são classificadas na família RP-11 (MARTINS, 2008).

Com base na sequência de aminoácidos, as quitinases estão classificadas nas famílias 18, 19 e 20 das enzimas hidrolíticas e, as quitinases de plantas, estão agrupadas em sete classes. A família 18 inclui as quitinases de bactérias, vírus e eucariotos, como artrópodes, protozoários, nematódeos, humanos e fungos e as classes III e V de plantas. A família 19 é composta por enzimas das classes I, II, IV, VI, VII de plantas e actinomicetos. A família 20 agrupa quitinases de bactérias, actinomicetos e humanos (DAHIYA et al., 2006; SHIROTA et al., 2008).

As quitinases estão presentes em organismos que apresentam a quitina em sua estrutura, como insetos, crustáceos, leveduras e fungos, tendo em vista que a enzima é necessária para desenvolvimento e crescimento desses indivíduos, mas também está presente em organismos que não apresentam quitina na sua constituição, como bactérias, plantas e vertebrados (PATIL et al., 2000; TAIRA et al., 2002; WEN et al., 2002; KASPRZEWKA, 2003).

As quitinases hidrolizam a quitina. A quitina é definida como um polímero de N-acetil-D-glucosamina com ligações β -1,4 e é encontrada embebida numa matrix de fibras de glucana com proteínas e carboidratos. A atuação das quitinases está principalmente na quebra das ligações β -1,4 dos polímeros de N-acetil-D-glucosamina, um dos principais componentes da parede celular dos fungos. As quitinases são classificadas em duas categorias: endoquitinases e exoquitinases. As endoquitinases

clivam aleatoriamente a quitina, gerando polímeros ou oligômeros de NAcGlc, como a quitotetraose, a quitotriose e a di-acetilquitobiose (SAHAI; MANOCHA, 1993). As exoquitinases são divididas dentro de duas sub-categorias: as quitobiosidases (HARMAN et al., 1993), que atuam liberando unidades de di-acetilquitobiose a partir da extremidade não-redutora da quitina, e as 1,4- β -N-acetilglicosaminidases, que clivam oligômeros produzidos pela atividade de endoquitinases e quitobiosidases, liberando monômeros de NAcGlc (Figura 6) (KRAMER; KOGA, 1986; SAHAI; MANOCHA, 1993; REYNOLDS; SAMUELS, 1996).

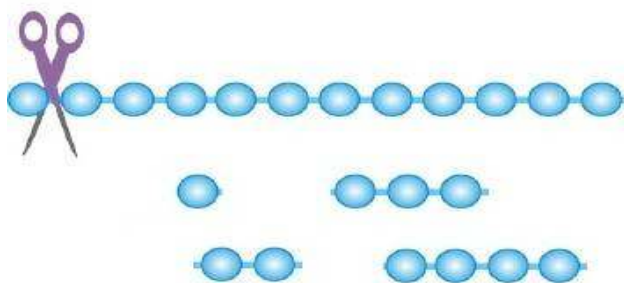


Figura 6: Clivagem de enzimas quitinolíticas. As subunidades da cadeia de quitina são mostradas em azul claro. Abaixo possíveis produtos formados pela ação da clivagem de quitinases. Fonte: Adaptado de SEIDL, 2008.

As quitinases representam hidrolases antifúngicas, as quais atuam para inibir o crescimento fúngico, pela degradação das hifas invasoras, e ainda podem atuar como elicitores de defesa do hospedeiro (GIL-AD et al., 2001; SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007; SCHWANESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

Experimentos envolvendo plantas que superexpressaram quitinases mostraram que folhas de cacaueiro e de plantas de fumo transgênicas eram mais resistentes a *Colletotrichum gloeosporioides* e a *R. solanacearum*, respectivamente, do que as linhagens selvagens (DANA; PINTOR-TORO; CUBERO, 2006; MAXIMOVA et al., 2006). Além disso, diversos trabalhos mostram que *Phytophthora* spp. induziram o aumento da atividade de quitinases em plantas (SCHRODER; HAHLBROCK; KOMBRINK, 1992; YI; HWANG, 1996). Kuhn (2007) verificou aumento significativo de quitinase quando as plantas de feijão foram tratadas com acibenzolar-S-metil. É importante lembrar que, por serem hidrolases de parede de fungos, as quitinases e as glucanases podem apresentar efeito antifúngico sinérgico (MARTINS, 2008).

1.5 Transformação genética de plantas para resistência a doenças

Ao gênero *Agrobacterium* pertencem bactérias de solo, Gram-negativas e, na maioria, fitopatogênicas, que induzem doenças em tecidos vegetais injuriados. Mais de 600 espécies vegetais são susceptíveis à infecção por *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes*, sendo a maior parte delas dicotiledôneas.

Na transformação genética de plantas via *A. tumefaciens*, ocorre a transferência de um T-DNA (transferred DNA), em que são inseridos os genes de interesse (ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO, 2003). Porém, para que esse gene seja expresso na planta transformada é imprescindível que este esteja sob controle de um promotor.

A maioria das construções gênicas utilizadas nas transformações em tomate possui o gene de interesse dirigido pelo promotor constitutivo 35S, obtido do vírus do mosaico da couve-flor (Cauliflower mosaic virus - CaMV) (ABU-EL-HEBA; HUSSEIN; ABDALLA, 2008; YASMEEN, 2009; VAN; FERRO; JACOBSEN, 2010). Esse promotor é caracterizado pela forte expressão nos tecidos das plantas, não apresentando especificidade. O uso de promotores que confiram expressão induzida por patógeno ou que sejam tecido-específicos, está ligado à necessidade de obter construções com maior especificidade de expressão (SAKER et al., 2008; SARKER; ISLAM; HOQUE, 2009; ABDALLAH et al., 2010).

A T-DNA ou região-T, é a única parte do plasmídeo transferida para a célula vegetal. Os limites do T-DNA são definidos por 25 pb diretamente repetidos em cada extremidade, e definem a porção do plasmídeo que será transferida (VAN SLUYS, 1999). A região responsável pelo processo de transferência é denominada de região de virulência (*vir*). Essa região é ativada por compostos fenólicos liberados pelos tecidos vegetais lesados, iniciando o processo de transferência do T-DNA para a célula vegetal (STACHEL et al., 1985; VAN SLUYS, 1999).

O processo de transferência do T-DNA pode ser dividido em duas etapas: uma etapa bacteriana e uma etapa vegetal. A etapa bacteriana inclui eventos que levam à produção e exportação de um vetor funcional, contendo a informação genética do T-DNA. A etapa vegetal inclui o reconhecimento entre a *Agrobacterium* e a célula hospedeira, a transdução de sinais vegetais de patogênese e a ativação dos genes *vir* (Figura 7) (TINLAND, 1996; ANDRADE, SARTORETTO, BRASILEIRO, 2003).

Os hormônios vegetais sintetizados, auxinas e citocininas, induzem um desbalanço hormonal, que tem como consequência uma multiplicação descontrolada das células transformadas, assim como das células vizinhas, resultando na formação do tumor. A formação de tumores resulta de um processo natural de transferência de genes entre a agrobactéria e a célula vegetal (BRASILEIRO; DUSI, 1999). Na literatura estão disponíveis revisões bastante completas sobre o processo biológico da infecção de plantas por *Agrobacterium* e a consequente transferência de DNA bacteriano para o genoma vegetal (SHENG; CITOVSKY, 1996; DE LA RIVA et al., 1998; GELVIN, 2003; ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO, 2003).

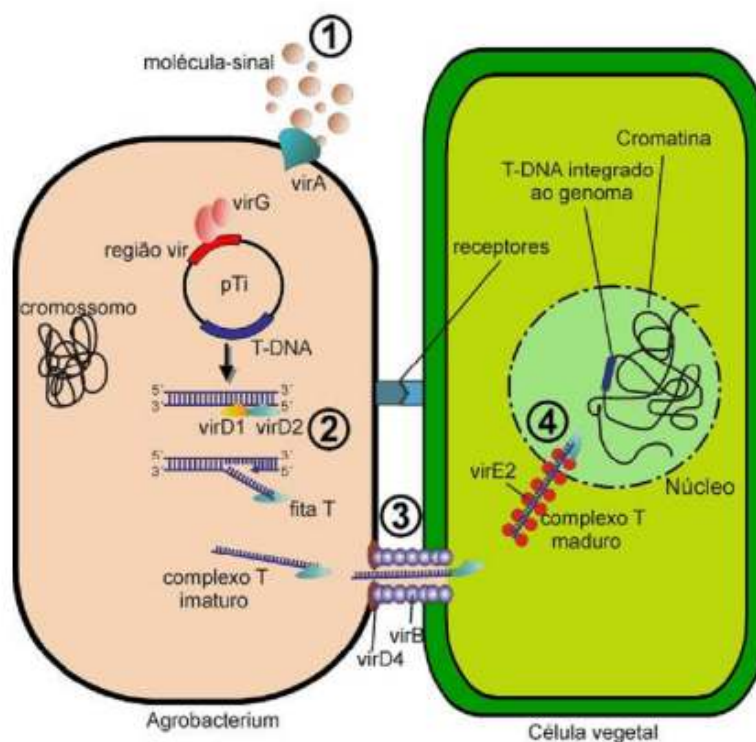


Figura 7 – Esquema do processo infeccioso, mostrando todos os passos da transferência do DNA da bactéria para a planta hospedeira (BRASILEIRO; ARAGÃO, 2009).

A transformação genética mediada por *Agrobacterium* spp. é a estratégia mais comum usada para transformar plantas, por ser um sistema simples, eficiente e que deposita uma única ou poucas cópias do transgene no genoma hospedeiro. Esta vantagem se deve ao fato de que esse é um evento preciso e evolutivamente selecionado (DE BLOCK, 1993). O mecanismo de integração do DNA exógeno é pouco entendido tanto nos eventos de transformação direta (por biobalística ou eletroporação celular)

quanto indireta (via *Agrobacterium*); no entanto, Kohli et al. (2003) afirmam que a maioria dos eventos de integração ocorre em regiões teloméricas e subteloméricas dos cromossomos da planta. Estudos recentes (GELVIN, 2000; SOMERS; MAKAREVITCH, 2004; TZFIRA et al., 2004) propõem modelos de integração do DNA exógeno em células transformadas por *A. tumefaciens* baseados no entendimento de funções específicas das proteínas envolvidas na transferência e integração do T-DNA. Somers e Makarevitch (2004) e Tzfira et al. (2004) propõem que o T-DNA se integra por micro-homologia, isto é, por um evento de recombinação ilegítima entre o sítio alvo do genoma e ambas as extremidades do T-DNA, acompanhado por pequenas deleções no DNA da planta. Sabe-se que há maior conservação da borda 5' devido à ligação da proteína VirD2 a esta extremidade do T-DNA, a qual serve para protegê-lo contra a ação de exonucleases da célula hospedeira.

Um dos genes presentes no T-DNA a ser introduzido na planta é o gene de seleção, que codifica uma proteína com atividade enzimática ou um produto que irá conferir às células vegetais transformadas resistência a uma determinada substância, geralmente herbicidas e antibióticos. A finalidade do marcador seletivo é permitir que apenas as células transformadas se desenvolvam (BRASILEIRO; DUSI, 1999). O gene *nptII* confere resistência ao antibiótico canamicina que é um dos mais empregados na transformação genética (IEAMKHANG; CHATCHAWANKANPHANICH, 2005; GAO et al., 2009; SHARMA et al., 2009; YASMEEN, 2009).

O gene de seleção deve ser introduzido no genoma da planta juntamente com o gene de interesse. Uma vez ocorrido o evento de transformação, as células transformadas expressam o gene marcador, e o seu produto, em contato com o respectivo substrato, permite o desenvolvimento celular normal, enquanto aquelas células não transformadas morrerão. Os agentes de seleção são adicionados às culturas *in vitro* apenas nas etapas iniciais do processo de transformação (SAWAHEL, 1994). Como apenas uma pequena proporção de células é transformada nos ensaios laboratoriais, a chance de se recuperar brotos transgênicos sem seleção é muito baixa (MIKI; MCHUGH, 2004).

Atualmente, 50 genes marcadores usados em plantas transgênicas têm sido avaliados quanto a sua eficiência, biossegurança, aplicações científicas e comercialização (MIKI; MCHUGH, 2004). Os mais utilizados são: (i) antibióticos, (ii) herbicidas, (iii) suplementos que servem como fonte de carbono e (v) precursores de fitohormônios.

O uso de genes de resistência a antibióticos de origem bacteriana, expressos sob o controle de promotores de plantas, é eficiente, porém há casos em que a adição de antibiótico ao meio de cultivo interfere negativamente na capacidade de regeneração (HOFFMANN; VIEIRA, 2000; VAN; FERRO; JACOBSEN, 2010). Os representantes da principal classe de antibióticos, os aminoglicosídeos, são amplamente usados, sendo o mais conhecido a canamicina, que é largamente aplicada como agente seletivo em ensaios de transformação. Outros são: gentamicina, geneticina, neomicina, paromomicina e higromicina (WILMINK; DONS, 1993).

Alguns trabalhos demonstram que a utilização das proteínas RP mais utilizadas no sistema de transformação genética são as quitinases e β -1,3-glucanases. O gene RCC2 clonado de arroz, que codifica uma quitinase, foi introduzido em videira que desenvolveu resistência contra os fungos *Uncinola necator* e *Elsinoe ampelina* (YAMAMOTO et al., 2000) e também em crisântemo que foi resistente a *Botrytis cinerea* (TAKATSU et al., 1999). O gene da quitinase do tabaco foi introduzido em amendoim, que desenvolveu resistência a *Cercospora arachidicola*, cujas plantas que não mostraram sintomas tinham altos níveis de atividade específica para quitinase (ROHINI; RAO, 2001). Esses trabalhos demonstram que essas proteínas RP conferem um aumento na resistência, principalmente contra doenças fúngicas (ZOUBENKO et al., 1997), devido ao fato dos fungos verdadeiros possuírem uma parede celular de quitina.

Atualmente há trabalhos não só demonstrando a possibilidade, mas também descrevendo protocolos eficientes de transformação via *Agrobacterium* em tomate. Esses trabalhos envolvem técnicas de transformação genética, as quais avaliam o efeito de antibióticos na regeneração dos explantes, a expressão de genes marcadores e a expressão de genes para resistência a antibióticos (COSTA et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2001; IEAMKHANG; CHATCHAWANKANPHANICH, 2005; ABU-EL-HEBA; HUSSEIN; ABDALLA, 2008; SAKER et al., 2008; GAO et al., 2009; KHOUDI et al., 2009; SARKER; ISLAM; HOQUE, 2009; SHARMA et al., 2009; YASMEEN, 2009; ABDALLAH et al., 2010; KAUR; BANSAL, 2010; VAN; FERRO; JACOBSEN, 2010).

Os sucessos desses trabalhos estimulam a elaboração de novas construções gênicas para que se torne mais eficiente a obtenção de plantas resistentes a patógenos.

2. JUSTIFICATIVA

A cultura do tomate (*Solanum lycopersicum* L) destaca-se em âmbito mundial por sua importância econômica e social. No Brasil, é a segunda olerícola em importância econômica, sendo precedida pela batata e seguida pela cebola. Anualmente são cultivados 67.000 ha, com uma produção estimada em 4,3 milhões de toneladas de frutos.

O tomateiro está sujeito ao ataque de mais de uma centena de doenças, que podem ser de origem bacteriana, fúngica, virótica ou causadas por nematóides. Entretanto, mais da metade das doenças da cultura do tomate são causadas por fungos, sendo os que atacam o sistema radicular situa-se alguns dos mais preocupantes. Os problemas fitossanitários que afetam a tomaticultura constituem fatores limitantes a uma maior produtividade agrícola, principalmente nos estados produtores da região Nordeste.

A murcha de fusário do tomateiro, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), é uma das doenças que podem causar até 100% de perda em cultivares mais suscetíveis e, como em todas as doenças vasculares de plantas, o controle químico não é eficiente. O uso de cultivares resistentes ao fungo constitui o melhor meio de controle da doença, já que o fungo *Fol* pode permanecer no solo por algumas décadas.

A classificação desse fungo em raças é baseada na reação diferencial de germoplasmas de tomateiro, sendo conhecidas atualmente três raças: 1, 2 e 3. No Brasil, a raça 1 é a de maior ocorrência, sendo controlada com a utilização de cultivares resistentes. Entretanto, a importância da raça 2 vem crescendo nos principais Estados produtores devido à suscetibilidade das cultivares comerciais. A raça 3 apresenta uma distribuição geográfica mais limitada e foi registrada, recentemente, no Brasil no estado do Espírito Santo. No Nordeste brasileiro já foram identificadas as raças 1 e 2. Essa doença vem se tornando importante no Brasil, devido ao fato de cultivares comerciais e com resistência às raças 2 e 3 ainda não estarem amplamente disponíveis.

Sendo o método de controle mais eficiente, a obtenção de cultivares resistentes utilizando a transformação genética é considerada como uma alternativa apropriada para o desenvolvimento dessas plantas, uma vez que a pirimidação de genes tem sido um entrave para o melhoramento convencional, bem como a ligação desses genes a características agronomicamente indesejável, devido principalmente à utilização de

genótipos ancestrais e selvagens do tomateiro na busca de genes de resistência a essa doença e/ou quando a abreviação do tempo de desenvolvimento de tais cultivares é componente indispensável.

Para tanto, faz-se necessário identificar genes da planta envolvidos na defesa de genótipos resistentes frente à inoculação do patógeno e realizar sua caracterização em nível de expressão para, posteriormente, serem incorporados em cultivares comerciais pela transformação genética.

