

EXPRESSÃO DE UMA QUITINASE DE
Metarhizium anisopliae **EM *Nicotiana***
tabacum: **OBTENÇÃO DE PLANTAS**
TRANSGÊNICAS RESISTENTES A
DOENÇAS FÚNGICAS

Marcelo Fernando Kern

Porto Alegre, 2003

EXPRESSÃO DE UMA QUITINASE DE
Metarhizium anisopliae **EM *Nicotiana tabacum*:**
OBTENÇÃO DE PLANTAS
TRANSGÊNICAS RESISTENTES A
DOENÇAS FÚNGICAS

Marcelo Fernando Kern

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Giancarlo Pasquali

Porto Alegre, 2003

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aqui às pessoas que participaram dos quase três anos de desenvolvimento deste trabalho, dando contribuições de natureza acadêmico-científica ou nem tanto, mas que certamente tornaram o ambiente e a execução deste mestrado um verdadeiro prazer.

Ao Gian, que me deu a oportunidade de prosseguir com este tema para presente Dissertação, por ter proporcionado as condições de liberdade de trabalho e me dado forças para entrar neste fantástico mundo que é a arte da bioquímica de proteínas, até então novo para mim.

Aos professores Augusto Schrank e Marilene H. Vainstein, que disponibilizaram a estrutura de seus laboratórios para a viabilização de muitos experimentos, especialmente à profa Marilene, pela valiosa colaboração inicial neste trabalho e que permitiu que eu passasse uma temporada em seu laboratório sob a tutela da Márcia e da Carol.

À profa. Sídia Callegari-Jacques, pelo auxílio na análise estatística.

À profa. Aida T. Matsumura, do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia (UFRGS) por ceder os fungos fitopatogênicos para a realização dos ensaios de patogenicidade.

Ao prof. Marcelo G. de Moraes, por ceder a estrutura de salas de cultura junto ao Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia (UFRGS) para a execução de tais experimentos.

Ao prof. João A. P. Henriques, por ceder o termociclador e outros equipamentos inúmeras vezes, bem como pelos ‘empréstimos’ de reagentes.

Às professoras Maria Helena B. Zanettini e Helga Winge, que permitiram a utilização da casa de vegetação e da câmara de cultura do Departamento de Genética para a aclimação das plantas.

À técnica de laboratório Sílvia Richter, por ter salvado as minhas culturas vegetais das contaminações por fungos.

Às doutorandas Márcia da Silva e Caroline de Moraes, que me apresentaram mais de perto às quitinases, SDS-PAGEs, ensaios enzimáticos e tudo mais, incluindo as risadas. À Carol, pelos nossos muitos finais-de-semana no Biotech, plantões e lanches no McDonald's.

Aos meus amigos e colegas do laboratório: Adriane, Arlete, Ana Paula Frazzon, Cleidy, Débora, Jacque, Heique, Philipe, Felipe Maraschin, Felipe de Felippes, pelos muitos momentos de risos, comilanças na hora do café, babados fortíssimos e veneninhos destilados.

À Dra Juliana S. de Nonohay, pelo empréstimo de bibliografia.

Um especial agradecimento aos demais integrantes do '*núcleo fashion do Biotech*' que merecidamente são: Cleidy, Jacque e Heique, pelas muitas visitinhas às lojas do ciclo básico e por ficarem de olho nas novas tendências, e principalmente porque ser *fashion* dá muito trabalho.

À amiga do além-mar, Alexandra Abreu da Silva, pelas dicas para *Western* e *Southern blots*.

Aos secretários do PPG em Genética e Biologia Molecular, Elmo Cardoso e Ellen, por sua eficiência.

À minha família, por tudo.

Este trabalho teve o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Sumário

Capítulo 1: Introdução e Objetivos	06
Capítulo 2: Revisão Bibliográfica	10
A Transformação genética vegetal mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	11
Fungos Filamentosos como fonte de genes para a transformação genética vegetal	13
<i>Metarhizium anisopliae</i> e o Controle Biológico	13
Quitinases: ação catalítica e classificação	15
Quitinases de <i>Metarhizium anisopliae</i>: genes e enzimas	17
Plantas transgênicas expressando quitinases	19
Capítulo 3: Manuscrito	26
Capítulo 4: Discussão Geral, Conclusões e Perspectivas	59
Referências Bibliográficas Capítulos 1, 2 e 4	67
Resumo	77
Abstract	78
Anexo 1: Resultados não apresentados no manuscrito	79

Capítulo 1

Introdução e Objetivos

1 Introdução

Na agricultura moderna, em que a monocultura é a norma, milhares de indivíduos da mesma espécie convivem em grande proximidade física, o que constitui uma situação ecologicamente instável e que oferece uma arriscada oportunidade à invasão das lavouras por microrganismos patogênicos, plantas invasoras e insetos-praga. Com o objetivo de garantir os altos níveis de produção, mantendo as condições fitossanitárias das plantas cultivadas, diferentes agroquímicos são aplicados contra os mais diversos tipos de pragas e doenças que, ainda hoje, destroem cerca de 33% de toda a produção agrícola. Metade deste valor se deve à incidência de doenças fúngicas. Entretanto, o uso de agroquímicos também resulta em acréscimo de custos à produção, além de significantes problemas à saúde e ao meio ambiente. Estimativas apontam um crescimento em torno de 1.900% na quantidade de agroquímicos liberados no ambiente nos últimos 50 anos (Hall, 1991; Logemann & Schell, 1993).

Está claro que a prática agrícola que inclui o emprego de agroquímicos não pode ser sustentada se o preço deste sucesso for a destruição do meio ambiente e da saúde dos agricultores, além do encarecimento da própria prática. No entanto, são reduzidas as alternativas disponíveis para substituir a monocultura com o mesmo grau de produtividade a curto prazo, mesmo que se mantenha a busca por modos ecológicos de controlar plantas invasoras, insetos e microrganismos patogênicos.

A transformação genética de plantas, associada aos programas convencionais de melhoramento vegetal, tem comprovado tratar-se de uma importante ferramenta que pode trazer contribuições significativas à agricultura sustentável, por superar as barreiras de isolamento genético entre espécies e possibilitar que a transferência de genes de interesse ocorra de maneira mais ampla, entre indivíduos filogeneticamente afastados, como plantas e fungos. Este esforço inclui, entre outros, a geração de cultivares tolerantes a herbicidas, a descoberta de biopesticidas para o uso como agentes de controle biológico e a produção de plantas livres de doenças, como plantas resistentes a insetos e a microrganismos patogênicos (Herrera-Estrella & Chet, 1999).

Considerável interesse tem sido dedicado às propriedades biopesticidas das enzimas quitinolíticas, devido à capacidade de atuarem como agentes de defesa contra organismos quitinosos, como fungos e insetos. A resistência conferida pelas quitinases em plantas expressando estas enzimas é explicada por danos causados a estruturas vitais destes organismos, como a membrana peritrófica ou a cutícula de insetos, e a parede celular de

fungos patogênicos ou, ainda, por meio da liberação de compostos derivados destas estruturas e que podem estimular mecanismos de defesa presentes no próprio vegetal. Outra vantagem da utilização destas enzimas é o fato de que a quitina está ausente em plantas, o que garante a especificidade contra organismos invasores ou predadores. Além disto, alguns trabalhos relatam a resistência de plantas expressando quitinases contra um amplo espectro de patógenos (ver Seções 2.2.2 Quitinases: ação catalítica e classificação e 2.3 Plantas transgênicas expressando quitinases).

Alguns trabalhos descrevem o aumento de resistência a *Rhizoctonia solani* em diferentes espécies vegetais, quando estas plantas são transformadas com genes codificadores de quitinases (ver Seção 2.3 Plantas transgênicas expressando quitinases). Este microrganismo é um basidiomiceto fitopatógeno presente no solo e que provoca o apodrecimento das raízes, a ferrugem nas plântulas e que produz lesões com bordas amareladas e centros marrom-escuros, denotando necrose nas folhas de plantas infectadas. Este patógeno possui um amplo espectro de hospedeiros como tomate, tabaco, canola e algodão, além de monocotiledôneas como arroz e grama (Lorito et al., 1998; Patil et al., 2000; Datta et al., 2001; Chai et al., 2002). Outra interessante característica deste fungo é a sua já bem descrita sensibilidade às quitinases, especialmente aquelas derivadas de *Trichoderma harzianum* (Samuels, 1996; Herrera-Estrella & Chet, 1999; Patil et al., 2000). Todas estas evidências tornam *R. solani* um candidato bastante promissor para se testar o potencial protetor de um novo gene codificador de quitinase.

Os genes codificadores de quitinases utilizados nos trabalhos de engenharia genética têm origens bastante diversificadas como outras plantas, bactérias, insetos e fungos filamentosos. Embora *Metarhizium anisopliae* seja amplamente utilizado no controle biológico de insetos-praga e produza uma grande quantidade de quitinases cuja função seria permitir a penetração ativa das hifas na cutícula de artrópodes, não existem relatos na literatura sobre a utilização deste fungo como fonte de genes para a transformação genética vegetal com vistas à produção de plantas transgênicas resistentes a fungos ou insetos.

Este trabalho teve por objetivo geral testar a capacidade de um gene codificador de quitinase, isolado do fungo entomopatogênico e acaricida *M. anisopliae*, em conferir resistência a doenças fúngicas em *Nicotiana tabacum*. Foram objetivos específicos do presente estudo:

- 1 Gerar plantas transgênicas de *N. tabacum* contendo o gene *chit1* de *M. anisopliae* e o respectivo grupo de plantas-controle, sem o gene de interesse;

- 2 Verificar o número de cópias do transgene no genoma das plantas transformadas e a estabilidade da sua herança na progênie destas;
 - 3 Determinar os níveis de enzima recombinante CHIT42 presente nos tecidos foliares das plantas transgênicas;
 - 4 Testar os níveis de atividade catalítica específica da enzima recombinante contra diversos substratos sintéticos;
 - 5 Desafiar as plantas transgênicas da geração parental e da progênie com o fitopatógeno *R. solani*, avaliando suas resistências e/ou suscetibilidades à infecção.
-

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2 Revisão Bibliográfica

2.1 A Transformação genética vegetal mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação genética por *Agrobacterium tumefaciens*, que na natureza causa crescimentos celulares neoplásicos em tecidos vegetais, resulta da transferência de um fragmento específico de DNA (chamado de DNA de transferência ou T-DNA) do plasmídeo bacteriano indutor de tumor (Ti) à célula hospedeira, seguida pela sua integração no genoma da célula vegetal e pela expressão dos genes introduzidos na mesma (Gelvin, 2000; Tzfira & Citovsky, 2002).

O processo de transformação genética vegetal mediada por agrobactérias pode ser considerado em sete etapas distintas, conforme apresentadas na Figura 1. A maioria destas etapas não requer apenas proteínas bacterianas, mas também fatores protéicos específicos do hospedeiro. São elas (i) o reconhecimento entre as células de *Agrobacterium* e as células vegetais, (ii) a formação da fita-T e (iii) seu empacotamento, (iv) seu transporte intercelular, (v) sua introdução no núcleo da célula hospedeira, (vi) a integração e (vii) expressão dos genes integrados (Tzfira & Citovsky, 2002).

O T-DNA é um fragmento de DNA localizado no plasmídeo Ti e delimitado por duas seqüências repetidas de 25 pares de base, denominadas bordas direita e esquerda. No T-DNA existem genes que, ao serem integrados no genoma da célula vegetal, sintetizam enzimas envolvidas na biossíntese de aminoácidos modificados ou opinas, utilizados pelas agrobactérias como fonte nutricional e sinalização para conjugação bacteriana, e um segundo grupo de genes codificadores de enzimas que sintetizam reguladores de crescimento vegetal (auxinas e/ou citocininas). Estes compostos induzem a proliferação celular, o que gerará um tumor, fenótipo este conhecido como galha-da-coroa ou coroa-da-galha nos processos desencadeados pela infecção por *A. tumefaciens* em vegetais hospedeiros. Nos plasmídios Ti existe, além dos grupos de genes citados, uma série de outros genes responsáveis pela virulência (genes *vir*) das agrobactérias. Versões destes genes estão presentes, também, no DNA genômico da bactéria, denominados de genes *hvr* (Zambryski, 1992; Tzfira & Citovsky, 2002).