Um dos maiores obstáculos para a manutenção da resistência do tomateiro reside na variabilidade dos patógenos. Portanto, é importante e fundamental conhecer as raças predominantes em um determinado local e sua epidemiologia, para facilitar os programas de melhoramento. Neste sentido, técnicas de biologia molecular têm sido apresentadas para diagnosticar e estudar os patógenos, e têm contribuído para conhecer a sua diversidade.

Apesar da importância da cultura do tomate e da murcha de fusário no Nordeste, não existem estudos aprofundados em relação a fontes de resistência que direcionam e otimizem os programas de melhoramento genético do tomateiro.

Assim, este estudo foi conduzido com o objetivo de caracterizar e determinar a variabilidade genética de diferentes isolados de *Fol*, mediante marcadores moleculares, bem como, a caracterizar um gene diferencialmente expresso em tomateiro submetido ao ataque de fusário e o desenvolvimento de uma cultivar superexpressando este gene, que poderá resultar em uma maior resistência a doença causada pelo fusário.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a participação do gene quitinase no tomate no processo de defesa contra doenças causada pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*).

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar a variabilidade genética de isolados de três raças de *Fol*, para que seja possível a identificação e caracterização genética dessas raças, utilizando os marcadores moleculares RAPD e IGS;
- Verificar a ocorrência de DNA polimórfico por RAPDs e RFLPs em DNA repetitivo (região IGS/ RFLP-IGS) em isolados de cada raça de *Fol*;
- Relacionar padrões de amplicons de RAPD específico para cada raça de *Fol*;
- Produzir sequências correlacionadas entre raças de *Fol* com padrões de RFLP da região IGS do rDNA;
- Determinar o número de cópias do gene *SolChi* no genoma da cultivar BHRS;
- Avaliar a expressão do gene de *SolChi* na cultivar BHRS inoculado com o patógeno *Fol*, utilizando a técnica da PCR quantitativo em tempo real;
- Construção de um vetor para transformação de tomate mediada por *A. tumefaciens* com a finalidade de expressar o gene *SolChi*;
- Estabelecer protocolos de regeneração utilizando cotilédones para a cultivar Santa Clara em meio seletivo;
- Desenvolver tomate transgênico superexpressando o gene de *SolChi* na cultivar de tomate Santa Clara, para aumentar a resistência contra a doença causada pelo *Fol*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLAH et al. Stable integration and expression of a plant defensin in tomato confers resistance to fusarium wilt. **GM Crops**, v. 1, n. 5, p. 344-350, 2010.
- ABU-EL-HEBA, G. A.; HUSSEIN, G. M.; ABDALLA N. A. A rapid and efficient tomato regeneration and transformation system. **Agriculture and Forestry Research**, v. 58, p. 103-110, 2008.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5.ed. San Diego, Academic Press, 2005, 635 p.
- AMARAL, D. O. J. do. et al. Differential gene expression, induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infection, in tomato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 8, p. 1017-1023, 2008.
- ANDRADE, D. E. G. T. de; SOUZA, L. T. de; ASSIS, T. C. de; Murcha-de-fusário: importante doença do tomateiro no Estado de Pernambuco. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 5/6, p. 243-263, 2008/2009.
- ANDRADE, D. E. G. T.; MICHEREFF, S. J. Incidência da murcha-de-fusário do tomateiro no Agreste de Pernambuco e determinação do tamanho da amostra para quantificação da doença. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 25, n. 1, p. 31-46, 2000.
- ANDRADE, G. M.; SARTORETTO, L. M.; BRASILEIRO, A. C. M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**. v. 28, p. 465-476, 2003.
- ARIE T.; TAKAHASHI H.; KODAMA M.; TERAOKA T. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions, **Plant Biotechnology**, v. 24, p. 135–147, 2007.
- ARRUDA S. C. Murcha de Fusarium do tomateiro. **Biológico**, v. 7, p. 199-200, 1941.
- BALOGUN O. S. Comparison of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* races 1, 2 and 3, and f.sp. *radicis lycopersici* based on the sequences of fragments of the ribosomal DNA intergenic spacer region. **Biokemistri**, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2007.
- BAYONA, L. G. et al. Isolation and characterization of two strains of *Fusarium oxysporum* causing potato dry rot in *Solanum tuberosum* in Colombia. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 28, n. 4, p. 166–172, 2011.
- BECKMAN, C. H. **The nature of wilts diseases of plants**. St. Paul, APS Press, 1987, 175 p.
- BENALI, S. et al. Advances of molecular markers application in plant pathology research. **European Journal of Scientific Research**, v. 50, n. 1, p. 110-123, 2011.
- BLANCARD, D. **Enfermedades del tomate: observar, identificar, luchar**. Montfavet: Inra, 1996, 212 p.

BOGACKI, P.; OLDACH, K. H.; WILLIAMS, K. J. Expression profiling and mapping of defense response genes associated with the barley-*Pyrenophora teres* incompatible interaction. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 9, n. 5, p. 645-660, 2008.

BOHN G. W.; TUCKER C. M. Studies on Fusarium wilt of the tomato.I. Immunity im *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill. And its inheritance in hybrids. **Agricultural Experimental Station Research Bulletin**, Missouri, v. 311, p. 82, 1940.

BOSTOCK, M. R. Signal Crosstalk and Induced Resistance: Straddling the Line Between Cost and Benefit. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 545-580, 2005.

BOWLES, D. J. Defense-related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 59, p. 873-907, 1990.

BRASILEIRO, A. C. M.; ARAGÃO, F. J. L. **O Sistema *Agrobacterium*: do solo para o laboratório**. In "Cultura in Vitro de Plantas", Ed. L. Barrueto, Embrapa, Brasília (in press), 2009.

BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. **Transformação genética de plantas** In: TORRES, A.C. CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação de plantas. Brasília: EMBRAPA-SP/EMBRAPA CNPH, p. 679-735, 1999.

BURGOS, J. S. et al. Influence of reagents formulation on real-time PCR parameters. **Molecular and Cellular Probes**, v. 16, p. 257-260, 2002.

CAMARGO, A. M. M. et al. Cadeia produtiva de tomate industrial no Brasil: resenha da década de 1990, produção regional e perspectivas. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 36, n. 11, p. 8-20, 2006.

CAMPOS, M. L. et al. Small and remarkable: the Micro-Tom model system as a tool to discover novel hormonal functions and interactions. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 5, p. 50-54, 2010.

CARVALHO, J. L. de; PAGLIUCA, L. G. Tomate: Um mercado que não pára de crescer globalmente. **Revista Hortifruti Brasil**, CEPEA – USP/ESALQ, ano 6, n. 58, p. 6-14, jun. 2007.

CAVALCANTI F. R. et al. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1721-1730, 2006.

CHRISTENSEN A. B. et al. The molecular characterization of the two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related protein. **Mol Plant Pathol.**, v. 3, p. 135–44, 2002.

COSTA et al. Transformação genética de cultivares de tomateiro industrial mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**. v. 12, n. 2, p. 107-118, 2000.

COSTA, H.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A. **Doenças de hortaliças que se constituem em desafio para o controle**. In: Zambolim, L. et al. (Eds.). Manejo integrado de doenças e pragas: hortaliças. Viçosa: Editora UFV. p. 319–336, 2007.

CROWHURST, R. N. et al. Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplified polymorphic DNA. **Current Genetics**. v. 20, n. 5, p. 391-396, 1991.

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

DANA, M. M.; PINTOR-TORO, J. A.; CUBERO, B. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. **Plant Physiology**, Rockville, v. 142, p. 722-730, 2006.

DE BLOCK, M. The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implications for plant breeding. **Euphytica**, v. 71, p. 1-14, 1993.

DE LA RIVA, G. A. et al. Agrobacterium tumefaciens: a natural tool for plant transformation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 1-16, 1998.

DELANEY, T. P. Genetic dissection of acquired resistance to disease. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, p. 5-12, 1997.

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.

DI PIETRO A. et al. *Fusarium oxysporum*: Exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. **Mol Plant Pathol**, v. 4, p. 315-25, 2003.

DIATCHENKO, L. et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v.93, p.6025-6030, 1996.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. Compendium of soil fungi. **Academic Press**, New York, p. 859, 1980.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 185-209, 2004.

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

EMMANUEL E.; LEVY A. A. Tomato mutants as tools for functional genomics. **Curr Opin in Plant Biol**, v. 5, p. 112–117, 2002.

FAO. FAOSTAT - agricultural statistics database. Rome: **World Agricultural Information Centre**, 2008. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 01 nov. 2011.

FERNANDES, C. de F. **Expressão de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo e ao mecanismo de defesa do feijão de corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp. ao fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Briosi & Cav.** Dissertação – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza, p. 162, 2004.

FERNANDES, C. F. et al. Induction of an anionic peroxidase in cowpea leaves by exogenous salicylic acid. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 163, p. 1040-1048, 2006.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003, 412 p.

FRITSCH, P.; RIESEBERG, L. H. **The use of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics**. In: SMITH, T. B.; WAYNE, R. K. (Ed.). **Molecular genetic approaches in conservation**. New York: Oxford University Press, 1996. p. 54-73.

GAO, N. et al. Influence of bacterial density during preculture on *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 98, p. 321–330, 2009.

GAULIN, E. et al. The CBEL glycoprotein of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* is involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 115, n. 23, p. 4565-4575, 2002.

GELVIN, S. B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 223-256, 2000.

GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 16-37, 2003.

GIL-AD N.L.; BAR-NUN N.; MAYER A. M. The possible function of the glucan sheath of *Botrytis cinerea*: effects on the distribution of enzyme activities. **FEMS Microbiol Lett**. v. 199, n. 1, p. 109-113. 2001.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v.30, p. 503–512, 2002.

GIULIETTI, A. P. et al. An overview of Real-Time Quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p. 386–401, 2001.

GOMES, E. A. et al. A.C. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 477-483, 2002.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.) **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville, Maryland, American Society of Plant Physiologists. cap. 21, p. 1102-1157, 2000.

HARMAN, G.E. et al. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. **Molecular Plant Pathology**. v. 83, n. 3, p. 313-318, 1993.

HOFFMANN, L. V.; VIEIRA, M. L. C. Resposta in vitro e suscetibilidade ao *Agrobacterium* de duas cultivares de *Stylosanthes guianensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 733-742, 2000.

HSUAN, H. M.; ZAKARIA, L.; SALLEH, B. Characterization of *fusarium* isolates from rice, sugarcane and maize using RFLP-IGS. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, n. 4, p. 409-415, 2010.

IBGE. LSPA: **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro v. 24 n. 04, 124 p, abr. 2011. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201104.pdf

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

IEAMKHANG S.; CHATCHAWANKANPHANICH O. Augmentin as an alternative antibiotic for growth suppression of *Agrobacterium* for tomato *Lycopersicon esculentum*) transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 213–220, 2005.

JAIN, M. et al. The auxin-responsive *GH3* gene family in rice (*Oryza sativa*). **Functional & Integrative Genomics**, Berlin, v. 6, p. 36-46, 2006.

JONES, J. P. **Fusarium wilt**. In: JONES, J.B.; JONES J.P.; STALL, R.E.; ZITTER, T.A. (eds.) Compendium of tomato Diseases. Sta Paul, APS PRESS, p. 15, 1991.

KASPRZEWKA, A. Plant chitinases - regulation and function. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Warsaw, v. 8, p. 809-824, 2003.

KAUR P.; BANSAL K. C. Efficient production of transgenic tomatoes via *Agrobacterium*-mediated transformation. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 2, p. 344-348, 2010.

KHOUDI H.; NOURI-KHEMAKHEM A.; GOUIAA S.; MASMOUDI K. Optimization of regeneration and transformation parameters in tomato and improvement

of its salinity and drought tolerance. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 22, p. 6068-6076, 2009.

KOHLI, A. et al. Transgene integration, organization and interaction in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 247-258, 2003.

KRAMER, K.J.; KOGA, K. Insect chitin: physiological state, synthesis, degradation and metabolic regulation. **Insect Biochemistry**. v.16, p. 851–877, 1986.

KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. Dissertação – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 140, 2007.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. P. **Doenças do tomateiro**. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v. 2, p. 607- 626, 2005.

LAMBERTZ, S. T. et al. Real-time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 19, p. 6060-6067, 2008.

LATUNDE-DADA, A. O.; LUCAS, J. A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 58, n. 5, p. 199-208, 2001.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, p. 107-117, 2001.

LIE, Y. S.; PETROPOULOS, C. J. Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 9, n. 1, p. 43-48. 1998.

LOPES C. A.; ÁVILA A. C. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005, 151 p.

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

LOPES, C. A.; REIS, A.; ÁVILA, C. Principais doenças do tomate para mesa causadas por fungos, bactérias e vírus. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 24, n. 219, p. 66-78, 2003.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 3, p. 190–212, 2004.

MARTINS, E. M. F. **Proteínas relacionadas à patogênese**. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). *Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular*. Piracicaba: FEALQ, p. 627, 2008.

MARTINS-MIRANDA, A. S. **Atividade de enzimas relacionadas com estresses bióticos e abióticos em plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] expostas à salinidade e deficiência hídrica**. 2002. 85f. Dissertação – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

MAXIMOVA, S. N. et al. Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. **Planta**, New York, v. 224, n. 4, p. 740-749, 2006.

McKILLIP, J. L.; DRAKE, M. Real-Time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 4, p. 823–832, 2004.

MEISSNER, R. et al. A new model system for tomato genetics. **Plant Journal**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 1465-1472, 1997.

MIKI, B.; MCHUGH, S.. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. **Journal of Biotechnology**, v. 107, p. 193-232, 2004.

MOCELLIN, S. et al. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 5, p. 189-195, 2003.

MONDINI, L.; NOORANI, A.; PAGNOTTA, M. A. Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools. **Diversity**, v. 1, p. 19-35, 2009.

MONGA D. et al. Differentiation of isolates of cotton root pathogens *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia bataticola* using pathogenicity and RAPD markers. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 135–139, 2004.

NELSON, P. E. **Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum***. In: MACE, M. E.; BELL, A. A.; BECKMAN, C.H. (Eds.). *Fungal wilt diseases of plants*. Academic Press, New York, p. 51-80, 1981.

NOGUEIRA et al. Regeneração *in vitro* de plantas de tomateiros ‘Santa Clara’ e seu mutante natural ‘firme’. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 63-71, 2001.

NOVAIS, C.M.; ALVES, M. P. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 10-13, 2004.

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**, Brasília, DF, v.27, p.631-634, 2002.

ORAVCOVÁ, K.; KUČHTA, T.; KACLÍKOVÁ, E. A novel real-time PCR-based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in food. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, v. 5, p. 568–573, 2007.

ORLANDO, C.; PINZANI, P.; PAZZAGLI, M. Developments in quantitative PCR. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 36, n. 5, p. 255-269, 1998.

OTERO, L.; DUCASSE, D.; MILLER, R. N. G. Variability in Ribosomal DNA Genic and Spacer Regions in *Verticillium dahliae* Isolates from Different Hosts. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 441-446, 2004.

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

PENG, J. -L. et al. Harpin-elicited hypersensitive cell death and pathogen resistance require the *NDR1* and *EDS1* genes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Orlando, v. 62, p. 317-326, 2003.

PERALTA, I. E. W.; SPOONER, D. M. Classification of wild tomatoes: a review. **Kurtziana**, Córdoba, v. 28, n. 1, p. 45-54, 2000.

PERALTA, I. E. W.; SPOONER, D. M. Granule-bound starch synthetase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill) Wettst. Subsection *Lycopersicon*). **American Journal of Botany**, Ohio, v. 88, n.3, p. 1888-1902, 2001.

PERALTA, I. E.; KNAPP, S.; SPOONER, D. M. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. **TGC Report**, v. 56, p. 6-12, 2006.

PUHALLA, J.E. **Genetic considerations of the genus *Fusarium***. In: Nelson, P.E.; Toussoun, T.A.; Cook, R.J. (Ed.). *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*. Pennsylvania: Pennsylvania State University, v.27, p.291-305, 1981.

REIS, A. et al. First report *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 426-428, 2005.

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**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 451-454, 2007.

REPKA, V. A virus-inducible cucumber anionic peroxidase has a serological counterpart in different plant species. **Acta Virologica**, Bratislava, v. 40, p. 121-125, 1996.

REYNOLDS, S.E.; SAMUELS, R.I. Physiology and biochemistry of insect molting fluid, **Advances in Insect Physiology**. v.26, p. 157-232, 1996.

ROHINI, V.K.; RAO, K.S. Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease. **Plant Science**, Limerick, v. 160, n. 5, p. 889-898, 2001.

ROSSMANITH, P. et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene. **Research in Microbiology**, v.157, p. 763-771, 2006.

RYALS, J. A. et al. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 1809-1819, 1996.

SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants : their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews**. n. 11, p. 317-338, 1993.

SAKER et al. *In vitro* production of transgenic tomatoes expressing defensin gene using newly developed regeneration and transformation system. **Arab Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 59-70, 2008.

SARKER, R. H.; ISLAM K.; HOQUE, M. I. *In vitro* Regeneration and *Agrobacterium* - mediated genetic transformation of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Plant Tissue Culture and Biotechnology**. v. 19, n. 1, p. 101-111, 2009.

SAWAHEL, W.A. Transgenic plants: performance, release and containment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 139-144, 1994.

SCHRODERT, M.; HAHLBROCK, K.; KOMBRINK, E. Temporal and spatial patterns of 1,3- β -glucanase and chitinase induction in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 161-172, 1992.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. **Mecanismos bioquímicos e defesa vegetal**. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). *Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular*. Piracicaba: FEALQ, cap 6, p. 227-248, 2008.

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.