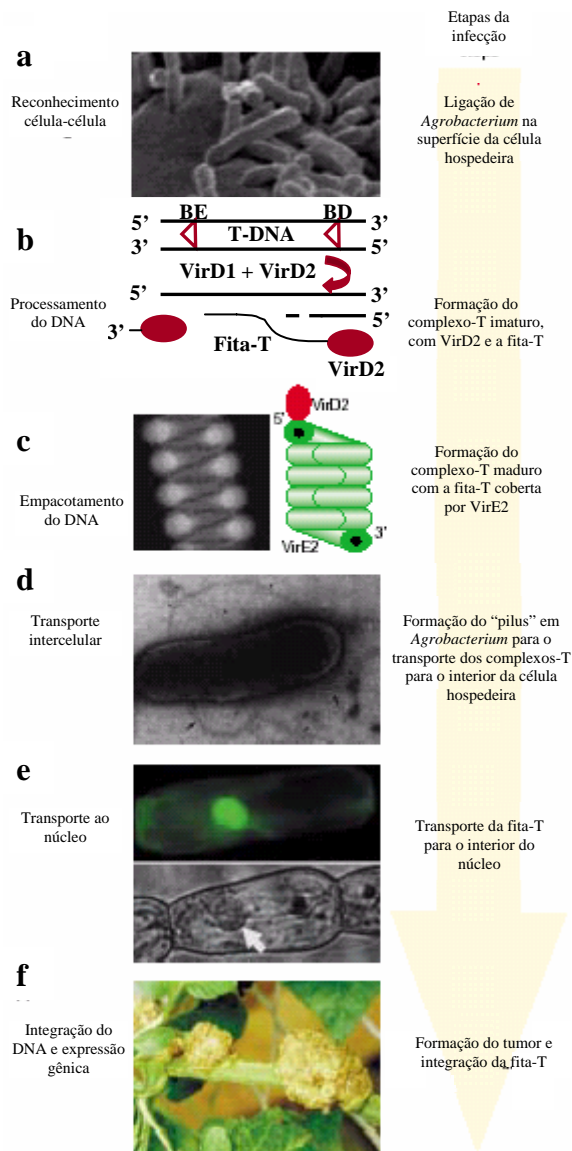


Figura 1. Processos celulares envolvidos nas principais etapas da interação *Agrobacterium*-hospedeiro.

a) Células de *Agrobacterium* colonizando raízes; b) modelo proposto para o processamento do T-DNA; c) empacotamento do DNA: microscopia eletrônica de transmissão e representação esquemática da ligação de VirE2 ao DNA fita-simples, formando o complexo-T maduro; d) célula de *Agrobacterium* produzindo 'pili'; e) transporte ao núcleo: acúmulo no núcleo da célula vegetal do complexo-T marcado por fluorescência; f) integração do T-DNA e expressão dos genes nele contidos: presença de tumores na planta infectada. BE, BD: bordas direita e esquerda do T-DNA. Fonte: Tzfira & Citovsky, 2002.

Na primeira etapa da infecção, ocorre a indução do complexo protéico composto pelas proteínas Vir, ativadas por sinais como acetoseringona, um composto fenólico liberado por tecidos vegetais lesionados. As proteínas VirD1 e VirD2 clivam as bordas do T-DNA na mesma fita, resultando em uma molécula fita-simples de T-DNA (também chamada de fita-T) que, juntamente com outras proteínas Vir, é exportada para o citoplasma da célula vegetal por meio de um canal formado por VirD4 e VirB. A fita-T com uma molécula de VirD2 covalentemente ligada à sua extremidade 5'-fosfato e coberta por muitas moléculas de VirE2, forma o complexo de transporte do T-DNA. Este complexo é, então, transportado para o interior do núcleo da célula vegetal com o auxílio de VirD2 e VirE2, que facilitam, também, direta ou indiretamente, a subsequente integração da fita-T no genoma da célula hospedeira

(Gelvin, 2000; Tzfira & Citovsky, 2002; Zupan et al., 2000). A integração ocorre por recombinação ilegítima e, de acordo com este modelo, ocorre o pareamento de poucas bases em um processo conhecido como micro-homologias, na etapa de pré-anelamento entre a fita-T e o genoma vegetal. Como tais homologias são muito baixas, estas conferem apenas especificidade mínima ao processo de recombinação (de la Riva et al., 1998).

Para se fazer uso da maquinaria das agrobactérias para a transformação de plantas, no entanto, faz-se necessário tornar estas bactérias incapazes de produzir os sintomas patológicos. De acordo com Hooykaas & Mozo (1994), as principais estratégias utilizadas consistem em:

- Desarmá-las, ou seja, eliminar do T-DNA os genes codificadores de enzimas sintetizadoras de reguladores de crescimento vegetal e de opinas;
- Transferir o T-DNA do plasmídeo Ti para um segundo plasmídeo (plasmídeo binário) facilitando, assim, a manipulação dos genes. Isto se faz necessário porque o plasmídeo Ti é muito grande (mais de 100.000 nucleotídeos) e de baixo número de cópias;
- Ligar no T-DNA um gene de interesse mantendo as bordas comuns aos T-DNAs das agrobactérias selvagens.

Entre as possíveis novas qualidades passíveis de transferência aos genomas vegetais, com a utilização da transformação genética de células vegetais por *Agrobacterium*, está a resistência a fungos fitopatogênicos. O grande potencial a ser explorado neste sentido seria a introdução, em plantas suscetíveis, de genes provenientes de fungos (ou outras fontes) produtores de enzimas com alguma ação inibidora/destruidora de componentes estruturais dos organismos invasores. Um exemplo de um gene como este é *chit1* de *Metarhizium anisopliae*, um fungo entomopatogênico e acaricida capaz de secretar diversos tipos de enzimas hidrolíticas, como as quitinases, que atacam a quitina presente em muitas pragas, como insetos, ácaros e fungos.

2.2 Fungos filamentosos como fonte de genes para a transformação genética vegetal

2.2.1 *Metarhizium anisopliae* e o controle biológico

O fungo filamentoso deuteromiceto *Metarhizium anisopliae*, descrito pela primeira vez em 1879 pelo patologista russo Ilya Metchnikoff, possui um amplo espectro de hospedeiros, sendo capaz de infectar mais de 300 espécies de artrópodes (Ferron, 1981). No Brasil, é utilizado em cerca de 60% das plantações de cana-de-açúcar no nordeste para o controle da *Mahanarva posticata* (cigarrinha da cana-de-açúcar), além de apresentar um

enorme potencial para a utilização em insetos-praga nas culturas de arroz, soja e alface (Lopes et al., 2000). Este fungo tem, também, alto potencial de emprego no controle de vetores de doenças humanas como triatomídeos (Messias, 1998, Juarez et al., 2000) e *Glossina* sp (moscas tse-tsé, Kaaya & Munyinyi, 1995). Não obstante, alguns trabalhos descrevem o emprego deste fungo no controle de larvas de *Musca domestica* (mosca, Renn et al., 1999), *Blatella germanica* (barata germânica, Kaakeh et al., 1996), *Vespula vulgaris* (vespa, Harris et al., 2000), *Drosophila melanogaster* (mosca-da-fruta, Lezama-Gutierrez et al., 2000) e *Boophilus microplus* (carrapato, Kaaya et al., 1996; Rand et al., 1989; Frazzon et al., 2000).

Entretanto, para ser bem sucedido no processo de infecção, o fungo deve transpor a primeira barreira à invasão, a cutícula do hospedeiro, de estrutura bastante complexa. O tegumento dos insetos é composto por três camadas principais: a cutícula externa, a camada celular ou epiderme e a membrana basal. A cutícula é constituída de duas camadas: a epicutícula e a pró-cutícula, as quais são consideradas a principal proteção do inseto ao ataque de microrganismos. A epicutícula é uma camada externa e fina, composta por proteínas, lipídeos, ácidos graxos e esteróis. A pró-cutícula constitui a maior parte da cutícula e contém fibras de quitina embebidas em uma matriz protéica associada a lipídeos e quinonas (Clarkson & Chanrley, 1996).

Para superar essas barreiras físicas e iniciar o processo de infecção propriamente dito, os fungos entomopatogênicos que penetram ativamente via tegumento possuem a capacidade de produzir uma variedade de enzimas hidrolíticas como quitinases, proteases e lipases, que viabilizam a ruptura da cutícula e a subsequente invasão do hospedeiro. Uma vez encontradas condições favoráveis de umidade, temperatura, pH, oxigênio e nutrientes, o esporo, unidade infectiva do fungo, germina sobre o inseto, produzindo um tubo germinativo. Na extremidade deste tubo há uma dilatação e diferenciação da hifa em uma estrutura denominada apressório. A penetração da cutícula ocorre por meio da combinação da pressão mecânica exercida pelo apressório e pela ação das enzimas hidrolíticas (St Leger et al, 1986a, 1986b). O processo de infecção dos hospedeiros por esporos de *M. anisopliae* está ilustrado na Figura 2.

Após a penetração através da cutícula do hospedeiro, tem início o processo de colonização. As hifas que atravessam a cutícula do hospedeiro ramificam-se, liberando toxinas e metabólitos secundários que determinam a morte do hospedeiro. Uma destas classes de compostos tóxicos são as destruxinas (DTX), ciclodipepsíptídeos com atividade inseticida. Os sintomas causados nos insetos são a paralisia, a perda da sensibilidade e a

incapacidade de coordenação dos movimentos, uma vez que as DTXs provocam a despolarização dos canais de Ca^{2+} (Bradfish & Harmer, 1990, Dumas et al., 1996).

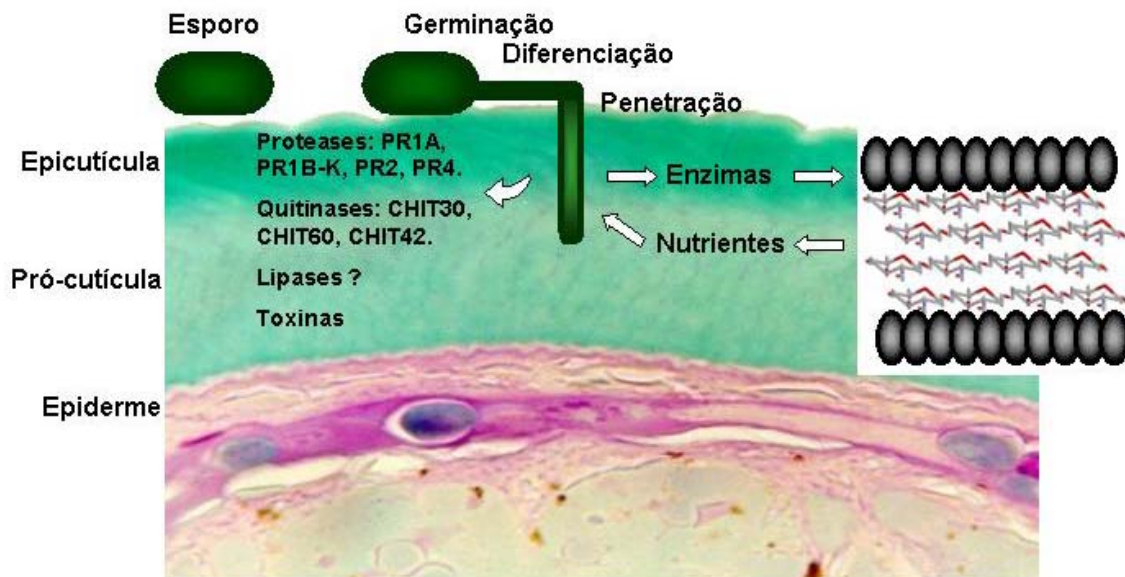


Figura 2. O processo de infecção de artrópodes mediado por *M. anisopliae*. Sob condições favoráveis, os esporos do fungo germinam na superfície da cutícula do hospedeiro, liberando uma série de proteases, quitinases e lipases que agem em componentes estruturais da pró- e da epicutícula, produzindo nutrientes que permitirão a continuidade do processo de infecção do artrópode. A imagem representa um corte transversal da carapaça do carrapato bovino *B. microplus*, visualizada por coloração verde-luz e ácido periódico de Schiff (PAS). (Imagem gentilmente cedida pelo Dr. A. Schrank, Centro de Biotecnologia, UFRGS).

Com a morte do hospedeiro, as hifas de *M. anisopliae* desenvolvem-se invadindo diversos órgãos internos e, com o esgotamento de nutrientes, estas emergem para a superfície formando um micélio que cobre o tegumento, resultando na mumificação do hospedeiro. Sob condições ambientais favoráveis, há a produção assexuada de esporos de coloração verde-oliva, que poderão ser disseminados por vento, chuva e umidade, para infectar outros hospedeiros (Alves, 1998).

2.2.2 *Quitinases: ação catalítica e classificação*

A quitina é um dos polímeros mais abundantes da natureza. É constituinte do exoesqueleto de artrópodes e de conchas de moluscos, e compõe a parede celular de fungos e algumas algas. A elucidação da estrutura química da quitina demonstrou que este polissacarídeo é um polímero não ramificado de *N*-acetil-D-glicosaminas (NAcGlc) unidas por ligações do tipo β -(1,4), conforme ilustrado na Figura 3 (Flach et al., 1992).

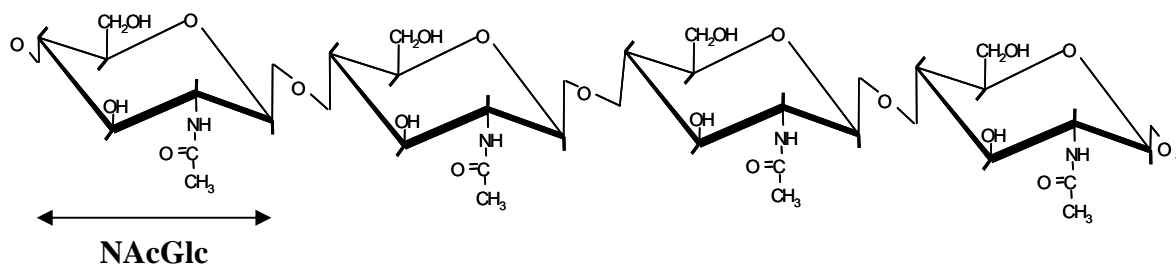


Figura 3. A estrutura química da molécula de quitina. A seta indica uma unidade monomérica de *N*-acetil-D-glicosamina (NAGlc). (Imagem gentilmente cedida pelo Dr. A. Schrank, Centro de Biotecnologia, UFRGS).

Análises por difração de raios X revelaram que existem diferentes associações intercadeia das moléculas de quitina estabilizadas por pontes de hidrogênio, resultando em três formas: α -quitina, β -quitina e γ -quitina. A primeira delas consiste de cadeias antiparalelas de poli-NAGlc, a forma β se caracteriza pela presença de duas cadeias paralelas e a forma γ apresenta duas cadeias paralelas e uma anti-paralela. A distribuição destas cadeias também é variável, pois enquanto a α -quitina é encontrada na parede celular de fungos, as outras duas formas são encontradas em organismos aquáticos e na membrana peritrófica de insetos (Patil et al., 2000).

As quitinases, ou enzimas quitinolíticas (EC 3.2.1.14), estão incluídas em uma classe de enzimas do grupo das glicosil-hidrolases, capazes de promover a clivagem das ligações β -(1,4) existentes entre os monômeros de NAGlc, produzindo oligômeros, multímeros e monômeros de NAGlc (Flach et al., 1992).

Embora as quitinases sejam classificadas sob um único número de acordo com a *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUB-MB), este sistema não reflete a diversidade dos mecanismos de ação destas enzimas, com a liberação de produtos distintos, tampouco a relação evolutiva existente entre si (Henrissat, 1999).

Baseando-se na natureza dos produtos liberados pela hidrólise do substrato, as quitinases foram agrupadas em exoquitinases, endoquitinases ou β -1,4-*N*-acetilglicosaminidases. As exoquitinases removem moléculas de diacetilquitobiose (dímeros de NAGlc), onde nenhum monossacarídeo ou oligossacarídeo é formado. As endoquitinases clivam a molécula de quitina em pontos internos aleatórios, produzindo multímeros de

NACGlc. As β -1,4-*N*-acetilglicosaminidases liberam sempre monômeros de NACGlc como produto final (Sahai & Manocha, 1993; Warren, 1996; Patil, 2000).

O sistema de classificação das enzimas quitinolíticas baseado na similaridade de seqüências de resíduos de aminoácidos do domínio catalítico as divide entre as famílias 18 e 19 das glicosil-hidrolases. A família 18 é a maior delas, com cerca de 180 membros distribuídos entre bactérias, vírus e eucariotos como artrópodes, protozoários, plantas, nematódeos, humanos e fungos. Por outro lado, a família 19 é composta em quase sua totalidade por quitinases vegetais, com alguns poucos representantes de *Streptomyces griseus*, *Haemophilus influenzae* e *Caenorhabditis elegans*. Uma vantagem deste critério de classificação é que a conservação de seqüência representa um indicativo das similaridades estruturais e características das etapas intermediárias de clivagem das ligações glicosídicas (Henrissat, 1999).

Estruturalmente, as quitinases da família 18 possuem um resíduo de ácido glutâmico na posição 171, essencial ao mecanismo catalítico, enquanto nas quitinases pertencentes à família 19, os resíduos de ácido glutâmico importantes para o mecanismo de ação da enzima estão localizados nas posições 67 e 89. As quitinases integrantes da família 18 possuem uma estrutura em barril, formado por oito folhas β inclinadas em direção ao interior do mesmo, com um igual número de α -hélices formando um arcabouço em forma de anel externo. As quitinases da família 19 exibem um motivo contendo 10 α -hélices e três folhas β (Robertus & Monzingo, 1999).

2.2.3 *Quitinases de M. anisopliae: genes e enzimas*

Em fungos, as quitinases estão envolvidas tanto na utilização da quitina como nutriente, como na sua modificação estrutural na síntese da parede celular, a liberação de esporos ao ambiente, a diferenciação e a morfogênese das hifas (Gooday et al., 1992).

A participação destas enzimas no entomoparasitismo ainda não está completamente elucidada, pois uma linhagem mutante do fungo *Verticillium lecanii* manteve-se capaz de infectar afídeos, mesmo sendo deficiente na produção de enzimas quitinolíticas (Jackson et al., 1985). No entanto, tendências mais recentes apontam o sinergismo entre as várias classes de hidrolases secretadas no momento da penetração da cutícula como sendo crucial à eficiência do processo, estabelecendo-se um sinergismo entre estas enzimas, visando à invasão do hospedeiro (St Leger & Joshi, 1997).

As quitinases já descritas incluem uma endoquitinase de 33 kDa e uma N-acetilglicosaminidase de 110 kDa (St Leger et al., 1991), bem como outras endoquitinases de 45 e 43,5 kDa (St Leger et al., 1995) e uma endo e exoquitinase identificada por CHIT30 (Pinto et al., 1997). Na Tabela 1 estão resumidas as informações pertinentes às quitinases conhecidas de *M. anisopliae*.

Tabela 1. Quitinases de *M. anisopliae* e suas principais propriedades bioquímicas

Quitinase	Massa molecular (kDa)	Mecanismo de ação	Especificidade	Referência
CHIT30	30	Endo/exo	Quitobiose, quitotetraose	Pinto et al., 1997
CHIT33	33	Endo	Quitotetraose, quitosana, quitina cristalina, quitina coloidal	St Leger et al., 1991
CHIT42	42	Endo	Quitobiose, quitotetraose	Baratto, 2001
CHIT43,5 e CHIT45	43.5, 45	Endo	Glicol quitina	St Leger et al., 1996
CHIT60	60	Endo/exo	Quitina coloidal, quitina cristalina, <i>p</i> -NP-NAcGlc*	Kang et al., 1998
CHIT110	110	Glicosaminidases	Quitobiose, quitotriose, quitotetraose	St Leger et al., 1991

* *p*-NP-NAcGlc: substrato sintético *p*-nitrofenil-*N*-acetil- β -D-glicosamina

Apenas dois genes codificadores de quitinases de *M. anisopliae* foram isolados e caracterizados até o momento. O gene *chi11* foi isolado por Kang et al. (1998) e estes autores demonstraram que a proteína codificada (CHIT58) apresenta 522 resíduos de aminoácidos, com uma massa molecular de 58 kDa que lhe confere o nome, o que a torna bastante diferente das demais quitinases de *M. anisopliae* descritas até então. No entanto, o primeiro dos genes codificador de quitinases de *M. anisopliae* a ser caracterizado foi o gene *chit1*, que codifica uma quitinase de 423 resíduos de aminoácidos (CHIT42). A enzima possui quatro sítios potenciais de glicosilação e um peptídeo-sinal composto pelos primeiros 35 resíduos de aminoácidos na porção N-terminal, com a massa molecular da enzima madura calculada em torno de 42 kDa. A transcrição deste gene é altamente induzida quando quitina é adicionada

ao meio de cultivo. Esta enzima mostrou-se diferente das demais envolvidas na hidrólise da quitina (Bogo et al., 1998).

A endoquitinase CHIT42 apresenta uma região entre as posições 166 e 174, com o resíduo de ácido glutâmico na posição 172, essencial ao mecanismo catalítico dos membros da família 18 das glicosil-hidrolases. A estrutura tri-dimensional em forma de diagrama de fitas está representada na Figura 4, com destaque para a conformação de barril formada por α -hélices e folhas β no centro do modelo.

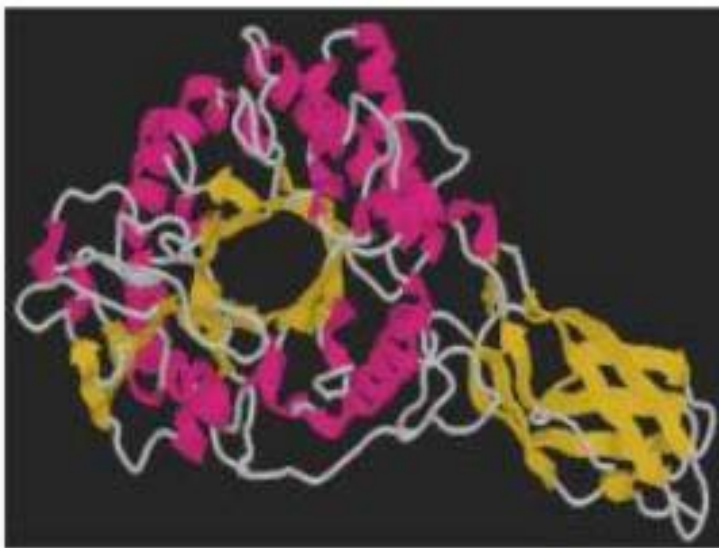


Figura 4. Estrutura tri-dimensional da endoquitinase CHIT42 de *M. anisopliae* em diagrama de fitas. As α -hélices estão representadas em cor magenta e as folhas β em amarelo. No centro da enzima está o barril α/β , característico das quitinases da família 18 das glicosil-hidrolases. (Imagem gentilmente cedida pelo Dr. A. Schrank, Centro de Biotecnologia, UFRGS).

2.3 Plantas transgênicas expressando quitinases

A expressão de quitinases em tecidos vegetais nos momentos e nas quantidades adequados é capaz de produzir uma redução significativa dos sintomas de doenças fúngicas, levando, inclusive, a uma resistência completa em plantas transformadas geneticamente. Muitos trabalhos comprovam a capacidade antimicótica (e mesmo inseticida) desta classe de enzimas, sendo constatadas, ainda, a estabilidade de herança destes fenótipos e a resistência a um amplo espectro de patógenos em alguns casos. Exemplos de trabalhos onde foram descritas tais propriedades de vegetais transgênicos estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Exemplos de plantas transgênicas expressando genes codificadores de quitinases e a resistência das mesmas a diferentes fungos fitopatogênicos ou a insetos.