SHARMA, M. K.; SOLANKE, A. U.; JANI, D.; SINGH, Y.; SHARMA, A. K. A simple and efficient *Agrobacterium*-mediated procedure for transformation of tomato. **Journal of Biosciences**, v. 34, n. 3, p. 423-433, 2009.

SHENG, J.; CITOVISKY, V. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: Have virulence proteins, will travel. **Plant Cell**, v. 8, p. 1699-1710, 1996.

SHIROTA, K. et al. Purification and characterization of chitinase isozymes from a red algae, *Chondrus verrucosus*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 72, n. 12, p. 3091-3099, 2008.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**. 32(3)189-196. 2007.

SNYDER, W.C.; HANSEN, H.N. Species concept, genetics and pathogenicity in *hypomyces solani*. **Phytopathology**, v. 44, p.338-342, 1953.

SOARES M.B. Identification and cloning of differentially expressed genes. **Curr Opin Biotechnol**, v.8, p.542-546, 1997.

SOMERS, D. A.; MAKAREVITCH, I. Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, p. 126-131, 2004.

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, p. 102-106, 2010.

SPOONER, D. M. et al. Plant nomenclature and taxonomy: an horticultural and agronomic perspective. **Horticultural Review**, v. 28, p. 1-60, 2003.

SPOONER, D. M.; PERALTA, I. E.; KNAPP, S. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes *Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) **Wettst Táxon**, v. 54, p. 43-61, 2005.

SRINIVASAN K. et al. Molecular characterization through IGS sequencing of formae speciales of *Fusarium oxysporum* pathogenic on lamb's lettuce. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 49, n. 3, p. 309-320, 2010.

STACHEL, S. E. et al. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, London, v. 318, p. 624-629, 1985.

STINTZI, A. et al. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, Paris, v. 75, n. 8, p. 687-706, 1993.

SUNDRAVADANA, S.; THIRUMURUGAN, S.; ALICE, D. Exploration of molecular variability in *rhizoctonia bataticola*, the incitant of root rot disease of pulse crops. **Journal of Plant Protection Research**, v. 51, n. 2, p. 184-189, 2011.

SWENSEN, S. M. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD): Methods and analysis. **Workshop booklet**, 1995, 33 p.

TAIRA, T. et al. Antifungal activity of rye (*Secale cereale*) seed chitinases: the different binding manner of class I and class II chitinase to the fungal cell walls. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, p. 970-977, 2002.

TAKATSU, Y. et al. Transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 82, n. 1-2, p. 113-123, 1999.

TANYOLAÇ B.; AKKALE C. Screening of resistance genes to *fusarium* root rot and *fusarium* wilt diseases in F3 family lines of tomato (*Lycopersicon esculentum*) using RAPD and CAPs markers. **African Journal of Biotechnology** v. 9, n. 19, p. 2727-2730, 2010.

TERRY, L. A.; JOYCE, D. C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 32, p. 1-13, 2004.

TZFIRA T, LI J.; LACROIX B; CITOVSKY V. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. **Trends in Genetics**, v. 20, p. 375-383, 2004.

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

VAN LOAN L. C.; REP M; PIETERSE C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-62, 2006.

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

VAN LOON, L. C.; VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var 'Samsun' and 'Samsun NN'. Changes in protein constitution after infection with TMV. **Virology**. New York, v. 40, p. 199-211, 1970.

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

VAN SLUYS, M. A. **Agrobacterium: um vetor natural para transformação em plantas**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa Hortaliças, 1999. p. 737-759.

VAN, D. T.; FERRO, N.; JACOBSEN H.-J. Development of a simple and effective protocol for *Agrobacterium tumefaciens* mediated leaf disc transformation of commercial tomato cultivars. **GM Crops**, v. 1, n. 5, p. 312-321, 2010.

VERBENE, M. C.; VERPOORTE, R.; BOL, J. F.; MERCADO-BLANCO, J.; LINTHORST, H. J. M. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 779-783, 2000.

WANG, X. et al . Characterization of a canola C2 domain gene that interacts with PG, an effector of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 9, p.2613-2620, 2009.

WANG, X. et al. Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction. **BioMed Central Plant Biology**; London, v. 10, n. 9, p.1-15, 2010.

WEN, C. M. et al. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, London, v. 35, p. 213-219, 2002.

WILMINK, A.; DONS, J. J. M. Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. **Plant Molecular Biology Report**, v. 11, p. 165-185, 1993.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v. 39, n. 1, p. 75-85, 2005.

WYATT, S. E.; PAN, S. Q.; KUC, J. β -1,3-Glucanase, chitinase, and peroxidase activities in tobacco tissues resistant and susceptible to blue mould as related to flowering, age and sucker development. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Orlando, v. 39, p. 433-440, 1991.

XIE, YU-RONG et al. Expression and functional characterization of two pathogenesis-related protein 10 genes from *Zea mays*. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 121-130, 2010.

YAMAMOTO, T. et al. Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 7, p. 639-646, 2000.

YASMEEN, A. An improved protocol for the regeneration and transformation of tomato (cv Rio Grande). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 1271-1277, 2009.

YI, S. Y.; HWANG, B. K. Differential induction and accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in soybean hypocotyls and leaves after compatible and incompatible infection with *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 48, p. 179-192, 1996.

ZAREIE, R.; MELANSON, D. L.; MURPHY, P. J. Isolation of fungal cell wall degrading proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves infected with *Rhynchosporium secalis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 15, n. 10, p. 1031-1039, 2002.

ZEMANKOVA, M. LEBEDA, A. Fusarium species, their taxonomy, variability and significance in plant pathology. **Review Plant Protection Science UZPI**, v. 37, p. 25-42, 2001.

ZOUBENKO, O. et al. Plant resistance to fungal infection induced by nontoxic pokeweed antiviral protein mutants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, p. 992-996, 1997.

CAPÍTULO 1

**Genetic variability among races of *Fusarium oxysporum* f. sp.
lycopersici using molecular markers**

Artigo enviado ao periódico: *Journal of Plant Pathology* (JPP),

ISSN: 1125-4653

Qualis Capes (CIÊNCIAS BIOLÓGICAS I): B1

**Genetic variability among races of *Fusarium oxysporum* f. sp.
lycopersici using molecular markers**

Daniel Oliveira Jordão do Amaral¹, Clébia Maria Alves de Almeida¹, Carolina Barbosa Malafaia¹, Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva², Maria Tereza dos Santos Correia¹, Márcia Vanusa da Silva¹, Vera Lucia de Menezes Lima¹

Authors' addresses: ¹Centro de Ciências Biológicas - Departamento de Bioquímica/CCB/Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco - Av. Prof. Moraes do Rego s/n, Cidade Universitária, Recife, PE – CEP 50650-420.

²Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA, Avenida General San Martin, 1371, Bongi, Recife – PE, Brasil. CEP 50761-000.

Corresponding Author: Vera Lucia de Menezes Lima

Fax: +55-81-21268576. Tel: +55-81-21268547.

E-mail: vlm@ufpe.br

Abstract

The Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) is a major biotic constraint for tomato production. This fungus is variable in pathogenicity and is not a well characterized pathogen on tomato. Genetic diversity of *Fol* isolates among three races was analyzed using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and restriction fragment length polymorphism of Intergenic Spacer (RFLP-IGS). Ten RAPD primers were selected, generating a large number of polymorphic bands. Using the marker IGS cutting with the enzymes *HinfI*, *RsaI*, *AluI* and *HaeIII* produced polymorphism information enabling the identification and genetic characterization among isolates three breeds of this pathogen. Cluster analysis with UPGMA using genetic distance showed that the isolates of the three races belonged to two groups. Group 1 contained isolates of the races 1 and 2 and isolates of the race 3 were placed in group 2. Races 1 and 2 are distributed worldwide whereas race 3 has a more limited geographic distribution with one report thus far in Brazil, suggesting races *Fol* diversity genetic is related to geographic origin and pathogenicity. Furthermore, since race 3-resistant cultivars adapted to Brazilian conditions are not yet available. Together, those results may contribute to understand the relation between fungal genetic variability and cultivars resistance phenotypes to fungal-caused diseases, helping plant-breeding programs.

Keywords: *Solanum lycopersicum*, Fusarium wilt, RAPD, IGS.

Introduction

The Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) is an important soil disease of tomato plant in producing countries. The profile of virulence of *Fol* isolates have been grouped into three races (1, 2 and 3) according to their ability to infect a number of different tomato cultivars containing different resistance genes (Amini, 2009; Tanyolac and Akkale, 2010). Races 1 and 2 are widely distributed worldwide and breed 3 has a more restricted geographical distribution. In Brazil, however, race 3 was recently detected in the southeastern states of Espírito Santo and Rio de Janeiro being a huge threat to the national tomato production (Reis *et al.*, 2005; Reis and Boiteux, 2007).

The use of resistant cultivars is the most reliable way to prevent the diseases. To successfully select the most appropriate cultivar for the coming growing season, the form and race of the pathogen that are emerging in the field must be identified (Hirano and Arie, 2006).

Although the species of *Fusarium* can be identified by their morphological characteristics on selective media (Nelson *et al.*, 1983; Burgess *et al.*, 1994), the pathogenic types, or *formae speciales* and races, of *F. oxysporum* cannot be identified morphologically. An inoculation assay using tester plants (Garibaldi, 1975) has been the most popular strategy to identify the forms (*formae speciales*) in *F. oxysporum* and races in each form. However, this method is time consuming (Woo *et al.*, 1996), and a more rapid and accurate method has been urgently needed.

Based on the existence of dominant monogenic traits of resistance, it is generally assumed a gene-gene relationship between *Fol* and tomato. Fungi races contain dominant avirulence genes that correspond to dominant genes for resistance in some cultivars of plants that are not capable of infecting them (Flor, 1971). To identify the

dominant resistance genes is essential to understand the interaction between pathogen and tomato cultivars on a molecular level. Several molecular methods have been used to study the genetic variability of *Fusarium* spp, such as restriction fragment analysis of the region of intergenic spacer (IGS) of the ribosomal DNA amplified by PCR, RAPD (random amplified polymorphic DNA) (Singh *et al.*, 2006; Tanyolaç and Akkale, 2010), RFLP (restriction fragment length polymorphism) and AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Sharma *et al.*, 2009).

The IGS region, which separates the repeated rDNA units, is particularly suitable for studying intraspecific relationships (Mbofung *et al.*, 2007). Recent studies have shown that the phylogenetic analysis of the IGS sequence is very useful for studying the genetic makeup of populations of *F. oxysporum* (Kawabe *et al.*, 2007; Enya *et al.*, 2008; Dissanayake *et al.*, 2009, Srinivasan *et al.*, 2010). Since *Fol* is an asexual haploid pathogen, techniques using arbitrary primers such as RAPD can be effective in the analysis of genetic diversity.

Molecular markers for rapid and efficient identification of *Fol* are needed to answer any confusion in morphological identification. In this study, amplification of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA (IGS) and RAPD were used to access the genetic variability of isolates from three races of *Fol* as alternative or in addition to methods based on morphology and pathological features.

Material and Methods

Fol isolates

A total of 10 *Fol* isolates of the three races were obtained from the germplasm bank of Embrapa Vegetables of Brazil. Collections of the fungus *Fol* were made in crop residues and soils in the main tomato growers of the State of PE. All strains were chosen according to their pathogen characteristics to different plants. The isolates were maintained in potato-dextrose-agar slants at 4°C.

DNA Extraction

They were kept in tubes with PDA (potato dextrose agar) solid medium for storage and culture maintenance, and subsequently replicated in Petri dishes incubated at 27° C for seven days. For mycelium production five PDA medium discs, 5 mm in diameter, containing mycelium of *F. oxysporum* were removed from colonies periphery with seven days of age and transferred to Erlenmeyer flasks containing 60 mL yeast extract liquid medium (10 g yeast extract, 10 g dextrose, 0.1 M ampicillin, 1 liter distilled water), maintained at 27° C under constant agitation of 120 rpm for seven days. The mycelium obtained was collected by vacuum filtration and washed with sterile distilled water. For DNA extraction was used the methodology according to Ferreira and Grattapaglia (1998). The DNA quantification was performed using spectrophotometer and the concentration adjusted to 20ng/mL and stored at - 20° C.

RAPD analysis

Procedures for RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) reactions were basically those described by Williams *et al.*, (1990). The DNA fragments amplification was performed by PCR using 10 selected random primers (Table 1) from the Operon kits (Operon Technologies Inc. Alameda, CA). The reaction mixture was composed of 2 µL of Taq polymerase buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM Cl], 1.5 mM MgCl₂,

200 μ M of each of the four dNTPs, 30 pmoles of primer, 6 ng genomic DNA and 1.0 unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen). We used the thermal cycler (MJ Research) with initial denaturation at 94° C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 38 °C for 45 s and extension at 72°C for 1 min and completed with a final extension at 72°C for 7 min.

Gel electrophoresis

The amplification products were separated in 1.5% agarose gel (Amresco) using 1X Tris Borate EDTA (TBE) as running buffer. Electrophoresis was conducted at 80 V, 500 mA for 160 min after which, the gels were stained with Syber Gold (Invitrogen), at approximately 5V/cm gel. Gels were photographed under UV light in the photodocumentation system L-PIX HE (Loccus biotechnology).

Genetic analysis

The variable binary similarity matrix was prepared using Jaccard coefficient by the NTSYS (Numerical Taxonomy System of multivariate program) computer program version pc2.1 (Rohlf, 1992). Dendrograms were prepared by UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetical average) analysis.

RFLP-IGS analysis

The Intergenic Spacer (IGS) was amplified using primer pair PNFo (5'-CCCGCCTGGCTGCGTCCGACTC-3') and PN22 (5'-CAAGCATATGACTACTGGC-3') (Edel *et al.*, 1995) according to the reaction conditions described by Llorens *et al.*, (2006) with some modifications. The amplification reaction was conducted in a 50 μ l reaction mixture containing 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTPs, 0.1 mM of each primers, 1.0 U of *Taq* polymerase (Invitrogen) and 6 ng genomic DNA, and performed using thermal cycler (MJ Research) with initial denaturation at 94° C for 2 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55 °C for 1

min, and extension at 72°C for 1 min and completed with a final extension at 72°C for 7 min.

For restriction analysis, the PCR products were digested with HinfI, RsaI, AluI, HaeIII, HindIII, HpaI, BmiI, EcoRV, NdeI and HAPI in a 15 µl reaction mixture in separate reactions. The reaction mixture contained 1X reaction buffer, 1 U of restriction enzyme, 6 - 10 µl of PCR products and distilled water and incubated for 1 h at 37°C for Sequencing of rDNA's IGS regions.

Purification and sequencing

Amplified products were purified with the Kit "GFX™ PCR DNA" (Invitrogen) to remove residues of nucleotides, primers and enzyme, thus allowing a quality sequencing reaction (Sambrook and Russel, 2001). The purified material was sequenced in a MegaBACE sequencer (GE Healthcare). Primers used for sequencing were the same used in the amplification reaction.

Data Analysis

The nucleotide sequence produced was lined with other IGS sequences of genes of *Fusarium* obtained near the GenBank (NCBI, National Center Biotechnology Information) (Altschul *et al.*, 1997) using the programs ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) and BioEdit 7.0 .0. (Hall, 1999). The phylogenetic tree was constructed by Neighbor joining algorithm (Saito and Nei, 1987), in the software MEGA v.5 using the Tamura-Nei model (Tamura *et al.*, 2011). The reliability of results was tested by bootstrap (1000 replications).

Results and Discussion

After initial screening of 40 decamer primers of RAPD, 10 revealed high level of DNA polymorphism among *Fol* isolates of each races and were used to study genetic diversity among those.

The genomic DNA of *Fol* isolates from the three races of was amplified by different decamer primers, which generated 3 to 14 polymorphic fragments per primer (Table 1). The size of amplified fragments ranged from 2000 to 200 base pairs; however, the best amplifications were fragments from 1000 to 300 base pairs. In this study, RAPD analysis was useful once genetic variability was observed among the three races using ten random primers. Of the ten primers used, race 3 can be differentiated by a fragment of 840 bp (OPA07), 280 bp (OPA08), 300 bp (OPA18) and 300 bp (OPA20) in four of them (Figure 1). RAPD analysis has been widely applied to detection and genetic characterization of pathogenic fungi, including race differentiation into *speciales* of several *F. oxysporum* (Kuramae and Souza, 2002; Singh *et al.*, 2006; Tanyolaç and Akkale, 2010). RAPD markers were used successfully in differentiating *Fusarium* species including two *formae speciales* of *F. Oxysporum*, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* and *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, being a fast and reliable tool for differentiating between species of the genus and a complementary alternative to methods based on morphology and pathogenic characteristics (El-Fadly *et al.*, 2008).

For the analysis of IGS region restriction, a fragment of approximately 1.2 kb was successfully amplified from all isolates of each three races *Fol*. Using the enzymes *Hinf*I, *Rsa*I, *Alu*I and *Hae*III, 4 to 5 patterns were obtained demonstrating that IGS primers were discriminatory for the races of *Fol* studied (Figure 2). The hierarchical clustering analysis (Figure 3) using Simple Matching coefficient and UPGMA method of the three races showed the formation of two groups: one group formed by races 1 and

2 with 69% similarity and another group formed by race 3 with 63% of similarity.

Sequences of intergenic spacer region (IGS) have been used for RFLP analysis of pathogenic and nonpathogenic *F. oxysporum* strains (Balogun, 2007; Srinivasan *et al.*, 2010; Bayona *et al.*, 2011). To infer the phylogenetic relationships among races of *Fol* IGS *Fusarium* sequences of races 1, 2 and 3 were compared with other sequences obtained from Genbank. Races 1 and 2 formed an independent cluster with similarity of 80% and race 3 showed paraphyletic behavior compared with the others (Figure 4) with similarity below 50%. According to Balogun (2007), the ribosomal IGS region can be considered representative enough to be used in the comparison of races 1, 2 and 3 of *Fol*.