Planta	Transgene(s)	Patógeno(s) e Inseto(s)	Referência
<i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco, fumo)	<i>rch1</i> (quitinase de arroz)	<i>Cercospora nicotianae</i>	Zhu et al., 1994
<i>Brassica napus</i> (canola)	Gene quimérico de duas endoquitinases (tabaco + tomate)	<i>Cylindrosporium concentricum</i>	Grison et al., 1996
		<i>Phoma lingam</i>	
		<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	
<i>N. tabacum</i>	cDNA de uma quitinase de <i>Manduca sexta</i> (cigarrinha da cana-de-açúcar)	<i>Oryzaephilus mercator</i> (besouro-dos-grãos-do-mercador)	Wang et al., 1999
<i>N. tabacum</i>	<i>chi1</i> do fungo <i>Rhizopus oligosporus</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Botrytis cinerea</i>	Terakawa et al., 1997
<i>N. tabacum</i>	cDNA de uma quitinase de <i>M. sexta</i>	<i>M. sexta</i> e <i>Heliothis virescens</i>	Ding et al., 1998
<i>Solanum tuberosum</i> (batata)	<i>chit42</i> (quitinase do fungo <i>Trichoderma harzianum</i>)	<i>Alternaria solani</i>	Lorito et al., 1998
<i>N. tabacum</i>	<i>chit42</i> e <i>ThEn-42</i> (quitinases do fungo <i>T. harzianum</i>)	<i>Alternaria alternata</i>	Lorito et al., 1998
		<i>B. cinerea</i>	
		<i>Rhizoctonia solani</i>	
<i>Dendranthema grandiflorum</i> (crisântemo)	<i>rcc2</i> (quitinase de arroz)	<i>B. cinerea</i>	Takatsu et al., 1999
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	<i>pcht28</i> (endoquitinase de <i>Lycopersicon chilense</i>)	<i>Verticillium dahliae</i>	Tabaeizadeh et al., 1999

Planta Transgênica	Gene	Patógeno(s)	Referência
<i>Oryza sativa</i> (arroz)	<i>rc-7</i> (PR-3 de arroz)	<i>R. solani</i>	Datta et al., 2001
<i>Malus x domestica</i> (maçã)	Endoquitinase <i>ech42</i> e exoquitinase <i>nag70</i> de <i>T. harzianum</i>	<i>Venturia inaequalis</i>	Bolar et al., 2001
<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	quitinase de cevada (PR)	<i>Erysiphe graminis f. sp, tritici</i> e <i>Puccinia recondita f. sp, tritici</i>	Oldach et al., 2001
<i>Brassica oleracea</i> var <i>italica</i> (brócolis)	<i>chit42</i> (quitinase do fungo <i>T. harzianum</i>)	<i>Alternaria brassicicola</i>	Mora & Earle, 2001
<i>Arachis hypogaea</i> (amendoim)	<i>chi</i> (PR de tabaco)	<i>Cercospora arachidicola</i>	Rohini & Rao, 2001
<i>Cucumis sativus</i> (pepino)	<i>rcc2</i> (quitinase de arroz)	<i>B. cinerea</i>	Kishimoto et al., 2002
<i>Agrostis palustris</i> (grama)	<i>hs2</i> (quitinase de <i>Ulmus americana</i> , uma arbórea)	<i>R. solani</i>	Chai et al., 2002
<i>L. esculentum</i>	endoquitinase e chitobiosidase de <i>Streptomyces albiflavus</i>	ND*	Gongora & Broadway, 2002

*ND: não determinado

Com o objetivo de conferir a resistência a fungos, os genes para a transformação genética de plantas podem ser divididos em dois grupos:

- 1) genes provenientes de microrganismos, como bactérias e fungos filamentosos, sobretudo do fungo *T. harzianum*;
- 2) genes codificadores de proteínas relacionadas à patogênese, isolados de plantas como *Oryza sativa* (arroz) e *Nicotiana tabacum* (tabaco);

Muitos microrganismos têm sido alvo da busca de genes de interesse para a transformação genética de plantas, sobretudo fungos filamentosos do gênero *Trichoderma*, que possui inúmeras enzimas com propriedades antimicrobianas (Lorito et al., 1993; 1994; 1996). Alguns dos genes codificadores destas quitinases possuem atividade antifúngica descrita em plantas transgênicas. Lorito et al. (1998) analisaram o potencial antifúngico de dois genes codificadores de endoquitinases de *T. harzianum* em batata e tabaco, tendo verificado grande eficiência das enzimas em ambos os sistemas. Em comparação às plantas controle, as plantas transformadas com estes genes separadamente demonstraram sintomas menos severos das doenças associadas aos patógenos, como uma discreta clorose, isto é, áreas necrosadas restritas às regiões próximas ao ponto de inoculação do fungo, e uma menor quantidade de esporos nas lesões, além da permanência destas características mesmo depois de um longo período de infecção. Em trabalhos com macieiras expressando genes de endo e exoquitinase separadamente, foi verificada uma correlação fortemente positiva entre os níveis de expressão da enzima recombinante e o número de lesões com esporos, porcentagem da área foliar atacada e número de conídios recuperados de uma mistura de cinco isolados de *Venturia inaequalis*, embora estes fenótipos fossem mais intensos em plantas expressando a endoquitinase (Bolar et al, 2000; Bolar et al., 2001). Quando as plantas foram transformadas com ambos os genes simultaneamente, houve aumento destas tendências, fornecendo um importante sinergismo da eficiência destas enzimas (Bolar et al., 2001).

No segundo grupo de genes utilizados para a introdução em tecidos vegetais está uma classe de enzimas cuja expressão é intensamente induzida quando as plantas são infectadas por fungos ou tratadas com extratos de parede celular destes fitopatógenos. Esta classe de enzimas é induzida, ainda, ao se produzir lesões mecânicas em órgãos dos vegetais. As enzimas desta classe são denominadas de proteínas relacionadas à patogênese (PRs, do inglês, *pathogenesis-related proteins*) e incluem as quitinases vegetais como principal integrante, estando amplamente distribuídas em uma grande variedade de espécies (Gooday, 1995). Terakawa et al. (1997) geraram plantas com reduzida suscetibilidade aos patógenos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea* com a introdução de um gene codificador de uma quitinase do fungo *Rhizopus oligosporus* em plantas de tabaco. Resultados semelhantes foram descritos por Lorito et al. (1998).

Devido à potencial atividade antifúngica, muitos trabalhos relatam a utilização de genes de quitinases como forma de aumentar a resistência das plantas ao ataque por patógenos. Kishimoto et al. (2002), por exemplo, transformaram plantas de pepino com o

gene de uma quitinase de arroz, obtendo plantas capazes de impedir a penetração e o desenvolvimento de hifas invasoras de *B. cinerea*, embora nenhuma redução na viabilidade ou germinação de esporos deste fungo tenha sido detectada. Uma gramínea, *Agrostis palustris*, expressando uma quitinase da arbórea *Ulmus americana*, demonstrou ausência total de sintomas da doença provocada pelo patógeno *Rhizoctonia solani* por um período superior a sete dias após a inoculação do fungo no solo (Chai et al., 2002). Plantas de crisântemo e de amendoim expressando um gene de quitinase de tabaco foram também obtidas. Ao serem inoculadas com *Cercospora arachidicola*, um importante patógeno da cultura do amendoim, as plantas transgênicas não desenvolveram os sintomas típicos da doença, tais como lesões circulares de coloração amarelo-escuro nas folhas (Rohini & Rao, 2001). Em crisântemo, plantas expressando a quitinase de tabaco também mostraram uma significativa redução da área foliar afetada por lesões enegrecidas, provocadas pelo patógeno *B. cinerea* (Takatsu et al., 1999). Um outro exemplo deste grupo de vegetais transgênicos inclui a expressão constitutiva da PR-3 de arroz nesta mesma planta, permitindo que as plantas produzidas apresentassem uma redução do número e da área de lesões provocadas por *R. solani* (Datta et al., 2001). Finalmente, em um outro trabalho, plantas de *Lycopersicon esculentum* (tomate) transformadas com o gene codificador de uma endoquitinase de *L. chilense* mostraram-se resistentes à infecção provocada pelo fungo *Verticillium dahliae*, com diminuição dos danos ao sistema vascular e da área foliar sintomática (Tabaeizadeh et al., 1999).

Alguns trabalhos descrevem, ainda, a obtenção de resistência a mais de um patógeno simultaneamente, por meio da transformação genética de plantas com apenas um gene. Como exemplos, podemos citar a resistência obtida em plantas de *Brassica napus* (canola), portadoras de um gene quimérico das quitinases de feijão e de tomate, frente aos patógenos *Cylindrosporium concentricum*, *Phoma lingam* e *Sclerotinia sclerotium* (Grison et al., 1996). Oldach et al. (2001) obtiveram plantas de trigo expressando uma quitinase de *Hordeum vulgare* (cevada), que mostrou-se eficiente em deter o avanço de doenças provocadas pelos fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *B. cinerea*, com significativa redução da germinação dos esporos destes fungos sobre as folhas das plantas transgênicas.

Além de conferir a vantagem adaptativa da resistência a doenças causadas por fungos, genes de quitinases também podem conferir um caráter tóxico a insetos, o que reduziria a predação das plantas por estes animais. Até o momento, genes com esta propriedade têm como origem os próprios insetos, estando envolvidos em processos de ecdise nestes animais. Durante este período, existe a expressão de quitinases endógenas do inseto, afim de permitir

uma hidrólise parcial da quitina presente na membrana peritrófica do intestino e, também, do exoesqueleto (Flach et al., 1992). Entretanto, a expressão destas enzimas é regulada por hormônios produzidos durante a ecdise, de síntese restrita a um período relativamente curto no estágio larval (Fukamizo & Kramer, 1987). Se o inseto for exposto a esta classe de enzimas fora deste período, as estruturas contendo quitina, especialmente a membrana peritrófica, podem ser danificadas, levando a uma inibição do crescimento e à morte. Deste modo, o controle de insetos-praga também pode ter como alvo o metabolismo de quitina nestes animais (Wang et al., 1999).

A expressão de quitinases de insetos em plantas transgênicas de tabaco tem se mostrado letal a larvas, atingindo índices de 100% de mortalidade em besouros da espécie *Oryzaephilus mercator* quando alimentados com uma dieta contendo uma quitinase de *Manduca sexta* (Wang et al., 1999). Em um outro trabalho, plantas de tabaco expressando uma quitinase de *M. sexta* foram testadas com respeito a uma possível inibição do crescimento das larvas e redução da área foliar danificada por insetos herbívoros. Em experimentos com *Heliothis virescens*, houve significativos efeitos de retardo do desenvolvimento das larvas e diminuição da área foliar danificada. Resultados diferentes foram obtidos quando larvas de *M. sexta* foram utilizadas, não sendo observadas quaisquer destas tendências ao empregar-se somente as folhas de plantas expressando altos níveis da quitinase recombinante como fonte de alimento. Todavia, pulverizando-se estas folhas com uma dose sub-letal da toxina de *Bacillus thuringiensis*, a tendência de redução de danos foliares e de diminuição do crescimento das larvas reapareceu de maneira mais intensa do que em plantas tratadas somente com a toxina bacteriana, indicando um sinergismo entre esta última e a quitinase introduzida nas plantas (Ding et al., 1998).

Em uma comparação do caráter inseticida das quitinases provenientes das bactérias *Serratia marcescens* e *Streptomyces griseus*, da cigarrinha *M. sexta* e da cevada, estas proteínas foram separadamente incluídas na dieta de larvas de besouros. Somente a quitinase do inseto foi capaz de reduzir o crescimento e elevar os índices de mortalidade das larvas (Ding et al., 1998). De fato, não existem relatos de plantas transgênicas com resistência a insetos por meio da expressão de quitinases de outras origens.

Embora a introdução de quitinases em plantas confira ao hospedeiro a vantagem adaptativa de se tornar resistente a um determinado patógeno ou inseto, alguns efeitos adversos da expressão destas enzimas têm sido relatados. Em plantas de maçã transformadas com o gene de uma endoquitinase de *T. harzianum*, por exemplo, uma correlação negativa

entre o nível de expressão da enzima e o crescimento das plantas foi constatada tanto em indivíduos portadores deste transgene exclusivamente, como em indivíduos expressando este transgene em combinação com uma exoquitinase. No entanto, o mecanismo desta inibição do crescimento desencadeada pelo transgene ainda permanece desconhecido (Bolar et al., 2000; 2001). Em plantas transgênicas de tomate, expressando uma quitinase e uma quitobiosidase de *Streptomyces albidoflavus*, foi verificada uma correlação positiva entre os níveis de atividade quitinolítica nos tecidos vegetais e a ocorrência de floração prematura, seguida do aumento no número de flores e frutos nestas plantas, além de uma correlação negativa com o peso vegetal (Gongora & Broadway, 2002). Em plantas transgênicas de amendoim expressando uma quitinase de tabaco, foi também observado atraso no crescimento, embora estes vegetais permanecessem saudáveis e mantivessem a fertilidade, florescendo e produzindo sementes como as plantas selvagens (Rohini & Rao, 2001). Cabe ainda ressaltar que a interação prejudicial de genes codificadores de quitinases com o vigor das plantas transgênicas foi observada em apenas poucos exemplos, sendo que em plantas de tabaco transformadas com um gene equivalente, nenhum efeito adverso sobre o crescimento, desenvolvimento e fertilidade dos indivíduos transgênicos foi detectado (Lorito et al., 1998).

Mesmo com a eficiência das quitinases em proteger plantas do ataque de patógenos e insetos, nem todos os casos tem sido bem sucedidos. Quando uma quitinase de tabaco foi inserida em plantas de *Nicotiana sylvestris*, as plantas transgênicas permaneceram sensíveis ao fungo *Cercospora nicotinae*, mostrando níveis de infecção idênticos aos das plantas selvagens (Neuhaus et al., 1991). Outro caso muito semelhante a este é o de plantas de brócolis expressando uma quitinase de *T. harzianum*, em que estas permaneceram sensíveis ao fungo *S. sclerotiorum* (Mora & Earle, 2001).

Capítulo 3

Variable expression levels of a chitinase from *Metarhizium anisopliae* in tobacco plants and its chitinolytic activity against the phytopathogen *Rhizoctonia solani*

(Manuscrito a ser submetido a *Transgenic Research*)

Variable expression levels of a chitinase from *Metarhizium anisopliae* in tobacco plants and its chitinolytic activity against the phytopathogen *Rhizoctonia solani*

Marcelo Fernando Kern^{1,2}, Simone de Faria Maraschin², Augusto Schrank², Marilene Henning Vainstein², Giancarlo Pasquali^{1,2*}

¹Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências;

²Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Key words: chitinase, plant resistance, *Rhizoctonia solani*, transgenic plants

*Author for correspondence: Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43421, C.P. 15005, CEP 91501-970, Campus do Vale/UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil. FAX: 00 55 51 3316 7309, Phone: 00 55 51 3316 6094 (E-mail: pasquali@dna.cbiot.ufrgs.br)

Abstract

Plant resistance to pathogenic fungi was improved in transgenic tobacco by employment of a novel chitinase gene from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*. The *chit1* gene, encoding the chitinase CHIT42 (EC 3.2.1.14), was placed under the control of the CaMV 35S promoter and the resulting construct was transferred to tobacco. Seventeen kanamycin-resistant transgenic lines were recovered and the presence of the transgene was confirmed through PCR analysis and Southern blot hybridisation. The number of *chit1* copies was determined to be varying from one to four copies. Copy number had observable effects neither on plant growth nor development. Substantial heterogeneity concerning production of the recombinant enzyme and both general and specific chitinolytic activities were detected in leaf extracts from primary transformants. The greatest amounts of chitinase were found in plants harbouring two *chit1* inserts at different loci. Progeny derived from self-pollination of these primary transgenics revealed a stable inheritance pattern, with transgene segregation following a Mendelian dihybrid ratio. Two selected plants expressing high levels of CHIT42 were consistently resistant to the soilborne pathogen *Rhizoctonia solani*, suggesting a direct relationship between enzyme activity and reduction of foliar area affected by fungic lesions. We believe this to be the first report of resistance to fungal diseases in plants mediated by a chitinase gene from an entomopathogenic and acaricide fungus.

Introduction

Mycoparasitic and entomopathogenic fungal species have been employed in the biological control of crop pests and diseases not only directly, but also as a source of valuable genes to

be introduced into plants (Herrera-Estrella & Chet, 1999; Patil et al., 2000). An advantage of these biocontrol microorganisms is their feature of having evolved towards the development of specific approaches to attack arthropods and phytopathogenic fungi, but not plants. An important component of this system is the key step of overcoming host barriers in order to advance on infection process. In many cases, genes encoding a range of hydrolytic enzymes such as chitinases and β -glucanases that exert an active role in the early interaction, have been exploited due to their antimicrobial activity (Lorito et al., 1993; Lorito et al., 1994, Lorito et al., 1996). The chitinase mechanism of action involves chitin degradation and cell wall disruption, leading to fungal cell lysis (Arlorio et al., 1992).

Most these genes have been isolated from the mycoparasitic genus *Trichoderma* and it has been demonstrated to encode endochitinases and exochitinases capable of generating high levels of non-specific resistance to a broad spectrum of different pathogens including the Deuteromycetes *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Botrytis cinerea* which cause leaf spot and fruit rot and the Basidiomycete *Rhizoctonia solani* which attacks the stem and root of tobacco and potato plants (Lorito et al., 1998), and the apple scab disease Ascomycete *Venturia inaequalis* (Bolar et al., 2000; Bolar et al., 2001). Beyond *Trichoderma*, a chitinase gene from another biocontrol fungus, *Rhizopus oligosporus*, has been introduced into tobacco plants, conferring resistance to the grey mold pathogen *B. cinerea* (Terakawa et al., 1997).

Even though the entomopathogenic and acaricide fungus *Metarhizium anisopliae* is one of the best studied fungus with insecticide and acaricide properties and with many chitinase genes and enzymes isolated and characterised, there are no reports available concerning their potential to confer plant resistance against arthropods or fungi. Besides being involved in the process of host penetration, chitinases produced by *M. anisopliae* are also thought to be involved in fungal growth (St Leger et al., 1986; St Leger et al., 1991; St Leger et al., 1996; Pinto et al., 1997; Bogo et al., 1998; Kang et al., 1998; Frazzon et al., 2000),

which led us to test their capability to confer plant resistance against fungi. Using the full length cDNA encoding the chitinase CHIT42 (*chit1* gene), this work was conducted to evaluate the ability of the *chit1* gene to confer resistance to *R. solani* by generating transgenic tobacco plants. The production and activity of the recombinant enzyme is here described, examining the possible effects of the transgene on inheritance stability and plant vigour, besides testing different transgenic plants for disease symptoms.

Material and Methods

Molecular Cloning and Plant Transformation

Nucleic acid procedures were performed essentially as described in (Sambrook & Russel, 2001). A fragment with 1.7 kb in length and containing the full length cDNA for CHIT42 (*chit1* gene) from *M. anisopliae* was isolated from the plasmid pChit (Bogo et al., 1998). The insert, excised by *SmaI/BamHI*, was cloned into pMOG463 (Mogen, The Netherlands) cut with *EcoRV* and *BamHI*, positioning the *chit1* gene between the Cauliflower Mosaic Virus 35S (CaMV 35S) promoter and the nopaline synthase transcription terminator (*nos T*). The CaMV 35S-*chit1-nos T* cassette was excised by *SacI* and ligated into the binary vector pMOG402 (Mogen, The Netherlands). The recombinant binary plasmid was transferred to *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 by triparental matting (Peach & Velten, 1994) and *Nicotiana tabacum* cultivar SR1 'Little Havana' was transformed by the leaf disc method (Horsch et al., 1985). Independently produced, transgenic plants harbouring the CaMV 35S-*chit1-nos T* cassette were called *chitplus*. Control plants, named *chitless*, consisted of *N. tabacum* transformed with the unmodified T-DNA of pMOG402. Both T-DNA structures are shown in Figure 1.

Southern blot hybridisation

Genomic DNA was prepared from leaf tissues by the CTAB method described by Doyle & Doyle (1987) and quantified by DNAQuant Fluorometer Assay (Amersham Biosciences, UK) following the manufacturer instructions. DNA (20 µg) samples were cleaved with *EcoRI* and electrophoretically separated on 0.8% agarose gel. Probe labelling, hybridisation, stringency washes and detection were carried out as specified in the Gene Images Random Prime Labelling and CPD Star Detection kit (Amersham Biosciences, UK). The DNA blotting was probed with a 1,500 bp *EcoRI-PstI* fragment containing the *chit1* gene coding sequence (Bogo et al., 1998) purified from agarose gels by GFX (Amersham Biosciences, UK).

PCR analysis

Polymerase chain reactions (PCR) were performed using genomic DNA from leaves of 2-month-old primary putative transformants and 8-week-old progeny resulting of self-pollinated primary transgenics, prepared using Plant DNAzol Reagent (Gibco BRL, USA), following the protocol supplied by the manufacturer and quantified as described for Southern blot DNA samples. Reactions employed the specific primers to the *chit1* coding region *MachitFor* (5'-GGAGGGTGGACGTGGTCAAC-3') and *MachitRev* (5'-GCTGCCCCCAATCCCTTG-3', Figure 1). PCR components were as follows: 50 pmol of each primer, 2.5 U Taq DNA polimerase (CENBIOT Enzimas, Brazil), 10 mM Tris.Cl pH 8.3, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP and 200 ng genomic DNA. A termocycler (PTC 100 MJ Research, USA) was programmed with an initial denaturation at 95°C for 5 min following 35 cycles at 94°C for 45 s, 47°C for 45 s and 72°C for 90 s, and a final extension step at 72°C for 10 min. Plants were

evaluated for the presence of a 750 bp product after PCR and agarose gel electrophoresis. Results were submitted to statistic analysis using the double tailed testing associated to binomial distribution as determined by Armitage & Berry (1987).

Immunoblot analysis

Leaf crude extracts were prepared and polyacrilamide gel electrophoretic analyses under denaturing conditions (SDS-PAGE) according to Memelink et al. (1994) and total protein was determined using the BCA Protein Assay Kit (Pierce, USA). After electrophoresis in a Mini-Protean II Cell (BioRad, USA), proteins were electroblotted onto nitrocellulose filters using the Mini-Transf-Blot Cell (BioRad, USA) apparatus. Protein extracts were probed with a polyclonal antibody specific for CHIT42 from *M. anisopliae*. Recombinant enzyme was visualised with the ECL Western Blot Detection and Analysis System (Amersham Biosciences, UK).

Chitinase activity assay

Leaf total proteins were prepared according to Jefferson & Wilson (1994) with the following modifications: protein samples were extracted with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, 10 mM EDTA, 0.1% (w/v) Sarcosyl, 0.1% (v/v) Triton X-100 and 10 mM β -mercaptoethanol. After centrifugation (10 min at 13,000 rpm), the supernatant was collected and dialysed against 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, exceeding 100 times sample volume. Protein measurements were determined by the method of Bradford (1976) using BSA as standard. Chitinolytic activity was measured using the synthetic substrates N,N'-diacetylchitobiose, N,N',N'',N'''-tetracetylchitotetraose (Sigma, USA) using the procedures

described in Reissig et al. (1955). One unit of chitinase activity was defined as the amount of enzyme that releases 1 μmol *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) per min per mg of total soluble protein. For the substrate *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-glucosamine (Sigma, USA), chitinolytic activity was detected according to Yabuki et al. (1986) and one unit of chitinase was defined as the amount of enzyme that releases 1 μmol *p*-nitrophenol per min per mg total soluble protein.

Glycol-chitin zymograms

After the first dialysis step, leaf protein extracts were submitted to a second dialysis against 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, at an excess of 100 times the total sample volumes. Chitinase activity gels were prepared as described by St. Leger et al. (1993). Chitinases from *Streptomyces griseus* (Sigma, USA) were used as molecular weight markers. Black lytic zones representing chitin hidrolysed were examined by placing gels under UV light.

Plant resistance assays against Rhizoctonia solani

R. solani, a soilborne pathogen that causes damping-off, seedling blight and root rot, was isolated and kindly provided by Dr. A.T.S. Matsumura from Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Brazil). Primary transgenics and their progeny were tested using respectively direct infection assays of leaves in agar dishes or fungus inoculation in soil. Infection experiments were conducted essentially as described by Lorito et al. (1998), with the following modifications: tobacco plants were micropropagated on Murashige & Skoog medium (Murashige & Skoog, 1962) for one month, leaves were cut and put on dishes containing 0.85% Phytoagar (Duchefa, The Netherlands)

plus 8 mg/mL fungus mycelia. Dishes were incubated for up to one week at 28°C with 16 h of light.

Results

Production of transgenic plants and genetic characterisation

A total number of 34 independently transformed tobacco plants (17 *chitplus* and 17 *chitless* plants) were obtained after leaf disc transformation by *A. tumefaciens* and regeneration. The structures of both T-DNA versions are illustrated in Figure 1. No distinguishable effects on plant growth, development and fertility were observed in either *chitplus* or *chitless* plants, with identical general phenotypes as wild-type plants throughout their life cycle (results not shown). All plants were tested for the presence of the *chit1* transgene by preliminary analysis through PCR. Figure 2A illustrates the result of the PCR analysis for 2 *chitless* and 8 *chitplus* plants. An expected 0.75 kb fragment was detected in all *chitplus* transgenic plants, while the same band was not present in *chitless* plants. Southern blot hybridisation of the same transgenic plants was conducted with a 1.5 kb probe representing a fragment of the *chit1* coding region (Figure 2B). Plant genomic DNA was cut with *EcoRI* and each hybridisation band corresponded to one different *chit1* copy, since the integrated gene was cut once by *EcoRI* (see Figure 1) and the other *EcoRI* site required to yield a fragment was localised in the plant genome. The position of this site depends on the locus where the integration occurred. Since each integration event occurs independently and randomly, transgenic plants exhibited singular hybridisation profiles. Hence the copy number of the *chit1* transgene was estimated as one in T₁₂ and T₂₁, two in T₁₃, T₂₂, T₃₄ and T₄₃ and four in T₁₄. Surprisingly, no hybridisation signals were seen in T₃₂, suggesting this plant has possibly lost the *chit1*

transgene, maintaining the kanamycin resistance cassette that allowed its selection in culture medium. In addition, a band of approximately 5 kb was observed in wild-type, *chitless* and *chitplus* plants, indicating this band represented a plant chitinase gene fragment sharing high sequence similarity with the *chit1* gene from *M. anisopliae*. This fragment was not detected in the genomic DNA from the fungus (lane *Ma* in Figure 2B). Weak hybridisation signals with high molecular weight are thought to result from partial cleavages of the genomic DNA and were not considered to estimate the number of *chit1* inserts.

Recombinant chitinase production and activity levels in leaf protein extracts from transgenic plants

Western blot analysis revealed the presence of a 42 kDa band corresponding to the expected molecular weight of the chitinase CHIT42 in all *chitplus* plants tested, though individual transgenics showed differences in band intensities. As shown in Figure 3A, the strongest signals were observed in proteins extracts from T₁₃ and T₂₂ plants. The same band was verified neither in wild-type nor in *chitless* plants.