Data generated by RAPD markers and IGS sequence analysis demonstrated the same formation of groups: races 1 and 2 forming a distinct group from race 3. This result is in agreement with those obtained by Reis *et al.*, (2005) who report the first occurrence of a distinct race (race 3) of races 1 and 2 infecting tomato cultivars. In Brazil, *Fusarium* wilt has been reported since the late 1930's in the State of São Paulo (Arruda, 1941) and races 1 and 2 are present occurring in virtually all producing areas of the country. The race 3, so far, a more limited global distribution, being reported in Australia (Grattidge and O'Brien, 1982); the United States (Chellemi and Dankers, 1992; Cai *et al.*, 2003) and Mexico (Valenzuela-Ureta *et al.*, 1996).

Additionally, four RAPD primers (OPB07, OPA08, OPA 18, OPA 20) revealed a fragment present only in race 3, suggesting potential use as molecular markers. This polymorphic could serve as an indicator of genetic variability in *Fol* and in identifying and characterizing *Fol* isolates.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the agencies and companies in Brazil that supported this research: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe), Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) and Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Hortaliças) for providing the races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Table

Table 1 - RAPD primers selected for DNA amplification of races (1, 2 and 3) of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* with their sequences, number of amplicons and detected polymorphism.

Primers	Sequences 5'-3'	Polymorphic fragment
OPA20	GTT GCG ATC C	6
OPA-03	AGTCAGCCAG	6
OPA-04	AATCGGGCTG	8
OPA-08	GTGACGTAGG	12
OPA-18	AGGTGACCGT	8
OPB-01	GTTTCGCTCC	11
OPB-07	GGTGACGCAG	8
OPG-13	CTCTCCGCCA	14
OPX-12	TCGCCAGCCA	3
OPX-17	GACACGGACC	3

Figures

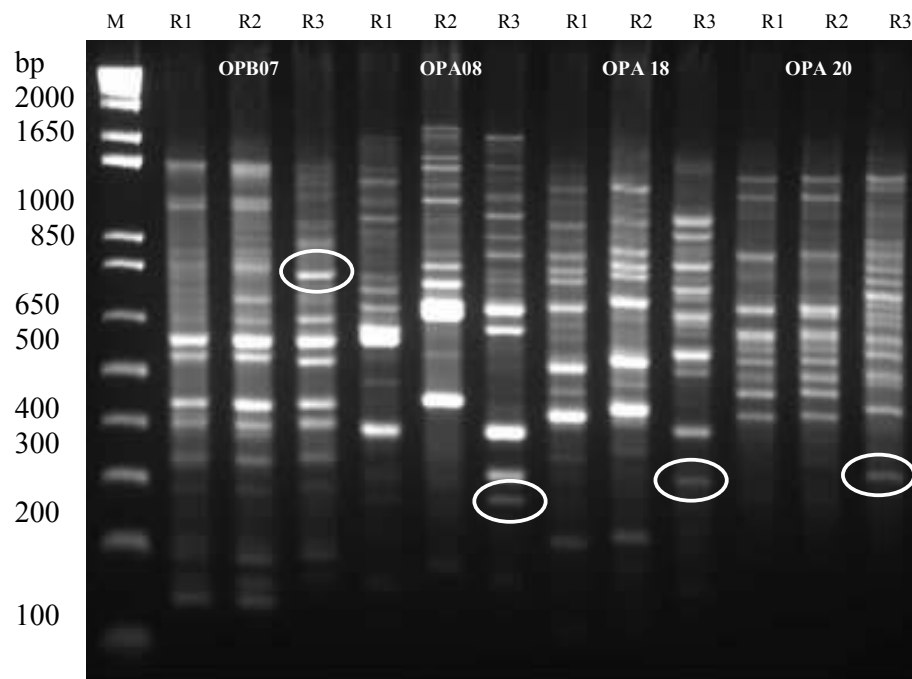


Figure 1. Amplified RAPD fragments of the races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* with primers OPB07, OPA08, OPA 18, OPA 20. M, marker 100 bp; R1, race 1, R2, race 2, R3, race 3. Circles indicate polymorphic RAPD markers.

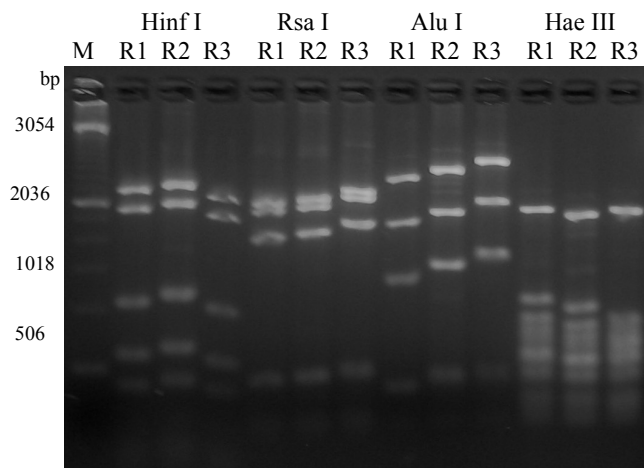


Figure 2. IGS-RFLP profiles after digestion on Hinf-I-Rsa I, Alu I and Hae III. Line 1 M, marker (1kb), R1, race 1, R2 race 2 and R3 race 3 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.



Figure 3 Dendrogram generated using Jaccard's Coefficient based on combined data of RAPD and RFLP-IGS of isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

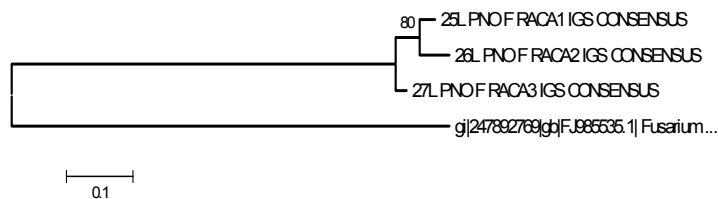


Figure 4. Phylogram based on the IGS region of the three races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* using the neighbor-joining method with the software MEGA4. The numbers on the branches indicate the bootstrap test values. (1000 resamplings).

References

- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389-3402.
- Amini J., 2009. Developing of DNA-marker to the *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* resistance genes of tomato. *Journal of Plant Protection Research* **49**: 175-178.
- Arruda S.C., 1941. Murcha de Fusarium do tomateiro. *Biológico* **7**: 199-200.
- Balogun O.S., 2007. Comparison of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* races 1, 2 and 3, and f.sp. *radicis lycopersici* based on the sequences of fragments of the ribosomal DNA intergenic spacer region. *Biokemistri* **19**: 1-8.
- Bayona L.G., Grajales A., Cárdenas M.E., Sierra R., Lozano G., Garavito M.F., García M.C.C. de, Bernal A., Jiménez P., Restrepo S., 2011. Isolation and characterization of two strains of *Fusarium oxysporum* causing potato dry rot in *Solanum tuberosum* in Colombia. *Revista Iberoamericana de Micología* **28**: 166-172.
- Burgess L.W., Summerell B.A., Bullock S., Gott K.P., Backhouse D., 1994. Laboratory manual for *Fusarium* research, 3rd edn. University of Sydney, Australia.
- Cai G., Rosewich G. L., Schneider R.W., Kistler H.C., Davis R.M., Elias K.S., Miyao E.M., 2003. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. *Phytopathology* **93**: 1014-1022.
- Chellemi D.O., Dankers H.A., 1992. First report of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 3 on tomatoes in Northwest Florida and Georgia. *Plant Disease* **76**: 861.
- Dissanayake M.L.M.C., Kashima R., Tanaka S., Ito S.I., 2009. Genetic diversity and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* isolated from wilted Welsh onion in Japan. *Journal of General Plant Pathology* **75**: 125-130.
- El-Fadly G.B., El-Kazzaz M.K., Hassan M.A.A., El-Kot G.A.N., 2008. Identification of some *Fusarium* spp. using RAPD-PCR Technique. *Egypt. J. Phytopathol* **36**: 71-80.
- Enya J., Togawa M., Takeuchi T., Yoshida S., Tsushima S., Arie T., Sakai T., 2008. Biological and phylogenetic characterization of *Fusarium oxysporum* complex, which causes yellows on *Brassica* spp. and proposal of *F. oxysporum* f. sp. *rapae*, a novel forma specialis pathogenic on *B. rapa* in Japan. *Phytopathology* **98**: 475-483.
- Ferreira M.E., Grattapaglia D., 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3rd Ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN.
- Flor H.H., 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Ann. Rev. Phytopathol* **9**: 275-296.

- Garibaldi A., 1975. Race differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Prill. et Del.) Snyder et Hans. *Meded Fac Landbouwwet Rijksuniv Gent* **40**: 531-53.
- Grattidge R., O'Brien R.G., 1982. Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland. *Plant Disease* **66**: 165-166.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**: 95-98.
- Hirano Y., Arie T., 2006. PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* ff. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *J Gen Plant Pathol* **72**: 273-283.
- Kawabe M., Katsube K., Yoshida T., Arie T., Tsuchiya K., 2007. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae* in Japan based on phylogenetic analyses of rDNA-IGS and MAT1 sequences. *Journal of General Plant Pathology* **73**: 353-359.
- Kuramae E.E., Souza N.L., 2002. Variabilidade genética entre formas especiais de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. *Acta Scientiarum* **24**: 1481-1485.
- Mbofung G.Y., Hong S.G., Pryor B.M., 2007. Phylogeny of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* inferred from mitochondrial small subunit, elongation factor 1- α and nuclear ribosomal intergenic spacer sequence data. *Phytopathology* **97**: 87-98.
- Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O., 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park.
- Reis A., Boiteux L. S., 2007. Outbreak of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in commercial fresh-market tomato fields in Rio de Janeiro State, Brazil. *Horticultura Brasileira* **25**: 451-454.
- Reis A., Costa H., Boiteux L.S., Lopes C.A., 2005. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* **30**: 426-428.
- Rohlf F.J., 1992. NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system (version 1.7). State University of New York.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- Sambrook J., Russel D.W., 2001. Rapid isolation of yeast DNA. In: Sambrook J., Russel D.W. (eds) *Molecular cloning, a laboratory manual*, pp.631-632. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sharma M., Varshney R.K., Rao J.N., Kannan S., Hoisington D., Pande S., 2009. Genetic diversity in Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, chickpea wilt pathogen. *African Journal of Biotechnology* **8**: 1016-1023.

- Singh B.P., Saikia R., Yadav M., Singh R., Chauhan V.S., Arora D.K., 2006. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* causing wilt of chickpea. *African Journal of Biotechnology* **5**: 497-502.
- Srinivasan K., Gilardi G., Spadaro D., Gullino M.L., Garibaldi A., 2010. Molecular characterization through IGS sequencing of formae speciales of *Fusarium oxysporum* pathogenic on lamb's lettuce. *Phytopathologia Mediterranea* **49**: 309-320.
- Tamura T., Ohshima K. I., Nihashi S., Hasumi H., 2011. Estimation of Surface Heat/Salt Fluxes Associated with Sea Ice Growth/Melt in the Southern Ocean, *Scientific Online Letters on the Atmosphere* **7**: 17-20.
- Tanyolaç B., Akkale C., 2010. Screening of resistance genes to fusarium root rot and fusarium wilt diseases in F3 family lines of tomato (*Lycopersicon esculentum*) using RAPD and CAPs markers. *African Journal of Biotechnology* **9**: 2727-2730.
- Thompson J.D., Higgins D.C., Gibson T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Results* **22**: 4673-4680.
- Valenzuela - Ureta J.G., Lawn D.A., Heisey R.F., Zamudionaloa V., 1996. First report of *Fusarium* wilt race 3, caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, of tomato in Mexico. *Plant Disease* **80**: 105.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **18**: 6531-6535.
- Woo S.L., Zoina A., Del Sorbo G., Lorito M., Nanni B., Scala F., Neviello C., 1996. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs, and RAPD. *Phytopathology* **86**: 966-97.

CAPÍTULO 2

Isolation and characterization of chitinase from tomato infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Artigo enviado ao periódico: *Journal of Phytopathology* (J Phytopatho),

ISSN: 0931-1785

Qualis Capes (CIÊNCIAS BIOLÓGICAS I) B1

**Isolation and characterization of chitinase from tomato
infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***

Daniel Oliveira Jordão do Amaral¹, Clébia Maria Alves de Almeida¹, Maria Tereza dos Santos Correia¹, Márcia Vanusa da Silva¹, Vera Lucia de Menezes Lima¹.

Authors' addresses: ¹Centro de Ciências Biológicas - Departamento de Bioquímica/CCB/Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco - Av. Prof. Moraes do Rego s/n, Cidade Universitária, Recife, PE – CEP 50650-420.
danieljornal@yahoo.com.br; clebiam@yahoo.com.br; mtscorreia@gmail.com;
marcia.vanusa@ufpe.br; vlml@ufpe.br

Corresponding Author: Vera Lucia de Menezes Lima

Fax: +55-81-21268576. Tel: +55-81-21268547.

E-mail: vlml@ufpe.br

Abstract

Chitinases are important component of plant defense in response to attack by pathogens. To identify specific chitinase, we constructed a cDNA library using total RNA from tomato genotype resistance inoculated with conidia of isolates race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*). One chitinase (*SolChi*) clone was isolated and sequence analysis show that the cDNA clone *SolChi* encodes an acidic isoform of class-III chitinase. Southern blotting indicated that *SolChi* was present only once in the tomato genome. Real-time quantitative RT-PCR assay show that the expression of this gene is induced upon infection with *Fol* and the accumulation of transcripts for this PR-protein was rapid in the resistant genotype during the first 24 h. A putative role for chitinase in tomato is defense against fungal pathogens.

Keywords: *Fusarium* wilt, *Solanum lycopersicum*, Chitinase, PR proteins, Induced expression.

INTRODUCTION

Vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (*Fol*) are highly destructive in all tomato-growing areas of the world (Shanmugam et al. 2011). However, only limited studies exist on the biochemical and molecular background of the *Fol*–tomato interaction.

Plants express a wide variety of genes in response to pathogen/pest infection. Such genes are referred to as pathogenesis-related (PR) genes (Li et al. 2001, Dahal et al. 2009; Maruthachalam et al. 2011). The best characterized genes belonging to this group are those that encode the hydrolytic enzymes known as chitinases (EC 3.2.1.14) and β -1,3-glucanases (EC3.2.1.39). These hydrolytic enzymes inhibit the growth of many fungi *in vitro* by hydrolyzing the chitin and β -glucan of fungal cell walls. Furthermore, oligomeric products of digested chitin and β -glucan can act as signal molecules to stimulate further defense responses. These lytic enzymes have attracted much attention and have become very important resources in the genetic engineering of crop plants for disease resistance (Heikal et al. 2008; Saker et al. 2008; Abdallah et al. 2010).

Chitinase genes exist as families: seven classes of chitinases have been recognized (Neuhaus 1999; Leubner-Metzger and Meins 1999; Kasprzewka 2003; Ohnuma et al. 2011). Individual members within each class can reside at different chromosomal locations and some exhibit differential expression depending on the pathogen (Gorovits et al. 2007; Boava et al. 2010; Iqbal et al. 2012).

We are studying the interaction between tomato and *Fol* using the resistant genotype BHRS. A cDNA library from we constructed from tomato genotype resistance

inoculated with race 2 of *Fol* and cDNA clone encoding chitinase was isolated. In the present paper, we report the isolation and characterization of this clone.

MATERIAL AND METHODS

Plant Material

Tomato seeds of the cultivar BHRS, resistant to *Fol*, were germinated aseptically on MS culture medium (0.8% w/v agar), with the pH adjusted to 5.8 ± 0.2 , photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of dark, and temperature at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Plants were kept in these conditions for three weeks after germination.

***Fol* isolates**

Isolate of *Fol* race 2 was provided by the germplasm bank of Embrapa Vegetables of Brazil (Embrapa Hortaliças). The isolate was chosen according to their pathogen characteristics to different plants. The isolates were maintained in potato-dextrose-agar slants at 4°C .

Inoculation

For inoculation, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (race 2) conidiospores were collected from potato dextrose agar (PDA) plates by flooding a 2-week old culture with a solution of 0.01% (v/v) Tween 20 and rubbing off the surface. The spore suspension was filtered through glass wool to remove mycelia fragments. The spore concentration was determined using a hemocytometer. The plants were infected through the root cut method (Santos 1997) for 10 min. Control plants were treated with autoclaved distilled water. After inoculation, the plants were transferred to new tubes

containing MS liquid medium, and the roots were harvested 0, 24 and 48 hours after, mixed and used for total RNA extraction.

RNA extraction and cDNA Synthesis

After 0, 24 and 48 h of treatment, plants had their roots removed and macerated in mortar with liquid nitrogen and total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen) following the procedure described in the manufacturer's guide. The quality and concentration of total RNA were measured by electrophoresis on 1.2% agarose denaturing gel and spectrophotometer, respectively. Complementary DNA was obtained through SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) following the procedure described in the manufacturer's guide.

Suppression subtractive hybridization (SSH) cDNA library cDNA cloning and sequencing

Suppression subtractive hybridization was performed with the PCR-select cDNA subtraction kit (Clontech) following the procedure described in the manufacturer's guide. Cloned PCR products, in the vector T/A PCR2.1 TOPO were, then, transformed with DH5a competent cells to produce all the subtracted libraries (forward SSH), according to manufacturer's instructions. Plasmid DNA was extracted by the alkaline lysis miniprep method (Sambrook and Russell 2001). Recombinant plasmids were identified, by restriction analysis, and subjected to DNA sequencing.

Nucleotide sequences of each insert were determined in an automatic DNA sequencer (ABI PRISM 377), with the Big Dye Terminator kit. Conventional M13-forward and M13-reverse primers were used to determine DNA sequences. Obtained

sequences were compared with the ones in the databanks of: the National Center for Biotechnology Information, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), using the program BlastX (Altschul et al. 1997).

Quantification of transcripts by RT-PCR and real-time PCR

Aliquot of 5 µg total RNA was used as a template to obtain cDNA using the ThermoScript™ kit RT-PCR system plus Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. Subsequently, PCR amplification was used for semi-quantitative and quantitative analyses of *SolChi* gene expression. Amplification reactions via quantitative PCR (qPCR) were performed in 25 µL final volume containing 2 µL cDNA (100 ng), 10 mM of each primer and 12.5 µL of solution from kit Platinum SYBR® Green qPCR Supermix UDG (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations.

DNA extraction and *Southern blotting*

Genomic DNA was isolation from BHRS after 0, 24 and 48 h of treatment. Restriction enzyme digestion, gel electrophoresis, *Southern blotting*, probe labeling and hybridization was done as described in Faris et al. (2000).

RESULTS AND DISCUSSION

After SSH, 97 cDNA clones of tomato was obtained from the *Fol* library. Inserted length ranged from 300 to 1.100 bp in the library. Clone similarity was considered at E-values lower than 10^{-5} in the different data banks analyzed, being, thus, significant (Fernández et al., 2003). One clone, *SolChi*, was identified in clones of the cDNA library and sequence analysis show that the cDNA clone *SolChi* encodes an acidic isoform of class-III chitinase endochitinase whit 100% homology (Danhash et al. 1993).

Based on amino acid sequence similarity of chitinases from various organisms, seven classes of chitinases have been proposed. It has been suggested that chitinases from class I, II, and IV are of plant origin and make up the family 19 glycosyl hydrolases (Dahiya et al. 2006). Class III chitinases are mainly plant and fungal in origin. Class III and V make up the family 18 glycosyl hydrolases (Kasprzewka 2003), which are structurally unrelated to family 19 (Shirota et al. 2008). Phylogenetic analysis of chitinases from class I, II, and IV suggested a larger evolutionary distance between chitinases of class IV and those of classes I and II (Fukamizo et al., 2000). In cucumber, the expression of this class III gene can be induced by pathogen (Kasprzewka 2003).

The vast majority of plant chitinases are induced by stress factors, especially those biotic, and some chitinase isoforms showed antifungal properties *in vitro* assays, further supporting the involvement of chitinases in the defense mechanism of plants against phytopathogens (Kasprzewka 2003; Saker et al. 2008; Maruthachalam et al. 2011). Results confirm the higher overall expression of the gene *SolChi* in resistant genotype BHRS and the differential up-regulation of tomato, chitinase in the expression of the incompatible interaction. These data corroborate with those found in the

experiment of Amaral et al., 2008, which suggests that the gene found in the EST subtractive library is really involved in the response to fungus inoculation, ie, it is being differentially expressed after contact with the pathogen in BHRS genotype.

To verify the presence and organization of the *SolChi* gene in the tomato plant BHRS genotype, a *Southern blot* experiment was performed using the 550 bp fragment of gene *SolChi* cDNA as probe and genomic DNA digested with different restriction enzymes. It was detected only a DNA fragment capable of hybridizing with the probe with all restriction enzymes used. This result suggests that the gene *SolChi* is present in single copy in the genome of BHRS tomato cultivar (Figure 1).). Sharma et al. (2009) found the number of copies inserted into the tomato genome, presenting over 50% integrated as single copies.

The qPCR requires an efficient method for obtaining large quantities and high quality of total RNA. Analysis of total RNA samples by 1% denaturing gel electrophoresis showed the amplicons for the 28S and 18S rRNA, indicating good quality. The optical density ratio of $A_{260/230}$ and $A_{260/280}$ was approximately 1.9 and 1.7, suggesting little contamination of polysaccharides and proteins, respectively, and high yield of total RNA.

The quantification of gene expression by qPCR was based on the expression of a target gene in relation to a reference gene (gene with recognized constitutive expression) by the Pfaffl mathematical model that calculates the ratio of relative expression of a target gene based on qPCR reaction efficiency (E) and the point at which the fluorescence satisfactory exceeds the background fluorescence (Ct) of an unknown sample vs. control, and it is expressed in relation to a reference gene (Pfaffl 2001; Pfaffl et al. 2004). Thus, we can confirm and estimate the variation in gene expression of *SolChi* chitinase during infection by *Fol* race 2 in BHRS tomato

genotype. The oligonucleotides used in RT-PCR and qPCR reactions are described in Table 1. Mean Ct values were used to calculate estimates of amplification efficiency for both genes, given by the equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Ct values indicate the sensitivity of cDNA detection, showing variations in reactions and Ct values ranging from one to two cycles within each sample in triplicate. This can be attributed to uncontrollable factors, such as errors in the estimates of total mRNA or variation in the efficiency of reverse transcription reaction.

The gene responsible for the elongation factor seems to have stable expression by findings in a wide range of experiments on potatoes, peaches, rice and tomato (Brunner et al. 2004; Nicot et al. 2005; Lovdal and Lillo 2009; Tong et al. 2009). In this experiment, the EF-1 α has stable expression under infested tomato inoculated with *Fol* indicating that it is an appropriate constitutive control gene.

The target gene (*SolChi*) normalized with EF-1 α (constitutive) had the highest level of expression in roots of both treatments; but after 24 hours of pathogen inoculation it shown to have twice the highest expression levels compared with uninoculated plants (Figure 2).

The qPCR reaction amplicon was also analyzed by agarose gel electrophoresis and data obtained showed no formation of nonspecific products, confirming that the fragment size of amplified DNA (98pb) was similar to that expected (data not shown).

Experiments involving plants that overexpress chitinase showed that cocoa leaves and transgenic tobacco plants were more resistant to *Colletotrichum gloeosporioides* and *R. solanacearum*, respectively, than the wild-type strains (Dana et al. 2006; Maximova et al. 2006). In addition, study has shown that *Cercospora arachidicola* induced the increased activity of chitinase in plants of peanut (Iqbal et al. 2011), Kuhn (2007) found significant increase in chitinase when bean plants were

treated with acibenzolar-S-methyl. It is important to remember that, by being wall-fungi hydrolases, chitinases and glucanases may have synergistic antifungal effect (Martins 2008). The *SolChi* may have a potential in the defense mechanism of plant in attack of pathogen.

Table 1. Sequences of oligonucleotides used for RT-PCR and qPCR assay.

<i>Primer</i>	<i>Sequence 5'→3'</i>
A2 âncora (RT)	T(9) CC
<i>SolChi</i> sense (qPCR)	AGTGCAGGAACATTCACTGGAGGA
<i>SolChit</i> antisense (qPCR)	ACACCAATACCTTGTCCAGCTCGT
<i>EF-1α</i> sense (qPCR)	TCAGGCTGACTGTGCTGTTCTCAT
<i>EF-1α</i> antisense (qPCR)	GACACCAAGGGTGAAAGCAAGCAA

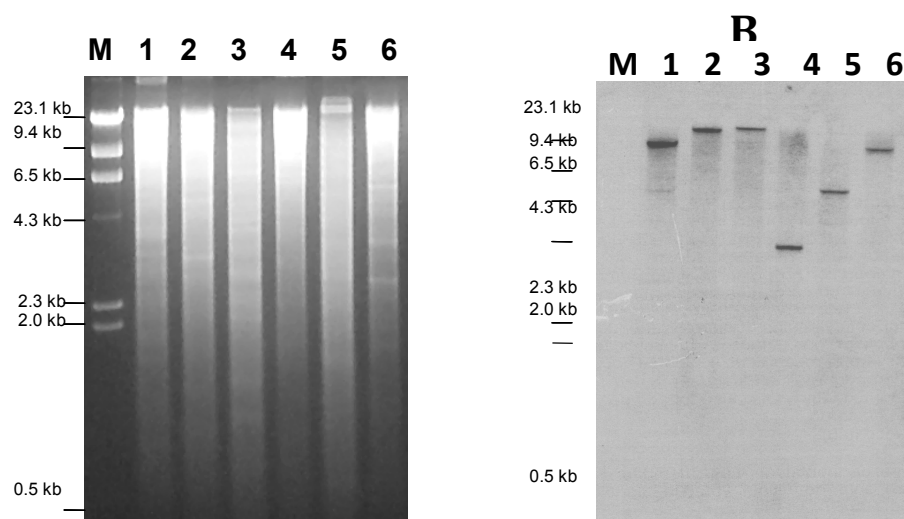


Figure 1. *Analysis of the SolChi gene in the tomato plants genomic DNA.* Panel (A) agarose gel electrophoresis. (B) Autoradiographed Hybridized membrane. Genomic DNA was digested with restriction enzymes *Bam*HI (1), *Eco*RI (2), *Hind*III (3), *Kpn*I (4), *Pst*I (5), *Xba*I (6), (M) molecular weight marker in Kb. As probe we used the cDNA fragment of 550 bp. Hybridization was proceeded with the kit ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection Systems (Amersham Biosciences). The numbers on the left of the gels represent the size in Kb.

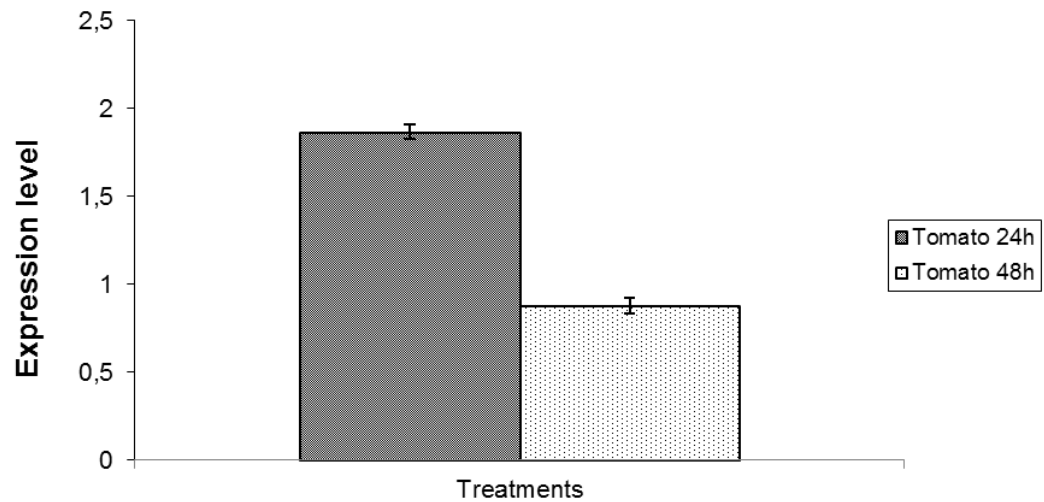


Figure 2. Real-time PCR analysis of *SolChi* gene expression in tomato inoculated with race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. EF-1 α gene was chosen as an endogenous control. Data represent the average of three independent experiments with standard errors.

REFERENCES

- Abdallah NA, Shah D, Abbas D, Madkour M. (2010) Stable integration and expression of a plant defensin in tomato confers resistance to fusarium wilt. *GM Crops* 1: 344-350.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
- Amaral DOJdo, Lima MMdeA, Resende LV, Silva MVda. (2008) Differential gene expression, induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infection, in tomato. *Pesq agrope. bras* 43:1017-1023.
- Boava LP, Kuhn OJ, Pascholati SF, Di Piero RM, Furtado EL. (2010) Atividade de quitinases e peroxidases em folhas de eucalipto em diferentes estágios de desenvolvimento após tratamento com acibenzolar-S-metil (ASM) e inoculação com *Puccinia psidii*. *Tropical Plant Pathology* 35:124-128.
- Brunner A, Yakovlev I, Strauss S. (2004) Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biology* 4:14.
- Dahal D, Heintz D, Dorsselaer AV, Braun HP, Wydra K. (2009) Pathogenesis and stress related, as well as metabolic proteins are regulated in tomato stems infected with *Ralstonia solanacearum*, *Plant Physiology and Biochemistry* 47:838-846
- Dahiya N, Tewari R, Hoondal, GS. (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71:773-782.
- Dana MM, Pintor-Toro JA, Cubero B. (2006) Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiology, Rockville* 142:722-730.
- Danhash N, Wagemakers CA, van Kan JA, de Wit PJ. (1993) Molecular characterization of four chitinase cDNAs obtained from *Cladosporium fulvum*-infected-tomato. *Plant Mol Biol* 22:1017-1029.
- Faris JD, Haen KM, Gill BS. (2000) Saturation mapping of a generic recombinant hot spot region in wheat. *Genetics* 154:823-835.
- Fernández P, Paniego N, Lew S, Hopp HE, Heinz RA. (2003) Differential representation of sunflower ESTs in enriched organspecific cDNA libraries in a small scale sequencing project. *BMC Genomics* 4:40.
- Fukamizo T. (2000) Chitinolytic enzymes: Catalysis, substrate binding, and their application. *Current Protein and Peptide Science* 1:105-124.
- Gorovits R, Akad F, Beery H, Vidavsky F, Mahadav A, Czosnek H. (2007) Expression of Stress-Response Proteins Upon Whitefly-Mediated Inoculation of *Tomato yellow leaf*

curl virus in Susceptible and Resistant Tomato Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:1376–1383.

Heikal AM, El-Din SMM, Aboul-Enein AA, Ahmed FA, Abbas A, Taha HS, Handa AK. (2008) TÉg-Mi, a root-knot nematode resistance gene fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) confers nematode resistance in tomato. *Arab J Biotech* 11:139-58.

Iqbal MM, Nazir F, Ali S, Asif MA, Zafar Y, Iqbal J, Ali GM. (2012) Over Expression of Rice chitinase Gene in Transgenic Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Improves Resistance Against Leaf Spot. *Molecular Biotechnology* 50:129-136.

Kasprzewska A. (2003) Plant chitinases – Regulation and Function. *Cellular & Molecular Biology Letters* 8:809-824.

Kuhn OJ. (2007) Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção. Piracicaba, São Paulo, Brasil, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Dissertação.

Leuber-Metzger G, Meins F Jr. (1999) Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2). In: Datta SK, Muthukrishnan S (eds) *Pathogenesis-related proteins in plants*. CRC Press, Boca Raton, Fla., pp 49–76.

Li WL, Faris JD, Muthukrishnan S, Liu DJ, Chen PD, Gill BS. (2001) Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinases and β -1,3-glucanases from wheat spikes infected by *Fusarium graminearum*. *Theor Appl Genet* 102:353-362.

Lovdal T, Lillo C. (2009) Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Analytical Biochemistry* 387:238-242.

Martins EMF. (2008) Proteínas relacionadas à patogênese. In: Pascholati SF, Leite B, Stangarlin JR, Cia P. (Ed.). *Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular*. Piracicaba: FEALQ, pp.627.

Maruthachalam K, Klosterman SJ, Kang S, Hayes RJ, Subbarao KV. (2011) Identification of Pathogenicity-Related Genes in the Vascular Wilt Fungus *Verticillium dahliae* by *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated T-DNA Insertional Mutagenesis. *Mol Biotechnol* 49:209–221.

Maximova SN, Marelli JP, Young A, Pishak S, Verica JA, Guiltinan MJ. (2006) Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. *Planta* 224:740-749.

Neuhaus JM. (1999) Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In: Datta SK, Muthukrishnan S (eds) *Pathogenesis-related proteins in plants*. CRC Press, Boca Raton, Fla., pp 77-105.

- Nicot N, Hausman J, Hoffmann L, Evers D. (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 56:2907-2914.
- Ohnuma T, Numata T, Osawa T, Mizuhara M, Lampela O, Juffer AH, Skriver K, Fukamizo T. (2011) A class V chitinase from *Arabidopsis thaliana*: gene responses, enzymatic properties, and crystallographic analysis. *Planta* (1):123-137.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26:509-515.
- Pfaffl MW. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29:45.
- Saker MM, Hussein HA, Osman NH, Soliman MH. (2008) *In vitro* production of transgenic tomatoes expressing defensin gene using newly developed regeneration and transformation system. *Arab Journal of Biotechnology* 11:59-70.
- Sambrook J, Russel DW. (2001) Rapid isolation of yeast DNA. In: Sambrook J, Russel DW. (eds) *Molecular cloning, a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, pp.631-632.
- Santos JRM. (1997) Methodology for screening Tomato for *Fusarium* wilt, *Verticillium* wilt, Gray leaf spot, Early blight, and *Septoria* leaf spot. In: *Proceedings of the First International Symposium on Tropical Tomato Diseases*. ASHS Press, pp.164-166.
- Shanmugam V, Atri K, Gupta S, Kanoujia N, Naruka DS. (2011) Selection and differentiation of *Bacillus* spp. Antagonistic to *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* and *Alternaria solani* infecting Tomato. *Folia Microbiol* 56:170–177.
- Sharma MK, Solanke AU, Jani D, Singh Y, Sharma AK. (2009) A simple and efficient *Agrobacterium*-mediated procedure for transformation of tomato. *Journal of Biosciences* 34:423-433.
- Shirota K, Sato T, Sekiguchi J, Miyauchi K, Mochizuki A, Matsumiya M. (2008) Purification and characterization of chitinase isozymes from a red algae, *Chondrus verrucosus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72:3091-3099.
- Tong Z, Gao Z, Wang F, Zhou J, Zhang Z. (2009) Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Molecular Biology* 10:71.