Similar results were obtained through chitinase activity gels (Figure 3B and 3C). No zones of hydrolytic activity were observed in wild-type and *chitless* plants. The 14 *chitplus* plants analysed showed great differences in the pattern of antibody recognition, varying from plants not exhibiting any recombinant enzyme activity (T₁₂, T₁₃₂, T₂₃, T₂₅, T₂₉, T₃₃) to intermediate (T₁₄, T₂₁, T₂₂, T₂₇, T₃₂) and strong signals (T₁₃, T₃₄, T₄₃) of chitinolytic activity (Figure 3B and 3C). These data support the idea that, in some *chitplus* plants, CHIT42 was efficiently processed and the signal peptide of 35 amino acid residues was accurately removed, allowing the production of the mature and active chitinase form.

Specific chitinase activities were higher in *chitplus* than in wild-type or *chitless* plants for all substrates tested. Due to the high levels of chitinase enzymatic units detected against *p*-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosamine (2.2050 - 6.3601 U for T₂₁ and T₂₂ respectively, Figure 4A) and N,N'-diacetylchitobiose (1.2689 - 6.1084 U for T₁₂ and T₂₂ respectively, Figure 4B), specific substrates for exochitinases and N,N',N'',N'''-tetracetylchitotetraose (0.9731 - 7.6461 U for T₃₂ and T₁₃, Figure 4C) for endochitinases, both exo- and endochitinase activities were significantly increased in *chitplus* plants. However, these results point to a preferential endochitinase-like mode of action for CHIT42, since differences between *chitplus* and controls were observed in a higher proportion for the assay using N,N',N'',N'''-tetracetylchitotetraose as substrate (7.85-fold). Compared to the activity gel assay, these latter results indicated that the specific chitinase activity assays are more sensitive approaches, allowing to distinguish discrete amounts of chitinase even in leaf extracts showing very similar intensities in the western blot analysis (T₁₂, T₁₄, T₂₁, T₃₂, T₃₄ and T₄₃) or no hydrolysed regions in the activity gels (T₁₂). For T₁₃, T₂₂, T₃₄ and T₄₃ *chitplus* plants, positive signals found in western blots and in chitinase activity gels were confirmed by the chitinase specific activity assays, and they kept their position of top enzyme producing plants.

Transgenic plant resistance to the soilborne pathogen R. solani

Four *chitplus* plants showing the highest chitinase activities and one *chitless* plant were selected to test their resistance (or susceptibility) to *R. solani*. As shown in Figure 5A, one week after inoculation, leaves of T₂₂ and T₄₃ *chitplus* plants presented typical symptoms of *R. solani* infection throughout the foliar area, mainly consisting of necrotic lesions, a severe reaction similar to that observed in leaves of the *chitless* C₂₆ plant. On the other hand, T₁₃ and

T₃₄ *chitplus* plants were completely resistant to the pathogen and appeared healthy after one week of infection, developing neither chlorosis nor necrotic lesions.

The descendants of these four T₀ top chitinase producing plants were also submitted to infection by *R. solani* in soil (Figure 5B). Wild-type (SWT) and the *chitless* plant SC₂₆ were susceptible to the pathogen, developing typical necrosis lesions surrounded by a chlorotic halo whereas in *chitplus* segregant plants disease symptoms, if present, were restricted to a few leaves (ST₂₂), with most plants (ST₁₃, ST₃₄, ST₄₃) remaining healthy even after one month of the fungus inoculation, without observable lesions.

Analysis of T1 plants for transgene inheritance stability

The first self-pollinated generation of T₁₃, T₂₂, T₃₄ and T₄₃ *chitplus* plants, all harbouring two copies of the *chit1* transgene (Figure 2B) were tested for the maintenance of an independent segregation pattern according to Mendel's laws. As presented in Table 1, altogether 67 T1 plants were submitted to PCR analysis and, in 53, no significant deviations from the predicted ratio of *chit1* presence (+) to *chit1* absence (-) corresponding to 15:1 were detected, corroborating the dihybrid segregation of the *chit1* transgene. The exact probability of finding such a proportion among descendants, at random, was calculated to be 0.8741, 0.9947 and 0.9907 for T₁₃, T₂₂ and T₃₄ respectively. All values were above the significance level chosen for the test ($\alpha = 0.05$). Unlikely, only in one offspring derived from T₄₃ the number of plants bearing the transgene was found to be extremely reduced (2 plants out of 14). The exact probability of such an event, by chance, was highly significant ($P \ll 0,05$).

Discussion

In this study, transgenic *N. tabacum* SR1 plants bearing a chitinase gene from the arthropod infective fungus *M. anisopliae* were generated through *A. tumefaciens*-mediated transformation. The presence of the transgene was confirmed by PCR and Southern blot analysis, also revealing that the transgene copy number varied from 1 to 4 amongst plants. In all *chitplus* plants obtained, great heterogeneity concerning amounts of soluble active chitinase CHIT42 was detected, though all activity levels were increased in *chitplus* plants contrasting to *chitless* or wild-type plants. Descendants of double hemizygous plants demonstrated that the transgene was inherited according to Mendelian proportions in three independent progenies (whose parental individuals were T₁₃, T₂₂ and T₄₃), whereas a remarkable deviation was recorded in one of them (derived from T₄₃). In preliminary infection experiments in agar dishes, variable CHIT42 activity levels reflected on plant resistance to lesions caused by *R. solani*, ranging from fully resistant *chitplus* plants (T₁₃ and T₃₄) to plants as susceptible as the control (T₂₂ and T₄₃). However, soil infection assays revealed that in all *chitplus* descendant plants, resistance levels to the pathogen *R. solani* were increased, compared with the wild-type and *chitless* plants although less intense variations have also been recorded.

Strong degrees of variation on chitinase transgene expression amongst transgenic plants independently produced have been reported in many studies including groundnut (Rohini & Rao, 2001), cucumber (Kishimoto et al., 2002), potato and tobacco (Lorito et al., 1998) and creeping grass (Chai et al., 2002). These phenomena have been believed to be related to intrinsic properties of the transformation protocols, which may give rise to epigenetic silencing, cosuppression, position effects and changes in transgene structure (Finnegan & McElroy, 1994; Maqbool & Christou, 1999).

There was a partial significant correlation between the copy number of *chit1* and the chitinase activity levels in leaf protein extracts from *chitplus* plants. In general, four *chitplus*

plants harbouring 2 transgene copies (T₁₃, T₂₂, T₃₄ and T₄₃) showed the highest amounts of chitinase specific activity. In those transgenic plants with 1, 3 and 4 copies detected, enzyme levels were much lower. No correlation between the number of copies and the level of enzyme production were also observed in transgenic plants transformed with chitinase genes from *Trichoderma* (Lorito et al., 1998) or American elm (Chai et al., 2002).

Unspecific amplification products in PCR and heterologous hybridisation signals in Southern blot analysis detected in the wild-type, *chitless* and *chitplus* plants, are thought to be derived from plant chitinase genes sharing high sequence similarity with *chit1* from *M. anisopliae* since these fragments were not detected in the genomic DNA from the fungus. Indeed chitinases constitute the main component of pathogenesis-related proteins (PRs) involved in defence mechanisms against bacteria, fungi and insects, widely spread throughout plant species (Gooday et al., 1992; Patil et al., 2000).

Moreover, these four independent *chitplus* plants (T₁₃, T₂₂, T₃₄ and T₄₃) were selfed and the resulting segregation ratio was discovered not to differ significantly from the expected dihybrid pattern, which is 15:1 as predicted by two unlinked loci. This genetic evidence also corroborates transgene copy number estimated by Southern blot. A stable mode of inheritance for heterologous chitinase genes in plants have been described in rice (Datta et al., 2001) and tobacco (Lorito et al., 1998). Unlikely, one deviation was verified for the progeny of the T₄₃ plant, and the number of plants with *chit1* integrated was surprisingly reduced, indicating that epigenetic rearrangements of T-DNA inserts may have occurred, leading to losses of these fragments. Inheritance instability was also reported by Deineko et al. (2000) when testing the stability of the *nptII* marker gene in the descendants of transgenic tobacco plants, segregation deviations from the Mendelian ratios were also demonstrated for the progeny of double heterozygous plants.

The accurate cleavage of immature CHIT42 was suggested through western blot and chitinase activity gels because the expected band size of 42 kDa was detected in both experiments, indicating the removal of the 35 amino acid signal peptide from the fungal enzyme. Lorito et al. (1998) reported the correctly post-translation processing of secretion signal peptides belonging to chitinases from *T. harzianum* and tomato when expressed in tobacco plants. Conversely, Bolar et al. (2001) found an inefficient splicing in exochitinase transcripts from *T. atroviride* in apple plants.

No distinguishable effects on plant growth, development and fertility were observed in *chitplus* plants and their phenotypes were identical to *chitless* or wild-type plants throughout their life cycle. Even though similar results have been obtained by Lorito et al. (1998) in tobacco, a negative correlation between the level of an endochitinase gene alone and endo- and exochitinase genes combined on growth of apple transgenic plants was registered in two works by Bolar et al. (2000, 2001).

All chitinase activity results shown in the present work suggested the rise in enzyme activity in *chitplus* plants was responsible for the improvement in plant resistance. T₁₃ and T₃₄ *chitplus* plants, expressing strong exo- and endochitinase activities, showed no necrotic or chlorotic lesions. Surprisingly, T₂₂ and T₄₃ exhibited a pattern of resistance not so high as predicted according to the great amount of specific chitinolytic activity. Overall, compared with parental resistance levels, the progeny of *chitplus* plants demonstrated a reduced degree of variation, with all plants exhibiting improved reactions against the fungal attack. Although some variation in response has been reported, constitutive expression of chitinase in leaf tissues has been associated with high levels of plant resistance to pathogens (Lorito et al., 1998; Bolar et al., 2001; Datta et al., 2001 and Kishimoto et al., 2002).

As far as we are aware, this is the first report of resistance to a fungal disease in plants mediated by a chitinase gene from an entomopathogenic and acaricide fungus. Further

experiments will include challenge transgenic tobacco with other pathogenic fungi and insects, in order to evaluate possible resistance to a broader spectrum of pathogens, as well as the insertion of *chit1* into economically relevant plant species such as potato, tomato, soybean, eucalyptus, barley, sugarcane and rice.

Acknowledgements

We thank Dr. A.T.S. Matsumura for providing the isolates of *R. solani* employed in this study, Dr. M.H. Bodanese-Zanettini for green house facilities and Dr. S.C. Jacques for her assistance with statistical analysis. This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

- Arlorio M, Ludwig A, Boller T, Bonfante P (1992) Inhibition of fungal growth by plant chitinases and β -1,3-glucanases: a morphological study. *Protoplasma* **171**: 34-43.
- Armitage P and Berry G (1987) Statistical methods in medical research. 2nd edn, Oxford University Press, London.
- Bogo MR, Rota CA, Pinto Jr H, Ocampos M, Correa CT, Vainstein MH, Schrank A (1998) A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterisation of genomic and full-length cDNA. *Curr Microbiol* **73**: 221-225.
-

- Bolar JP, Norelli JL, Wong KW, Hayes CK, Harman GE, Aldwinckle HS (2000) Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to scab and reduces vigour. *Phytopathol* **90**: 72-77.
- Bolar JP, Norelli JL, Harman GE, Brown SK, Aldwinckle HS (2001) Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgen Res* **10**: 533-543.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Chai B, Maqbool SB, Hajela RK, Green D, Vargas Jr JM, Warkentin D, Sabzikar R, Sticklen MB (2002) Cloning of a chitinase-like cDNA (*hs2*), its transfer to creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) and development of brown patch (*Rhizoctonia solani*) disease resistant transgenic lines. *Plant Sci* **163**: 183-193.
- Datta K, Jumin T, Oliva N, Ona I, Velazhahan, Mew TW, Muthukrishnan S, Datta SK (2001) Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Sci* **160**: 405-414.
- Deineko EV, Novoselya TV, Zagorskaya AA, Filipenko EA, Shumnyi VK (2000) Expression instability of the marker *nptII* gene in transgenic tobacco plants. *Russ J Plant Physiol* **47**: 394-399.
- Doyle JJ and Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull* **19**: 11-15.
- Finnegan J and McElroy D (1994) Transgene inactivation: plants fight back! *Biotechnol* **12**: 883-888.
-