CAPÍTULO 3

Transformação genética de tomateiro mediada por *agrobacterium tumefaciens* visando resistência à murcha de fusário

Artigo a ser enviado: *Plant Molecular Biology Reporter*
(Plant Mol Biol Rep),

ISSN: 0735-9640

Qualis Capes (CIÊNCIAS BIOLÓGICAS I) B1

Transformação genética de tomateiro mediada por *agrobacterium tumefaciens* visando resistência à murcha de fusário

Daniel Oliveira Jordão do Amaral¹; Francisco José Lima Aragão²; Maria Tereza dos Santos Correia¹; Márcia Vanusa da Silva¹; Vera Lúcia Menezes de Lima¹.

Authors' addresses: ¹*Centro de Ciências Biológicas - Departamento de Bioquímica/CCB - Universidade Federal de Pernambuco - Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife, PE – CEP 50650-420.*

²*Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA, Avenida General San Martin, 1371, Bongi, Recife – PE, Brasil. CEP 50761-000.*

² *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Introdução e Expressão de Genes, PqEB W5 Norte, 70770-900, Brasília, DF, Brasil.*

Corresponding Author: Vera Lucia de Menezes Lima

Fax: +55-81-21268576. Tel: +55-81-21268547.

E-mail: vlml@ufpe.br

Resumo

A murcha de fusário, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), é uma doença que ocorre em todas as regiões do mundo onde o tomate é cultivado, podendo se manifestar em qualquer dos estádios de desenvolvimento da planta. A resistência genética tem sido apontada como a melhor estratégia para o manejo dessa doença fúngica. Alguns trabalhos com plantas transgênicas obtiveram elevados níveis de expressão de quitinases, demonstrando que esta expressão determina um aumento da resistência vegetal a diversos patógenos. Este trabalho investigou a participação da quitinase contra a doença murcha de fusário desenvolvendo uma planta transgênica superexpressando o gene de interesse na cultivar Santa Clara. Sementes do cultivar Santa clara foram desinfestadas e após 10 dias da germinação os cotilédones foram cortados em segmentos transversais para inoculação com a co-cultura de *A. tumefaciens* contendo o plasmídeo Pbs-35s Chi AMV NOS 2. Em seguida, os explantes foram transferidos para sala de crescimento para aguardar a regeneração. As plantas desenvolvidas sobreviverem à seleção da transformação, utilizando o antibiótico Canamicina (50mg/L) e Timetin (250mg/L), sendo aclimatadas e analisadas molecularmente, utilizando-se *primers* específicos para a detecção dos transgenes. Foram identificadas 12 plantas transgênicas PCR positivas para o gene de quitinase, e em seguida as plantas foram testadas pela técnica de RT-PCR para detectar mRNA transcrito, quando 10 plantas comprovando a transcrição do transgene.

Palavras chaves: Tomate, Quitinase, *A. tumefaciens*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

INTRODUÇÃO

A cultura do tomate (*Solanum lycopersicum*) destaca-se no âmbito por sua importância econômica e social. No Brasil, é a segunda olerícola em importância econômica, sendo precedida pela batata e seguida pela cebola (IBGE, 2009; AGRIANUAL, 2008). Seu cultivo é bastante sensível a problemas fitossanitários, estando sujeito ao ataque de mais de uma centena de doenças de causas bióticas (fungos, bactérias, vírus e nematoides) e abióticas, afetando e limitando a produção dessa hortaliça em todo o mundo (LOPES; ÁVILA, 2005). É importante destacar que o uso indiscriminado de defensivos agrícolas respondem hoje por mais de 35% do custo total de uma lavoura de um hectare de tomate, além de comprometer a qualidade de vida do trabalhador rural e do consumidor (REIS; BOITEUX, 2007).

O *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol), agente da murcha de fusário, constitui um fator limitante a uma maior produtividade agrícola, podendo causar até 100% de perda em cultivares mais suscetíveis. Ela é uma doença que ocorre em todas as regiões onde o tomate é cultivado, podendo se manifestar em quaisquer estádios de desenvolvimento da planta, embora seja mais comum no início do florescimento e na frutificação, sendo o tomate o único hospedeiro desse fungo de solo (KUROZAWA; PAVAN, 2005; SOUZA et al., 2010).

Nenhuma medida de controle químico é efetiva e economicamente viável no controle da fusariose em tomateiro (BLANCARD, 1996), sendo o uso de genótipos resistentes o único meio seguro e eficiente de controle da doença (KUROZAWA; PAVAN, 2005). A resistência genética torna-se uma ferramenta fundamental e indispensável para uma nova agricultura, mais racional e sustentável. As enzimas hidrolíticas quitinases e β -1,3-glicanases são capazes de degradar os maiores constituintes da parede celular (quitina e β -1,3-glicana) de muitos fungos filamentosos e vêm sendo extensivamente estudadas em plantas (CAVALCANTI et al., 2006; BOAVA et al., 2010). A degradação de polissacarídeos estruturais da parede celular de fungos ou alterações na sua arquitetura, promovidas por essas enzimas, podem prejudicar o desenvolvimento do microrganismo, impedindo seu crescimento (ZAREIE et al., 2002; SCHWANESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

Alguns trabalhos com plantas transgênicas com elevados níveis de expressão de quitinases foram publicados, demonstrando que essa expressão determina um aumento da resistência vegetal a diversos patógenos (YAMAMOTO et al., 2000; ROHINI; RAO,

2001). Apesar das intensas pesquisas em quitinases de plantas e considerando as propriedades dessas enzimas, a sua real função nas reações de defesa nas plantas ainda não está totalmente esclarecida.

A transformação genética mediada por *Agrobacterium* spp. é a estratégia mais comum usada para transformar plantas de tomate, por ser um sistema simples, eficiente e que deposita uma única ou poucas cópias do transgene no genoma. Atualmente há trabalhos não só demonstrando essa possibilidade mas também descrevendo protocolos eficientes de transformação em tomate que envolvem técnicas de transformação genética, os quais avaliam o efeito de antibióticos na regeneração dos explantes, a expressão de genes marcadores e a expressão de genes para resistência a antibióticos (COSTA et al., 2000; IEAMKHANG; CHATCHAWANKANPHANICH, 2005; ABU-EL-HEBA; HUSSEIN; ABDALLA, 2008; KHOUDI et al., 2009; SARKER; ISLAM; HOQUE, 2009; KAUR; BANSAL, 2010; VAN; FERRO; JACOBSEN, 2010).

Agrobacterium em condições de laboratório possibilita a utilização como um vetor universal de transformação genética e pode ser explorada como uma nova ferramenta biotecnológica para a engenharia genética de todos os organismos eucarióticos, permitindo a obtenção de um grande número de plantas geneticamente modificadas, auxiliando modelos de estudo das interações patógeno-hospedeiro, do transporte intercelular de macromoléculas e do direcionamento de proteínas para o núcleo. O objetivo desse estudo foi gerar plantas transgênicas superexpressando o gene de quitinase na cultivar de tomate Santa Clara, para aumentar a resistência contra a doença causada pelo *Fol*.

MATERIAL E MÉTODOS

Desinfestação e germinação de sementes

Sementes da cultivar Santa Clara foram desinfestadas utilizando 1% de hipoclorito de sódio em seguida colocadas em uma seringa e adicionado aos poucos 20 mL de água destilada autoclavada com 2 gotas de *tween* 20 descartando a água a cada lavagem. Após as lavagens, as sementes foram germinadas em Magentas (Sigma Chemical Company, EUA), em meio contendo a metade da concentração de sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), incubadas à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, sob irradiância de 24 a 36 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 16 horas de fotoperíodo.

Construção do vetor

O gene quitinase (*SolChi*) foi isolado da cultivar BRH, utilizando primers específicos para obter o gene do início ao fim. O DNA isolado foi inserido entre os sítios de *SpeI* e *EcoR V* do vetor TOPO T.A. (Invitrogen). O cassete de expressão utilizado foi do vetor Pbs-35 s Chi AMV NOS 2 dos sítios *Hind III* a *EcoR I*. O vetor PCBI 2300 foi utilizado do sítio *Xba I* a *Sma I*, onde esse fragmento possui a resistência ao antibiótico canamicina e a origem da replicação. Os fragmentos dos vetores foram ligados utilizando a enzima T4 ligase (Invitrogen) por duas horas em temperatura ambiente, gerando o vetor Pbs-35 s Chi AMV NOS 2 que foi transferido para *A. tumefaciens* estirpe EHA105 (Hood et al., 1993) por eletroporação de acordo com Dias et al. (2006). Como agente seletivo para a *A. tumefaciens* foi usada a rifamicina.

Transformação da *Agrobacterium* EHA105 com o gene de interesse (Pbs-35 s Chi AMV NOS 2)

Um μL de DNA (Pbs-35 s Chi AMV NOS 2) foi pipetado, colocado no tubo contendo a célula eletrocompetente, EHA105, e deixado no gelo por cinco minutos. Em seguida foi transferido para uma curveta de eletroporação. Acoplada ao eletroporador, a curveta foi submetida ao pulso elétrico onde foi ajustada uma eletroporação sob $25\mu\text{F}$ de capacitância, 400Ω de resistência e voltagem de 1,80KV. Em seguida um mL de meio SOC (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) foi adicionado à curveta, homogeneizado delicadamente e transferido para um tubo estéril, o qual foi incubado por uma hora a 28°C sob agitação de 200 rpm por duas horas. Após o período de incubação, as células

transformadas foram centrifugadas em microcentrífuga a 22°C e 7000 rpm por dois minutos. 840 µL do sobrenadante foram removidos e as células foram ressuspensas no volume restante, o qual foi depositado em placa contendo meio LB-ágar (SAMBROOK *et al.*, 1989) com canamicina (50µg/mL) mais *rifamicina* (50µg/mL), o qual foi espalhado por toda a placa com o auxílio de uma alça de Drigalski. A placa foi então incubada em estufa a 28°C até crescerem as colônias (dois dias). As colônias que cresceram foram testadas por reações em cadeia da polimerase (PCR), com primers específicos (sequências de DNA presente do gene introduzido)

Co-cultura Tomate-*Agrobacterium*

Em cabine de fluxo laminar, os cotilédones de sementes germinadas de tomate foram cortados transversalmente (0,5 x 0,5cm) para a penetração da *Agrobacterium*, sobre papel-toalha autoclavado e umedecido com água estéril. Em uma placa de Petri autoclavada, os cotilédones foram imersos na suspensão de *Agrobacterium* EHA105 transformado com o vetor Pbs-35 s Chi AMV NOS 2, que passou por um período de incubação de 14h-16h a 28°C com agitação até atingir uma OD_{600nm} de 0,6, numa diluição de 1:10 de meio 2XYT (1,6 % bacto-triptona + 1,0 % extrato de levedura + 0,5% NaCl) por 30 minutos. Em seguida, os explantes foram enxugados em papel-filtro estéril e colocados em placas de Petri contendo meio MS, vitamina B5, 3% sacarose, 4,5 µM zeatina e 200 µM acetossiringona por dois dias no escuro. Após esse período, os explantes foram transferidos para meio de regeneração contendo MS, vitamina B5, 3% sacarose, 4,5 µM zeatina, 250 mg/L timetim e 50 mg/L de canamicina, em seguida levados para sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados. Em uma segunda placa de Petri, outros cotilédones foram da mesma forma arrumados, porém sem entrar em contato com a *Agrobacterium*, atuando como controle da transformação.

Seleção e crescimento das plantas

Após 21 dias na sala de crescimento, os cotilédones controle (não transformados) e transformados foram transferidos para novo meio MS, vitamina B5, 3% sacarose, 0,1 mg/L zeatina, 250 mg/L timetim e 50 mg/L de canamicina, para estimular o surgimento de brotos (IEAMKHANG; CHATCHAWANKANPHANICH, 2005). Posteriormente foram transferidos para vasos contendo solo e em seguida

levados para aclimação em casa de vegetação. As plantas transformadas e não transformadas foram cultivadas até a coleta das sementes (Figura 1).

Cálculo da frequência de regeneração e transformação

A eficiência de regeneração e de transformação dos explantes foi calculada pela seguinte fórmula.

$$\text{Frequência de regeneração (\%)} = \frac{\text{Total de explantes regenerados em meio de seleção}}{\text{Número total de explantes}} \times 100$$

$$\text{Eficiência da transformação (\%)} = \frac{\text{Total de explantes confirmados por RT-PCR}}{\text{Número total de explantes}} \times 100$$

Análise das plantas por reações em cadeia da polimerase (PCR)

Extração de DNA genômico das plantas para análise por PCR

A análise molecular foi realizada para confirmar a integração e expressão do transgene. O DNA genômico foi isolado de folhas jovens das 44 plantas supostamente transgênicas e controle após a formação dos brotos, de acordo com Ferreira e Grattapaglia (1996).

A PCR

Para a amplificação do PCR, um micrograma do DNA foi tratado com RNase para ser utilizado com template. Cada reação de PCR foi realizada em 50 µl de volume final. Os primers utilizados para amplificação foram: forward primer: 35SAMVf 5'-CCACTATCCTTCGCAAGAC -3' reverse primer: *SolChi-r* 5'-ACACCAATACCTTGTCCAGCTCGT -3'; forward primer: 35SAMVf 5'-CCACTATCCTTCGCAAGAC -3' reverse primer: TNOSr 5'-ATCATCGCAAGACCGGCA -3'. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (0.5 µg/ml), visualizados e foto documentados sob luz ultravioleta.

Análise RT-PCR

A RT-PCR foi realizada em sementes obtidas a partir de PCR positiva T0 em plantas auto-polinizadas que foram cultivadas em casa de vegetação. O RNA total das prováveis plantas transformadas (T1) foi isolado e utilizado para a realização de RT-PCR com o kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Para descartar a possibilidade de ter amplificado DNA contaminante nas amostras, a amplificação do PCR direto da preparação do RNA foi realizada sem a transcrição reversa. Uma amostra de RNA sem transcriptase reversa serviu como controle negativo e o DNA do plasmídeo Pbs-35 s Chi AMV NOS 2 serviu como controle positivo. Os fragmentos amplificados (utilizando os mesmos componentes, primers e as condições de amplificação do gene quitinase descritos anteriormente), foram separados em gel de agarose 1,2% e foto documentados sob luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A engenharia genética é uma ferramenta com grande potencial para obtenção de plantas resistentes a doenças. Diversos genes relacionados com a defesa de plantas contra patógenos têm sido identificados, clonados e introduzidos em plantas por transformação genética. (BARBOSA-MENDES et al., 2009; IQBAL et al., 2012; MONTEIRO-HARA et al., 2011) Esses genes introduzidos em plantas, normalmente, são colocados sob o controle de promotores fortes, tais como o *PCaMV35S*, que induz a expressão constitutiva do gene em todos os tecidos e estágios de desenvolvimento da planta. O uso de um promotor que torne a expressão do gene de interesse restrita no tempo e local da invasão do patógeno seria ideal para os casos de indução de resposta de defesa pela planta.

Doenças fúngicas constituem um grande desafio para os milhões de agricultores que lidam com a cultura do tomate. Uma grande proporção da produção é perdida anualmente, apesar dos esforços do melhoramento com fins de resistência.

Na tentativa de obter plantas transgênicas de tomate da cultivar Santa Clara resistentes à murcha de fusário, causado por *Fol* uma das principais doenças que atacam os tomateiros, foi utilizado o gene *SolChi* que hidrolisa quitina, um dos principais constituintes da parede celular dos fungos, sob o controle de um promotor constitutivo.

Este é o primeiro relato de transformação genética com o gene de quitinase mediada por *Agrobacterium* em cultivar de tomate. Assim esse protocolo de transformação oferece novas oportunidades para gerar novas cultivares de tomate para diferentes características agrônômicas ou de resistência a outros patógenos.

Para confirmação dos vetores construídos foram realizadas reações de clivagem, usando enzimas de restrições específicas, de acordo com o vetor e fragmento a ser liberado. A visualização foi observada após a eletroforese, aplicada em gel de agarose e corado com brometo de etídio. Na figura 2, confirmação do gene de quitinase inserido no vetor TOPO TA (Invitrogen). Na figura 3, fragmentos do vetor Pbs-35s AMV NOS 2 digeridos com as enzimas *Hind III* e *EcoR I* e o vetor pCAMBIA 2300 digeridos com a enzima *Xho I*, os fragmentos foram utilizados para a construção do vetor final. A representação esquemática do T-DNA presente no vetor Pbs-35 s Chi AMV NOS 2 utilizado para transformar folhas de tomate mediado por *A. tumefaciens* (Figura 4).

Foram preparados 150 explantes cotiledonares, dos quais 44 foram resistentes à canamicina, sobrevivendo ao meio de seleção. Isso representa uma frequência de regeneração de 29%. Análise molecular do suposto T0 transformante foi realizada

por PCR. A análise por PCR foi realizada utilizando DNA genômico da suposta plantas de tomate transgênicas Santa Clara, utilizando-se primers específicos para a detecção dos transgenes (35S AMV-F, *NPT II*; 35S AMV-F, *tnos-R*; 35S AMV-F, *SolChi-R*) (Figura 4). Foi possível detectar a inserção do transgene *SolChi* no genoma do tomate, também utilizando os *primers* específicos para a amplificação do gene de seleção *nptII*. A detecção do gene *nptII* também foi realizada por Kaur e Bansal (2010) para a confirmação da transformação genética em plantas de tomate contendo o vector pBI101.

Das 44 plantas obtidas pelo processo de transformação via *A. tumefaciens*, apenas 12 foram positivos para PCR, mostrando o fragmento esperado de 950 pb (FIGURA 5). Como esperado, plantas não transgênicas que passaram pelo mesmo protocolo de regeneração não apresentaram o fragmento. Estas observações confirmam que o gene *SolChi* foi integrado no genoma dos brotos transformados de tomate.

As sementes obtidas a partir das plantas que tiveram a PCR positiva T0 por autopolinização foram cultivadas em casa de vegetação e posteriormente analisadas por PCR e RT-PCR, utilizando primers específicos para a detecção dos transgenes. Dez das doze plantas selecionadas (T1) deram resultados positivos para o PCR (Figura 6), representando uma eficiência de transformação de aproximadamente 7%.

Para avaliar a resistência fúngicas, a RT-PCR foi utilizada para confirmar a capacidade de transcrição do gene *SolChi* nas plantas transgênicas (T1) e não transgênicas. Os perfis de expressão para o gene *SolChi* foram determinadas utilizando primers específicos para a seleção da expressão do gene em tomate. O RNA total foi extraído das plantas transformadas e plantas não transformadas (controle negativo) e submetido a RT-PCR. Fragmentos de tamanho esperado foram produzidos a partir de RNA de plantas transgênicas (T1), mas com densidades diferentes, e estavam ausentes no controle negativo (Figura 7). Estes resultados indicam que o gene introduzido foi capaz de transcrever mRNA que foi usado como modelo na reação RT-PCR. A técnicas RT-PCR pode ser usada para medir os níveis de RNA, confirmando a presença ou ausência de determinados transcritos. Abdallah et al. (2010), utilizando RT-PCR para detectar a expressão do gene *tomI* em plantas transformadas de tomate, revelando que todas as plantas expressaram mRNA do transgene.

Alguns fatores podem explicar a menor frequência de regeneração da cultivar Santa Clara após a transformação via *Agrobacterium*. As células dos tecidos cotiledonares da Santa Clara mostraram-se mais sensíveis à canamicina. Assim, uma

menor frequência de regeneração, após transformação, pode ser atribuída à sua maior sensibilidade ao antibiótico canamicina.

Em estudos recentes, cotilédones foram utilizados como fonte de explantes para alcançar alta frequência de transformação de tomate (KHOUDI et al., 2009; SARKER, ISLAM, HOQUE, 2009). A capacidade de regeneração pode ser alterada sendo influenciada pelo tamanho e idade do explante, concentração de antibióticos, hormônios (IEAMKHANG, CHATCHAWANKANPHANICH, 2005; VAN, FERRO, JACOBSEN, 2010) e a densidade da co-cultura de *Agrobacterium* utilizada para a infecção também influencia na transformação (GAO et al., 2009).

Segundo Andow et al. (2004), como a inserção gênica é aleatória no genoma, o transgene pode integrar-se em regiões de alta ou de baixa expressão gênica, ou até mesmo dentro de genes endógenos inativando-os, ou adjacentes a eles alterando sua expressão. A recombinação genética que ocorre nas gerações seguintes, dependendo dos loci de inserção, pode causar um desbalanço nos níveis de expressão do gene de interesse e mesmo de genes nativos da planta.

No processo de regeneração *in vitro* dos tomateiros Santa Clara, nenhuma diferença morfológica aparente foi observada nas plantas transgênicas quando comparadas a plantas não transgênicas quatro meses após a transferência das plantas para a casa de vegetação.

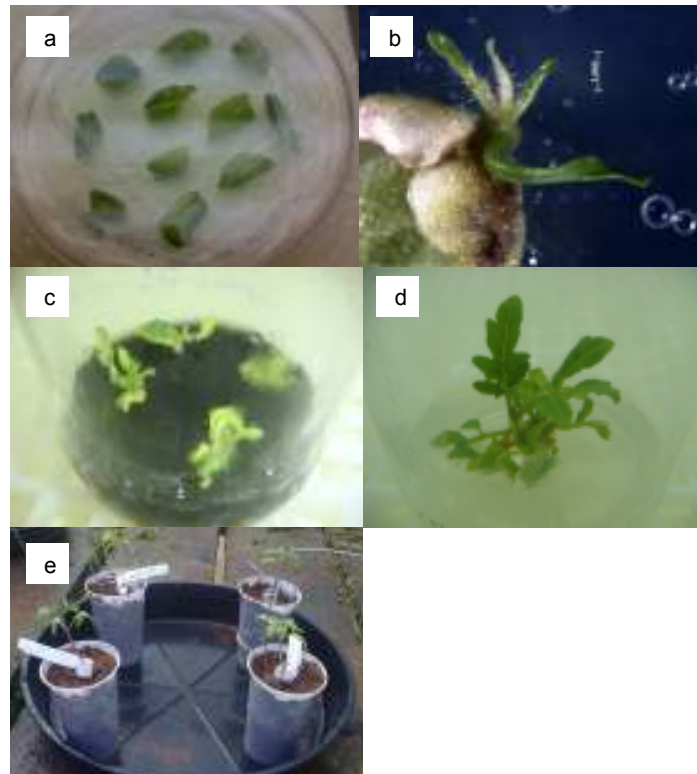
FIGURA

Figura 1 – Diferentes estágios de desenvolvimento dos explantes de tomate transgênico pela regeneração mediada por cotiledone; **a.** explantes cotiledonares Co-cultivados; **b.** Explante em regeneração; **c.** folhas regeneradas; **d.** Enraizamento contendo as raízes secundárias e terciárias; **e.** mudas transgênicas cultivadas em vaso.



Figura 2. Padrão da eletroforese do vetor TOPO TA . M - Marcador de peso molecular 1 kb ladder; 1- Fragmento de *SolChi* próximo a 1000 bp.

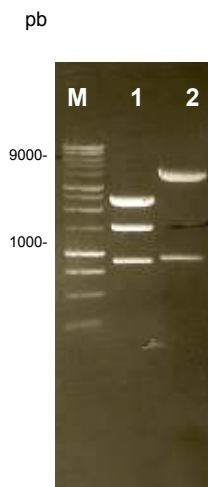


Figura 3. Padrão da eletroforese dos vetores Pbs-35s AMV NOS 2 e pCAMBIA 2300. M- Marcador de peso molecular 1 kb ladder; 1- Fragmento resgatado e purificado do vetor Pbs-35s AMV NOS 2 de aproximadamente 1200bp; 2- Fragmento resgatado e purificado do vetor pCAMBIA 2300 de aproximadamente 8600bp.

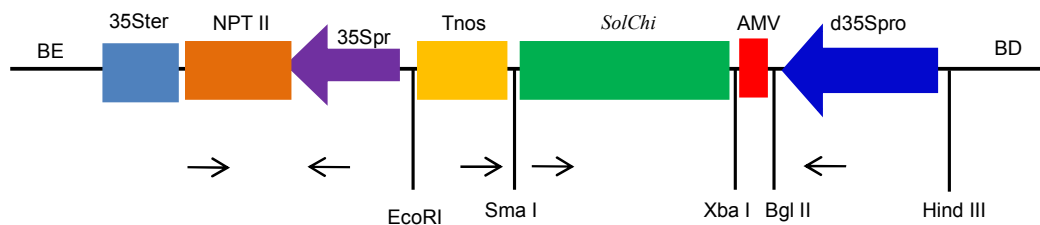


Figura 4. Representação esquemática do T-DNA presente no vetor Pbs-35 s Chi AMV NOS 2, utilizado para transformar folhas de tomate mediado por *A. tumefaciens*. Borda esquerda (BE), terminador 35S (35Ster), gene (npt II) que confere resistência à Canamicina, promotor 35S (35Spr), terminador (nost), cassete de expressão do gene Chitinase (*SolChi*), vírus do mosaico da alfafa (AMV), promotor 35S duplicado (d35Spro), borda direita (BD). Setas representando primers específicos utilizados para confirmação das plantas transgênicas, primers 35S AMV-F, NPT 470c; 35S AMV-F, tnos-R; 35S AMV-F, *SolChi*-R

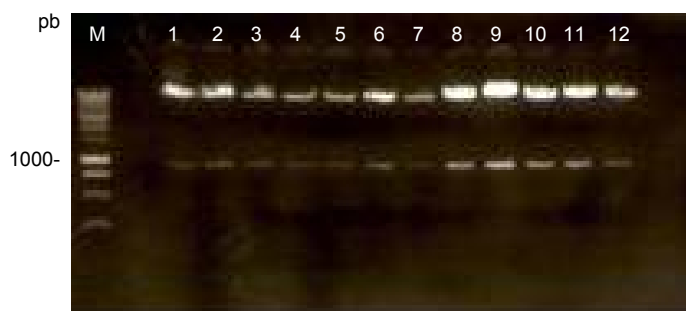


Figura 5. Análises de PCR do tomate. M – Marcador de peso molecular (1 kb Ladder); linhas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 – plantas transgênicas

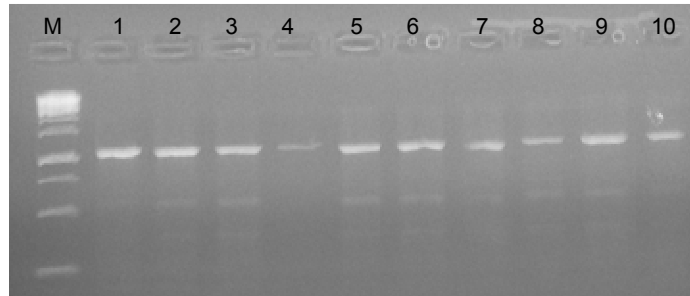


Figura 6 - Análise das prováveis plantas transgênicas (T1) de tomate para a presença do gene de *quitinase*. *M* - marcador (1 kb), *1* controle positivo, *2-10* prováveis plantas transgênicas.

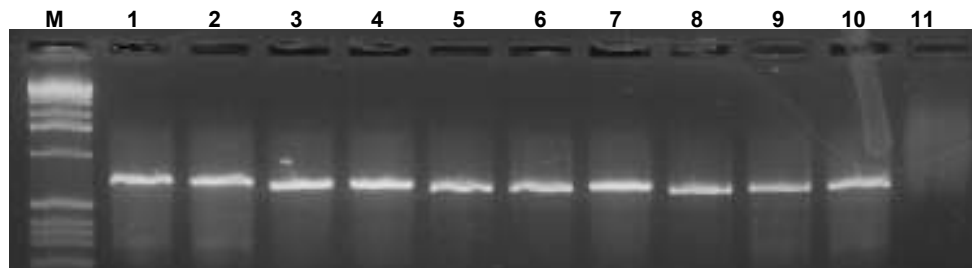


Figura 7 - Análise RT-PCR das prováveis plantas de tomate para a presença do gene de *quitinase*. *M* Marcador (1 kb), *1-10* plantas transgênicas, *11* cultivar Santa Clara convencional (Controle negativo).

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH et al. Stable integration and expression of a plant defensin in tomato confers resistance to fusarium wilt. **GM Crops**, v. 1, n. 5, p. 344-350, 2010.
- ABU-EL-HEBA, G. A.; HUSSEIN, G. M.; ABDALLA N. A. A rapid and efficient tomato regeneration and transformation system. **Agriculture and Forestry Research**, v. 58, p. 103-110, 2008.
- AGRIANUAL 2008. FNP. Consultoria e comércio. Anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2008. 502p.
- ANDOW, D.A., SOMERS, D.A., AMUGUNE, N., ARAGÃO, F.J.L., GHOSH, K., GUDU, S., MAGIRI, E., MOAR, W.J., NJIHIA, S. AND OSIR, E. (2004) Transgene Locus Structure and Expression of Bt Maize, pp. 83-116. In: Hilbeck, A. and Andow, D.A. (eds) *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms Volume 1: A Case Study of Bt Maize in Kenya*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- BARBOSA-MENDES, J. M.; FILHO, F. de A. A. M.; FILHO, A. B.; HAKAKAVA, R.; BEER, S. V.; MENDES, B. M. J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with *hrpN* gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. *Scientia Horticulturae*, v. 122, n. 1, p. 109-115, 2009.
- BLANCARD, D. Enfermedades del tomate: observar, identificar, luchar. **Montfavet: Inra**, p. 212, 1996.
- BOAVA L. P.; KUHN O. J.; PASCHOLATI S. F.; DI PIERO R. M.; FURTADO E. L. Atividade de quitinases e peroxidases em folhas de eucalipto em diferentes estágios de desenvolvimento após tratamento com acibenzolar-S-metil (ASM) e inoculação com *Puccinia psidii*. **Tropical Plant Pathology**. v. 35, n.2, p. 124-128, 2010.
- CAVALCANTI F. R. et al. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesq agropec bras**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1721-1730, 2006.
- COSTA et al. Transformação genética de cultivares de tomateiro industrial mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. **Revista Brasileira Fisiol. Vegetal.**, v. 12, n. 2, p. 107-118, 2000.
- DIAS, B. B. A.; CUNHA, W. G.; MORAIS, L. S.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L.; CAPDEVILLE, G.; ARAGÃO, F. J. L. Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology** v. 55, 187-193, 2006.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p, 1996.
- GAO et al. Influence of bacterial density during preculture on *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 98, p. 321–330, 2009.

Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S. & Hoekema, A. (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research* 2, 208-218.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. LSPA: Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro v.24 n.04, 124p, abr. 2011. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201104.pdf

IEAMKHANG S.; CHATCHAWANKANPHANICH O. Augmentin as an alternative antibiotic for growth suppression of *Agrobacterium* for tomato (*Lycopersicon esculentum*) transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 82, p. 213–220, 2005.

IQBAL, M. M.; NAZIR, F.; ALI, S.; ASIF, M. A.; ZAFAR, Y.; IQBAL, J.; ALI, G. M. Over Expression of Rice chitinase Gene in Transgenic Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Improves Resistance Against Leaf Spot. **MOLECULAR BIOTECHNOLOGY**. v. 50, n. 2, 129-136, 2012.

KAUR P.; BANSAL K. C. Efficient production of transgenic tomatoes via *Agrobacterium*-mediated transformation. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 2, p. 344-348, 2010.

KHOUDI H.; NOURI-KHEMAKHEM A.; GOUIAA S.; MASMOUDI K. Optimization of regeneration and transformation parameters in tomato and improvement of its salinity and drought tolerance. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 22, p. 6068-6076, 2009.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. P. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v. 2, p. 607- 626, 2005.

LOPES C. A.; ÁVILA A. C. *Doenças do tomateiro*. Brasília: Embrapa Hortaliças. p. 151, 2005.

MONTEIRO-HARA, A. C. B. A.; JADÃO, A. S.; MENDES, B. M. J.; REZENDE, J. A. M.; TREVISAN, F.; MELLO, A. P. O. A.; VIEIRA, M. L. C.; MELETTI, L. M. M.; PIEDADE, S. M. DE S. Genetic Transformation of Passionflower and Evaluation of R₁ and R₂ Generations for Resistance to *Cowpea aphid borne mosaic virus*. **Plant Disease**. v. 95, n. 8, p. 1021-1025, 2011.

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

ROHINI, V.K.; RAO, K.S. Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease. **Plant Science**, Limerick, v. 160, n. 5, p. 889-898, 2001.

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**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 451-454, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press., v. 3.

SAMBROOK, J; ROUSSEL, D. W. (2001). Molecular Cloning: a laboratory manual. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SARKER, R. H.; ISLAM K.; HOQUE, M. I. *In vitro* Regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Plant Tissue Cult. & Biotech.** v. 19, n. 1, p. 101-111, 2009.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos e defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ, cap 6, p. 227-248, 2008.

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, p. 102-106, 2010.

VAN, D. T.; FERRO, N.; JACOBSEN H.-J. Development of a simple and effective protocol for *Agrobacterium tumefaciens* mediated leaf disc transformation of commercial tomato cultivars. **GM Crops**, v. 1, n. 5, p. 312-321, 2010.

YAMAMOTO, T. et al. Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 7, p. 639-646, 2000.

ZAREIE, R.; MELANSON, D. L.; MURPHY, P. J. Isolation of fungal cell wall degrading proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves infected with *Rhynchosporium secalis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 15, n. 10, p. 1031-1039, 2002.

CONCLUSÕES GERAIS

Diante das condições experimentais e pelos resultados obtidos durante o trabalho pode-se concluir que:

Os dados gerados pelos marcadores moleculares RAPD e IGS utilizando as três raças de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, possibilitaram demonstrar a formação de dois agrupamentos, mostrando que as raças 1 e 2 tem mais similaridade.

A PCR-RAPD de quatro *primers* (OPB07, OPA08, OPA 18, OPA 20) revelaram um fragmento presente apenas na raça 3, sugerindo potencial utilização como marcadores moleculares.

Foi possível detectar que o gene *SolChi* está presente em única cópia no genoma da cultivar BHRS de tomate.

O ataque do fungo (*Fol*) promoveu a expressão diferencial de quitinases que foi encontrada no tecido radicular do tomateiro (cultivar BRHS), sugerindo a participação no processo de defesa perante o fungo.

A transformação genética de *Solanum lycopersicum* é um processo viável, sendo possível a obtenção de plantas transgênicas com a construção genica contendo o gene *SolChi*, podendo resultar em uma maior resistência a doença causada pelo fusário.

Anexos

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Scope of the Journal

The aim of the *Journal of Plant Pathology* (JPP), an international journal of the Italian Society for Plant Pathology, is to publish results of research on fundamental and applied aspects of plant pathology. Contributions in the field of mycology, bacteriology, virology, physiological plant pathology, plant-parasite interactions, post-harvest diseases, non-infectious diseases, and plant protection are welcome. Articles on pesticide screening and screening for resistance to pathogens are generally not accepted. Surveys for diseases or pathogens should be submitted as “Short communications”

Editorial Policy

JPP is open to publication of papers by members and non-members of the Italian Society for Plant Pathology. Manuscripts submitted for publication will be considered on the assumption that the same or similar work has not been or will not be published elsewhere. Accepted papers become copyright of the Journal.

There is no page charge (except for colour figures). The authors will receive 25 offprints free of charge.