-
- Frazzon AP, Vaz Junior I, Masuda A, Schrank A, Vainstein MH (2000) In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* **94**: 117-125.
- Gooday GW, Zhu WY, Donnell RW (1992) What are the roles of chitinases in the growing fungus? *FEMS Microbiol Lett* **100**: 387-392.
- Herrera-Estrella A and Chet I (1999) Chitinases in biological control. In: Jollès P and Muzzarelli RAA (eds), Chitin and Chitinases. (pp. 171-184) Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NI, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **277**: 1229-1231.
- Jefferson RA and Wilson KJ (1994) The *gus* gene fusion system. In: Gelvin SB, Schilperoort RA, Verma DPS (eds), Plant Molecular Biology Manual. (section B14/ pp. 9-33) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Kang SC, Park S, Lee DG (1998) Purification and characterization of a chitinase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Inv Pathol* **72**: 276-281.
- Kishimoto K, Nishizawa Y, Tabei Y, Hibi T, Nakajima M, Akutsu K (2002) Detailed analysis of rice chitinase gene expression in transgenic cucumber plants showing different levels of disease resistance to grey mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Sci* **162**: 655-662.
- Lorito M, Harman GE, Hayes CK, Broadway RM, Tronsmo A, Woo SL, Di Pietro A (1993) Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum* - purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathol* **83**: 302-307.
- Lorito M, Hayes CK, Di Pietro A, Woo SL, Harman GE (1994) Purification, characterisation and synergistic activity of a glucan 1,3-Beta-glucosidase and an *N*-acetyl-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathol* **84**: 398-405.
-

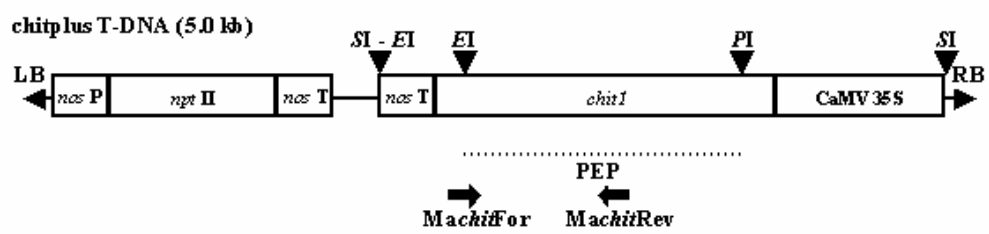
- Lorito M, Mach RL, Sposato P, Strauss J, Peterbauer CK, Kubicek CP (1996) Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the ech42 (endochitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 14868-14872.
- Lorito M, Woo SL, Fernandez IG, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzun S, Scala F (1998) Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7860-7865.
- Maqbool SB and Christou P (1999) Multiple traits of agronomic importance in transgenic indica rice plants: analysis of transgene integration patterns, expression levels and stability. *Mol Breed* **5**: 471-480.
- Memelink J, Swords KMM, Staehelin LA, Hoge JHC (1994) Southern, northern and western blot analysis. In: Gelvin SB and Schilperoort, RA (eds), *Plant Molecular Biology Manual*. (pp. F1/1-23) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantan* **15**: 473-497.
- Patil RS, Ghormade V, Deshpande V (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb Technol* **26**: 473-483.
- Peach CRW and Velten J (1994) *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. In: Gelvin SB and Schilperoort RA (eds), *Plant Molecular Biology Manual*. (pp. B1/1-19) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Pinto AS, Barreto CC, Schrank A, Ulhoa CJ, Vainstein MH (1997) Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Can J Microbiol* **43**: 322-327.
-

- Reissig JL, Stromnger L, Leloir LF (1955) A modified colorimetric method for the determination of N-acetylamino sugars. *J Biol Chem* **217**: 959-966.
- Rohini VK and Rao KS (2001) Transformation of peanut (*Arachis hypogaea L.*) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease. *Plant Sci* **160**: 889-898.
- Sambrook J and Russel DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- St Leger RJ, Charnley K, Cooper RMK (1986) Cuticle degrading enzymes of entopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *J Inv Pathol* **47**: 117-125.
- St Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK (1991) Characterization of a chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Inv Pathol* **58**: 415-426.
- St Leger RJ, Staples RC, Roberts DW (1993) Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. *J Inv Pathol* **61**: 81-84.
- St Leger RJ, Joshi L, Bidochka M, Rizzos MJ, Roberts DW (1996) Characterisation and ultrastructural location of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviridae* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *App Env Microbiol* **62**: 907-912.
- Terakawa T, Takaya N, Horiuchi H, Koike M, Takagi M (1997) A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. *Plant Cell Rep* **16**: 439-443.
-

Yabuki M, Mizushima K, Amatou T, Ando A, Fuji I, Shimada M, Yamashida M (1986)
Purification and characterisation of chitinase and a chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila* subesp *anarae* A42. *J General App Microbiol* **32**: 25-32.

Figure 1. T-DNA constructs. (A) *Chitplus* construct containing the cDNA of the *chit1* gene from *M. anisopliae*. (B) *Chitless* construct, a control version T-DNA lacking the expression cassette CaMV 35S-*chit1*-*nos* T. LB: T-DNA left border; RB: T-DNA right border; *nos* P: *nos* promoter; *nos* T: *nos* terminator; *nptII*: neomycin phosphotransferase II encoding gene (kanamycin selectable marker); CaMV 35S: Cauliflower Mosaic Virus leader sequence of 35S ribossomic RNA. Positions of primers *MachitFor* and *MachitRev* and the probe (PEP) used for PCR and Southern blot analyses are shown respectively by black filled arrows and a fine broken line. Restriction endonuclease sites: *SI*: *SacI*; *EI*: *EcoRI*; *PI*; *PstI*.

A



B

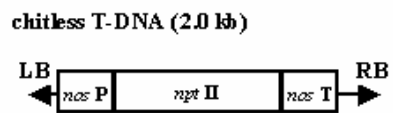


Figure 2. PCR and Southern blot analyses of *chitless* and *chitplus* transgenic plants. (A) PCR amplification of the fungal *chit1* transgene using the *MachitFor* and *MachitRev* primers and template DNA from: two control *chitless* plants (C₂₃ and C₂₆), the vector pMOG402 harbouring the *chitplus* T-DNA (Pch) and eight *chitplus* transgenic plants (T₁₂ to T₄₃). A 0.75 kb product was detected in Pch and in *chitplus* plants, but not in *chitless* ones. (B) Southern blot analysis of *EcoRI* digested genomic DNA extracted from *M. anisopliae* (Ma), wild-type tobacco (WT), two control *chitless* plants (C₂₃ and C₂₆) and eight *chitplus* plants (T₁₂ to T₄₃) probed with a 1.5 kb fragment of *chit1* coding region (PEP). Except for one common signal shared with all plants, number of bands corresponded to the number of *chit1* inserts.

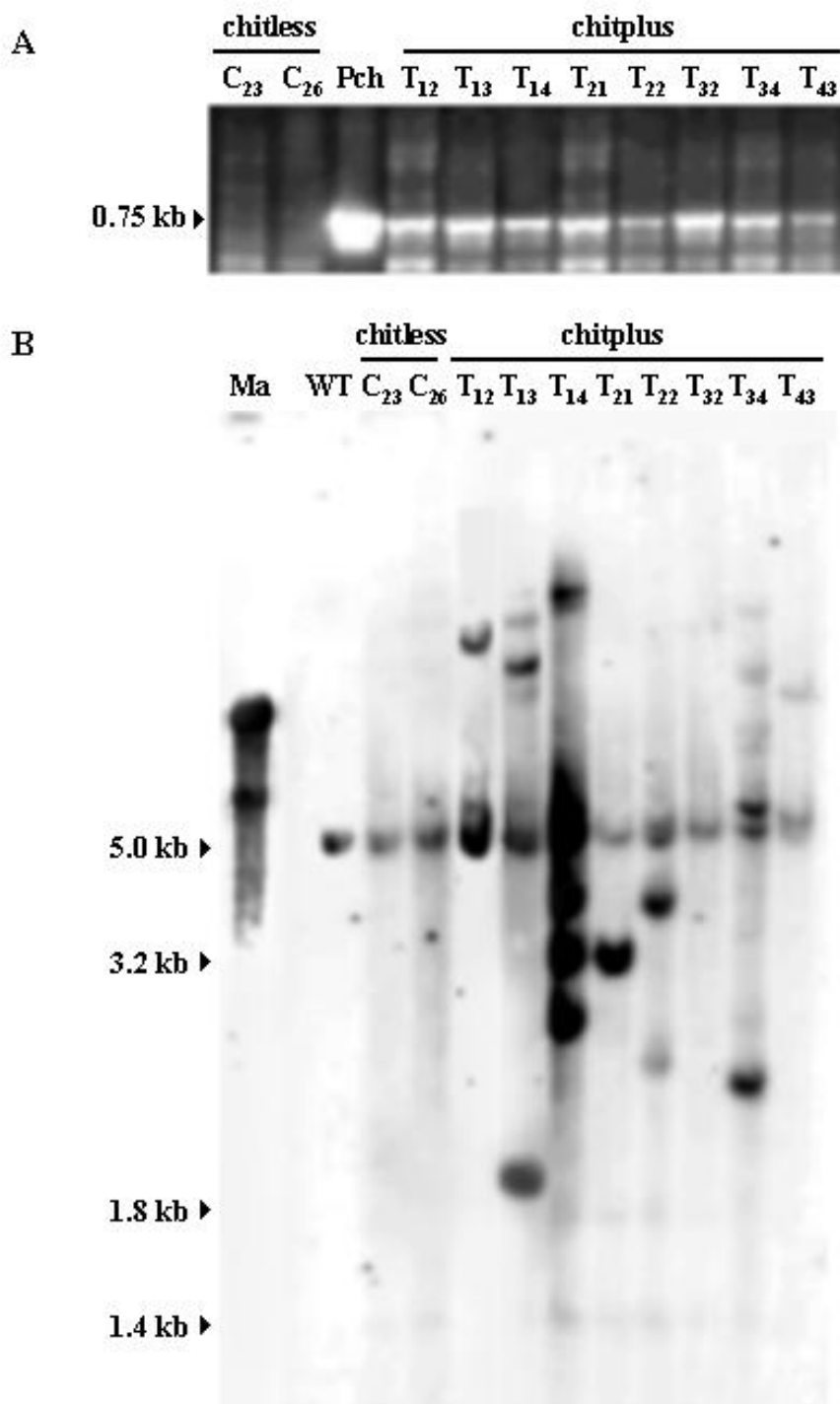


Figure 3. Western blot and chitinase activity gels of leaf protein extracts from *chitless* and *chitplus* transgenic plants. Leaf soluble proteins (50 µg per lane) were extracted from wild-type (WT), *chitless* (C₂₃ and C₂₆) and *chitplus* (from T₁₂ to T₄₃) tobacco plants, separated by SDS-PAGE (12,5% for western and 12% for chitinase gels) and submitted to (A) western blot analysis, visualised with anti-CHIT42 polyclonal antibodies and to (B and C) chitinase activity gels, with black bands representing the hydrolysis of glicol-chitin, a substrate copolymerised in the polyacrilamide matrix. Estimated molecular weight of the chitinase (42 kDa) is indicated.