Submission of papers

JPP encourages authors to submit manuscript on-line to:
<http://www.sipav.org/jpp>

Our system allows for easy author registration procedures and submission of papers and will speed up the review and acceptance time. No printed or CD versions of papers will be required anymore. Submission of hard-copy manuscripts will not be handled, as well as papers sent by e-mail to the Editorial Office.

Papers should be submitted as single PDF files not exceeding 1 MB, with double line spacing and continuous line numbering. Figures and tables must be placed at the end of the file, not within the text.

The authors must carefully read the Conditions of Use and the Instructions for Authors before submitting their paper. The Instructions for Authors are also available on the JPP web site (<http://www.sipav.org/jpp>) together with the Instructions for on-line submission.

Types of papers

The JPP welcomes:

Standard “full-length” papers (Research papers). As a rule, they should not exceed 6000 words (not including references and tables) and contain no more than ten tables and figures combined. Standard papers are divided into the following sections: Summary (not exceeding 250 words), and Key words (not exceeding five and not appearing in the title); Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References. Some flexibility in layout is allowed for papers that cannot be presented in conventional form. For instance, a combined Results and Discussion section is permitted.

Short communications. These are intended for reporting brief complete pieces of work, not for preliminary results. Short communications should not exceed 2500 words and contain no more than six figures and tables combined. The text is not divided into sections, except for a short Summary, not exceeding 200 words, and Key words, Acknowledgements and References.

Disease notes. They are intended for new or unusual records in abstract forms, with one or two references. Their length should not exceed 250 words.

Review papers. As a rule, review articles on specific subjects are invited. Offered reviews may be considered, but the authors should contact the Editor-in-Chief in advance.

Format

All papers must be written in English. We strongly suggest to ensure that the language is corrected before submission.

The International System of units (SI) must be adopted for all numerical data. Whenever abbreviations are to be used, the names should be given initially in full with the abbreviation in parentheses, *e.g.* polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), Tobacco mosaic virus (TMV). The CBE manual *Scientific Style and Format* (6th edition, Cambridge University Press) is recommended as a reference for style and conventions.

Double spacing and continuous line numbering should be used throughout the text and in the figure legends.

Title page.

This page should contain:

TITLE OF THE PAPER (capital letters, bold. Preferred font, Times New Roman 14);

Author(s) name (initials and family name, low case, bold, Times New Roman 12);

[*Affiliation(s) and full address(es)* of all author(s), italics, Times New Roman 11];

Running title: A meaningful, 5-6 word-long short title (Times New Roman 12)

Corresponding author: name (Times New Roman 12)

fax number :

e-mail address:

SUMMARY. The Summary (max 250 words, Times New Roman 12) should be concise and briefly describe the scope of the research, the major results and conclusions. No references should be cited in it. It should not contain references.

INTRODUCTION. This section should give background information on the extant study in a concise form. Extended review of the subject should be avoided as well as any anticipation of results.

MATERIALS AND METHODS. The Materials and Methods section is divided into subsections. It should give enough information to allow other investigators to repeat the experiments. For standard procedures a reference is sufficient. Only major modifications or novel methods should be detailed. Suppliers of reagents or equipments should be indicated in parentheses. The source of bioreagents (e.g., bacterial strains, virus isolates, antibodies, etc.) should also be specified.

RESULTS. This section may be divided into subsections. The rationale for the experiments and the results should be clear and concise. The interpretation of data should be presented in the Discussion section.

DISCUSSION. The Discussion should give an interpretation of the results, related to previous work. It should not be a mere repetition of the results. Results and Discussion sections may be combined.

ACKNOWLEDGEMENTS. Optional. Beside personal recognitions, it may contain the source of financial support obtained for the study.

REFERENCES. Literature citations in the text should be in parentheses, giving the author's name and date, and using *et al.*, when the number of authors exceeds two [e.g. (Smith, 1994); (Smith and Pearson, 1991); (Smith *et al.*, 1995)]. Citations of personal communications and unpublished data are allowed, but only when strictly necessary. References must be listed in alphabetical order by first author and written in the following formats according to where they are from:

Journal

Elad I., Volpin H., 1991. Heat treatment for the control of rose and carnation grey mould. *Plant Pathology* **40**: 278-286.

Book

Abel F.B., Morgan P.W., Saltveit M.F., 1992. Ethylene in Plant Biology. 2nd Ed. Academic Press Inc., San Diego, USA.

Book chapter

Alleweldt G., 1987. The contribution of grapevine breeding to integrated pest control. In: Cavalloro R. (ed.). Integrated Pest Control in Viticulture, pp. 369-377. A.A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands.

Thesis or Dissertation

Hammer P., 1992. Mechanisms of resistance to infection by *Botrytis cinerea* in rose flowers. Ph.D. Thesis. Pennsylvania State University, University Park, USA.

Proceedings

Mortensen K., Makowsky R.M.D., 1989. Field efficacy of different concentrations of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae* as a herbicide for round-leaved mallow (*Malva pusilla*). In: Delfosse E.S. (ed.). *Proceedings of the 7th International Symposium on Biological Control of Weeds, Rome 1988*: 523-530.

Tables. Tables should have a concise title and, if necessary, a footnote. A single grid is preferred for each table. If grids are not used, tabs and not spaces should be used to align columns. The preferred format for tables is MS Word.

Figures. Figures should be sized to fit in the column(s) of the Journal and should be submitted at their intended publication size. They are provided as PDF files only when submitted for reviewing to minimize file size. When the paper is accepted, quality digital files must be provided. The minimal resolution should be 300 dpi. TIFF or PowerPoint formats are preferred. In some cases a printed copy of the figures may be requested. To avoid font problems, a single font should be used throughout. Fonts as Arial, Helvetica, Symbol, Times New Roman are preferred.

Photographs. Photographs should be well contrasted, with non essential areas removed. For micrographs, a magnification bar must be included. There is a charge for colour photographs. Please contact the Editorial Office for rates.

Line drawings. These should be submitted as high-quality computer-generated figures. However, in some cases a printed copy of the figures may be requested. Symbols and line thickness should be clear. Shading should be avoided, as it may be difficult to reproduce.

Figure legends. These should give enough information to make the figure understandable and should be concise and self-explanatory. Detailed experimental procedures must be described in the Materials and methods section and not in a legend. All symbols reported in the figure must be defined, together with abbreviations not reported in the text.

Sequence data. Manuscripts containing sequence data should include the relative accession number from a recognized nucleotide database. Diagrams of nucleotide and amino acid sequences should fit in the column(s) of the Journal. Characters should be 6-8 points.

Virus nomenclature. Virus names should be given accordingly to the standard rules set by the International Committee on Taxonomy of Viruses. Names of established species, genera, families and orders must be written in italics with capital initials. Tentative and unassigned species are written in roman type with capital initial.

Processing of papers.

All papers will be peer reviewed by two or more referees. In the online submission, manuscripts can be sent to the Editorial Office, who will choose the appropriate Editor. Alternatively, authors can select the Senior Editor who will be in charge of handling their manuscript in the category field. In both cases a reference number will be assigned to the paper. After preliminary examination by the Senior Editor to ascertain if the paper is in line within the scope of the Journal, submitted papers will be assigned to Associated Editors for further processing. Papers will be accepted by Senior Editors acting upon the advice of Associated Editors. After processing and acceptance, papers are taken in charge by the Editorial Office to check their conformity to the JPP standards.

Proofs are sent by e-mail as PDF files. Corrections of proofs will be restricted to publisher's errors only. Substantial alterations will be charged to the authors. The PDF file should be printed and corrections marked on the printed copy. Corrected proof should be mailed or sent by fax (+39. 080. 5442911) to the Editorial Office within three days. Minor corrections can be communicated by e-mail (jpp@sipav.org).

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

1. General Scope

The Journal of Phytopathology publishes original scientific articles, short communications and review articles on all aspects of phytopathology on the population, organism, physiological, biochemical and molecular genetic level. Particularly, the journal scope is on the pathology and epidemiology of plant diseases caused by microbial pathogens, viruses and nematodes, the mechanisms and potential to induce damage to plants and the means of control. Accepted papers should advance the conceptual knowledge on plant diseases, rather than presenting descriptive or screening data unrelated to biological mechanisms or functions. Manuscripts presenting results from unrepeatable experiments or data with no or inappropriate processing will not be accepted. Authors are encouraged to look at past issues of the *Journal of Phytopathology* to adjust their papers to the actual standards of the journal.

2. Submission and Acceptance of Manuscripts

2.1. English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp.

All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Important note: Eligibility of manuscripts for the review process requires English language quality according to the international scientific standards.

2.2. Online Submission

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site ScholarOne Manuscripts. For assistance, contact:

Dr. Sabine von Tiedemann
Journal of Phytopathology
Editorial Office
E-mail: stiedem@gwg.de

The names and e-mail addresses of all co-authors should be added to the form in ScholarOne Manuscripts.

For the review process the names and email addresses of four potential reviewers should

be proposed. The requirements for potential preferred reviewers are that they should:

- be familiar with the scientific topic of the submitted manuscript
- be internationally recognized scientists
- operate in a different institution and/or country than the authors

When using ScholarOne Manuscripts, please, note the following:

- With your personal password you can access the 'Author Center' in ScholarOne Manuscripts any time to check the status of your manuscript
- Revised manuscripts must be uploaded within 2 months of authors being notified of conditional acceptance.

3. Requirements for Manuscripts

3.1. Manuscript Format and Organization

Manuscripts should be uploaded as Word or Rich Text Format files. In addition, high-resolution figure files (see below) are requested to be submitted as separate files. Times New Roman or Arial font size 12 and double spacing should be used. Lines must be numbered throughout the main document.

Short Communications and Original Articles must include Heading, Keywords, Abstract, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion and References. Legends of figures and tables should be added to the main document. In a Short Communication Results and Discussion sections should be merged to one chapter. Review Articles comprise an abstract followed by Introduction and a running text structured in a suitable way according to the subject treated. A final section with conclusions may be added. Before preparing and submitting a review article authors should contact the Editor-in-Chief or the Associate Editors.

The heading of an article includes a short title (running head), followed by the name of the institution where the research work was mainly carried out (*italicized*), the title, the authors' names and the authors' addresses including the e-mail address of the corresponding author. Please provide given names in full for all authors.

Manuscript length (including tables and figure captions) for different types of contribution or parts of the article is the following: Short Communication - 1,500 words, Original Article - 12,000 words, Review Article - on personal arrangement with the editor, Short Title (Running Head) - 60 characters.

Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the submission format will be unsubmitted and returned to the author.

3.2. Units, Abbreviations and Nomenclature

All measurement specifications must follow the S.I. system. Other abbreviations should only be employed if they are recognised internationally. All biological and chemical terms used should be according to the current international nomenclature. Substances or reagents obtained commercially, when first mentioned in the text, must include the name and address of the manufacturer or supplier. Only botanical and zoological terms in Latin are printed in *italics*. The full name must be provided when first used in the article.

3.3. Tables and Figures

Number and size of tables and figures should be kept to a minimum. Each table and figure must have a reference in the text. Numbering of tables and figures must follow their order of appearance in the paper. Captions of figures and table headlines should give a precise description of the content and be self-explanatory. Tables and figure captions are added in the same file at the end of the main document.

The width of tables is limited to 120 characters including blanks. Tables should be created using the table function. Graphs with x and y axes should not be enclosed in frames or have background stain or grids (only 2-dimensional representations should be used).

Line drawings should only be contour drawings without halftones (shades of grey). Rough hatching is possible, patterns are not suited.

Figures should be loaded as EPS (lineart), JPEG or TIFF (halftone/colour graphs) files only to the online submission system. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable. Figures (and scans) should have a minimum resolution of 400 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings).

Detailed information on digital illustration standards is available at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Electronic artwork should be checked before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/echecklist.asp>

Figures will generally be reduced in size to fit within the column-width or the print area. Numbering, labeling and scale bars on figures, photographs or micrographs must still be readable at reduced size.

Colour figures are charged at £150 plus VAT for the first figure. All subsequent figures are charged at £50 each plus VAT. Colour figures can be reproduced in black and white (with possible loss of contrast). Colour figures only published in the online version of the article are free of charge. Manuscripts including colour figures require submission of the Colour Work Agreement Form. To avoid any confusion a Colour Work Agreement Form indicates how the colour figures should be processed online and in print is requested. Should you wish for the figures to be printed in colour, please post or courier all pages of your completed form to the production editor. Note that electronic or faxed copies cannot be accepted. For queries, please contact the production editor of the journal. Contact details has been provided below.

3.4. References

References in the text should be cited by author and date (Harvard system), e.g. (Johnston and Jones 1997). More than two authors are referred to as follows (Boerema et al. 1986).

Reference to unpublished research work is referred to in the text as e.g. (T. Adams,

personal communication). Reference to accepted publications or to papers in press may require the author(s) to provide the manuscripts or the link to access the paper if pre-published online.

At the end of the paper, references should be listed alphabetically according to the first named author. The following formats should be used:

For journal references:

Author. (Year) Title. International Abbreviation of the Journal Issue:Page Range.

Dubuis PH, Marazzi C, Stadler E, Mauch F. (2005) Sulphur deficiency causes a reduction in antimicrobial potential and leads to increased disease susceptibility of oilseed rape. *J Phytopathol* 154:27-36

For book references:

Author. (Year) Title. Town, State, Country, Publishing House.

Erwin DC, Ribeiro OK. (1996) *Phytophthora Diseases Worldwide*. St Paul, MN, USA, APS Press.

For edited book references:

Author. (Year) Title of Chapter. In: Editors (eds) Book Title. Town, Publishing House, Page Range.

Okami Y, Hotta K. (1988) Search and discovery of new antibiotics. In: Good-fellow MS, Williams T, Mordarski M. (eds) *Actinomycetes in Biotechnology*. London/NewYork, Academic Press, pp 33-67.

For thesis references:

Author. (Year) Title. Town, State, Country, University, Thesis.

Al-Kiyumi KS. (2006) *Greenhouse cucumber production systems in Oman: A study on the effect of cultivation practices on crop diseases and crop yields*. Reading, UK, University of Reading, PhD Thesis.

For references to proceedings of conferences:

Author. (Year) Title of the contribution. Title of the proceedings. Town, State, Country, Page Range.

Zielenski D, Sadowski CA. (1995) Preliminary study on *Verticillium dahliae* Kleb in winter oilseed rape in Poland. In: Murphy D. (ed) *Proc 9th Intern Rapeseed Conference*, 4-7 July 1995. Cambridge, UK, GciRC, pp 649-651.

For website references:

Author. (Year) Title of the contribution. Title of the proceedings. Internet Page (date of verification).

Clear R, Patrick S. (2007) *Fusarium head blight in western Canada: The distribution of F. graminearum and soil zones on the prairies*. Internet Resource: http://grainscanada.gc.ca/Pubs/fusarium/maps_graminearum-e.htm (verified Aug 10, 2007).

For references the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting is recommended.

EndNote reference styles can be searched for here:

<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here:

<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

3.5. Supporting Information

Supporting information, such as data sets or additional figures or tables, that will not be published in the print edition of the journal, but which will be viewable in the online edition, can be submitted separately.

The presentation of Supporting Information should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supporting Information' and providing titles of figures, tables, etc. The Supplementary Information is an integral part of the article and will be included in the review process accordingly.

4. Author Services

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript.

Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

5. After Acceptance of the Manuscript

5.1. Copyright Transfer Agreement and Colour Work Agreement Forms

Authors of accepted papers will be required to sign a Copyright Transfer Agreement Form (CTA) and in case of any submitted colour figure a Colour Work Agreement Form (CWA).

5.1.1. CTA Submission

Signature of the CTA is a condition of publication and papers will not be forwarded to production unless an original, handwritten signed form has been received. Original CTA form should be sent to the following mailing address:

Professor Andreas von Tiedemann
Department of Crop Science
Plant Pathology and Crop Protection Division
University of Göttingen
Grisebachstr. 6
37077 Göttingen
Germany

Please note that signature on the CTA does not affect ownership of copyright in the material. (Government employees need to complete the Author Warranty sections, although copyright in such cases does not need to be assigned). After submission

authors will retain the right to publish their paper in various media/circumstances (please see the form for further details).

5.1.2. CWA Submission

Please post or courier all pages of the completed colour work agreement form to the production editor. Note that electronic or faxed copies cannot be accepted. Original CWA form should be sent to the following mailing address:

Production Editor
Journal of Phytopathology
Journal Content Management
Wiley-Blackwell
John Wiley & Sons Singapore Pte. Ltd.
1 Fusionopolis Walk
#05-01 Solaris South Tower
Singapore 138628

For queries, please contact the production editor of the journal at jph@wiley.com

5.2. Proof Reception and Correction

Once a copy-edited and typeset proof of the accepted manuscript is available from the typesetter's e-proofing site, an email will be sent to the author and will feature instructions on how to check the proof and return corrections.

6. Publication

6.1. Early View

Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. For copyright purposes, the PDF version mounted online is considered the definitive version rather than the full-text HTML.

The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. For more information on DOI, please click [here](#).

Early View differs from other advance-of-print systems because it features fully complete articles, with full colour figures, all tables and active reference linking through PubMed and Crossref.

6.2. Reprints and Offprints

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author

Services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields: http://offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE_ID=bw&FID=USER_HOME_PG

If you have queries about paper offprints please e-mail offprint@cosprinters.com

6.3. OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete both the online payment form AND the CTA form available from our website at:

https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp (Please note this online form is for OnlineOpen use ONLY)
<http://media.wiley.com/assets/1540/86/ctaaglobal.pdf> (CTA form; please send this to the Production Editor)

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

7. Author Material Archive Policy

Please note that unless specifically requested Wiley-Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or Production Editor as soon as possible if you have not yet done so.