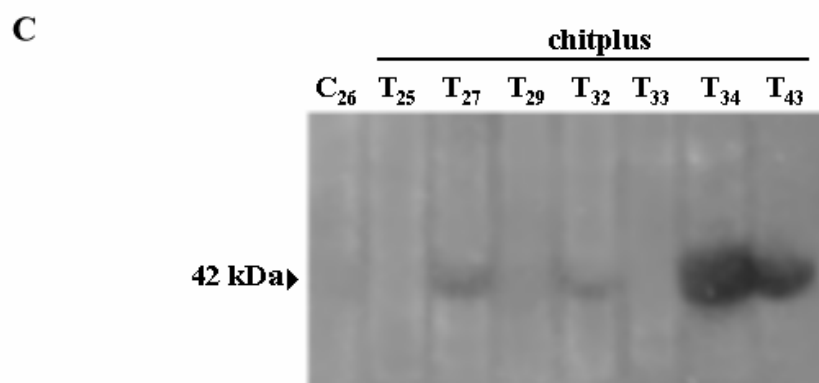
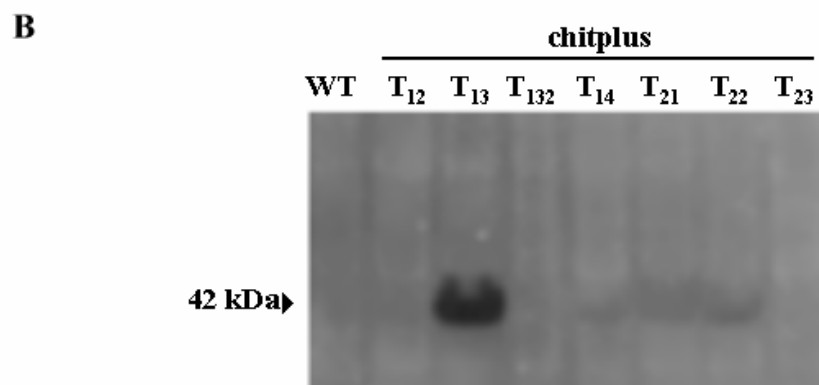
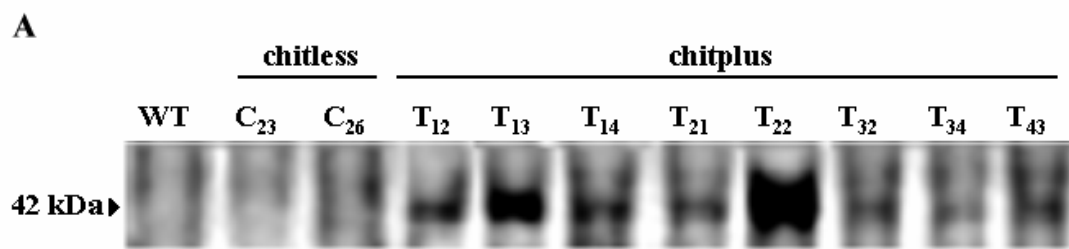


Figure 4. Chitinase specific activity in leaf protein extracts. Leaf protein crude extracts were prepared from wild-type (WT), *chitless* (C₂₃ and C₂₆) and *chitplus* (T₁₂ to T₄₃) tobacco plants and chitinase activity was assayed against four synthetic substrates (A) *p*-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosamine (*p*NP-GlcNAC), (B) N,N'-diacetylchitobiose (GlcNAC₂), (C) N,N',N'',N'''-tetracetylchitotetraose (GlcNAC₄). Values are an average of three independent determinations. Bars labelled with the same letter are not significantly different according to Duncan's test ($\alpha=0,05$).

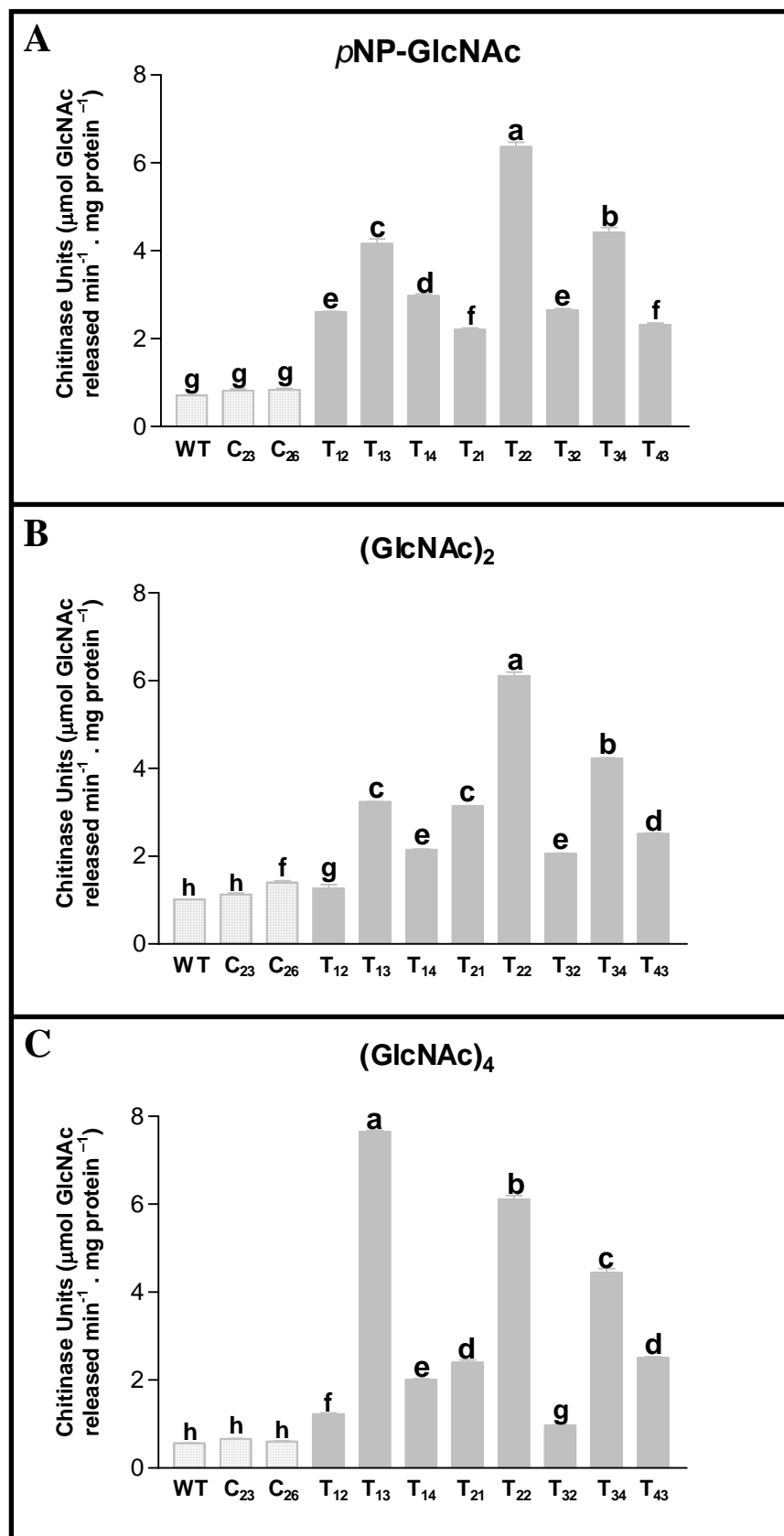


Figure 5. Resistance assay of transgenic plants to the phytopathogenic fungus *R. solani*. (A) Tobacco *chitless* (C₂₆) and *chitplus* plants (T₁₃, T₂₂, T₃₄, T₄₃) were cultivated under aseptic conditions for one month and leaves were removed and put into dishes containing either 0,85% Phytoagar (up) or added of 0.8 mg/mL (fw) of mycelia of the pathogen (down). Dark zones correspond to necrotic lesions, caused by fungic attack one week after inoculation. (B) Four month-old progenies of selfed control (SWT), *chitless* (SC₂₆) and *chitplus* (ST₁₃, ST₂₂, ST₃₄, ST₄₃) plants were grown on infested soil added of 8 g (fw) of *R. solani* mycelia. Highly damaged leaves with necrotic and chlorotic lesions were observed in SWT and SC₂₆, with the best standing *chitplus* transgenics. Results are given one month after fungus inoculation.

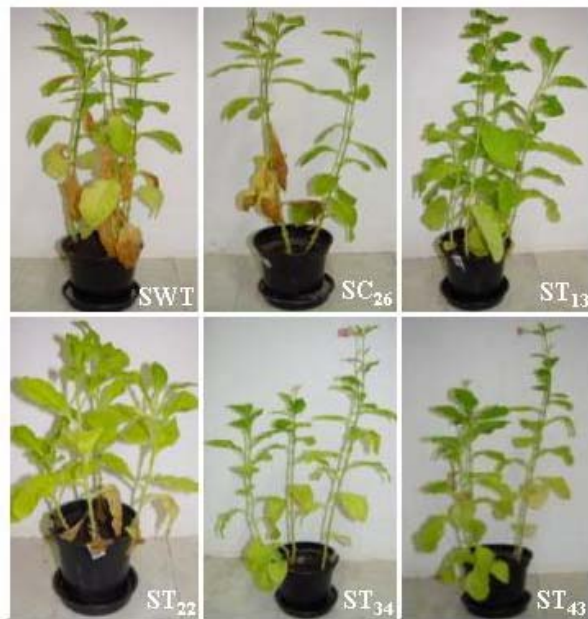
A**B**

Table 1. Inheritance pattern of the *chit1* gene in the progeny of self-pollinated transgenic plants bearing two copies of the transgene at unlinked loci.

T ₀ chitplus lines	Progeny tested	<i>chit1</i> (+) plants	<i>chit1</i> (-) plants	<i>P</i> segregation ratio (15:1) ^a
T₁₃	20	18	2	0.8741
T₂₂	19	15	4	0.9947
T₃₄	14	11	3	0.9907
T₄₃	14	2	12	0.0000

^a Segregation ratio expected for double hemizygous individuals in which a single locus is enough to produce the phenotype. *P*: Probability of accepting the expected mendelian proportions, calculated based on two tailed-testing associated to binomial distribution.

Capítulo 4

Discussão Geral, Conclusões e Perspectivas

4.1 Discussão Geral

Conforme descrito na seção “Revisão Bibliográfica” (seção 2.3, “Plantas transgênicas expressando quitinases”), a transformação genética de plantas com genes de quitinases tem sido realizada em muitos trabalhos, empregando genes de origem diversa e uma grande variedade de espécies de plantas hospedeiras. Entre os vegetais transformados com esta classe de genes inclui-se desde sistemas-modelo como o tabaco, a plantas cultivadas de elevado valor econômico como trigo, tomate, batata e maçã. Na imensa maioria dos casos, o transgene é expresso com sucesso e quantidades de enzima recombinante são produzidas em níveis suficientes para conferir aumento significativo ou, até mesmo, uma completa resistência a fungos fitopatogênicos como, por exemplo, *R. solani*. Algumas vantagens das quitinases na proteção de plantas contra patógenos incluem seu potencial fungicida, o fato de possuírem um alvo específico, minimizando efeitos nocivos à planta hospedeira, e seu caráter atóxico a humanos e vertebrados superiores, além de conferirem resistência a um amplo espectro de patógenos (Herrera-Estrella & Chet, 1999; Patil et al., 2000). Deste modo, a introdução de genes de quitinases em plantas mostra-se uma estratégia eficiente para o combate de sintomas e doenças provocadas por tais microrganismos, aumentando a produtividade, reduzindo os custos associados à produção e contribuindo para uma redução nos índices de poluição ambiental vinculada ao uso de fungicidas.

Neste trabalho, plantas transgênicas de tabaco expressando o gene *chit1* do fungo entomopatogênico e acaricida *M. anisopliae* foram geradas pelo método de transformação genética por *A. tumefaciens*. A presença do transgene nos tecidos das plantas *chitplus* foi confirmada por PCR e a hibridização de Southern *blot* revelou que o número de cópias integradas no genoma das plantas estava entre uma e quatro. Uma grande variação, tanto na quantidade de proteína recombinante solúvel quanto nas atividades quitinolíticas geral e específica, foi detectada no grupo das plantas *chitplus*, embora nossos dados demonstrem que houve um aumento significativo destes parâmetros em relação às plantas *chitless* e não transgênicas. A progênie de plantas duplo-hemizigotas para a inserção do transgene e com elevados níveis de atividade quitinolítica foi analisada com o objetivo de verificar se o padrão de herança do transgene se desviava das proporções Mendelianas esperadas. Somente na progênie derivada da transgênica primária T₄₃ foi constatado um desvio estatisticamente significativo do padrão de herança Mendeliana, com o número de plantas portadoras do transgene grandemente reduzido. A variabilidade dos níveis da quitinase recombinante

CHIT42 nos tecidos foliares das plantas *chitplus* refletiu-se na resistência destes indivíduos às lesões provocadas pelo patógeno *R. solani*, pelo fato de que foram encontrados tanto indivíduos com uma assintomatologia completa da doença, quanto indivíduos com um nível de resistência semelhante às plantas controle *chitless* (T₂₂ e T₄₃, resultados apresentados no Capítulo 3). Uma série de experimentos complementares foi executada e cujos resultados não foram incluídos na Seção 3. Estes resultados estão apresentados na forma de Apêndices ao final desta Dissertação.

A grande variabilidade encontrada entre as transgênicas *chitplus* pode ser explicada pela baixa especificidade e uniformidade do processo de integração do T-DNA no genoma da célula vegetal, ocorrendo de maneira aleatória e em um número indefinido de locais, sendo possível a integração do transgene na forma de repetições *in tandem*, embora esta seja mais comumente descrita para os protocolos de transformação genética envolvendo biobalística, eletroporação e microinjeção (de la Riva et al., 1998; Kumar & Fladung, 2001). A necessidade de ocorrência de um pareamento mínimo entre a fita-T e as seqüências-alvo genômicas permite que cópias do T-DNA sejam integradas com igual probabilidade em regiões altamente transcritas do DNA nuclear, garantindo elevada transcrição do transgene, como em regiões de heterocromatina constitutiva, inacessível à maquinaria de transcrição durante a maior parte do ciclo celular, resultando em um baixo nível de expressão do transgene. A variação na expressão do transgene neste caso é dita decorrente de efeito de posição (Gelvin, 1998; Fu et al., 2000; Kumar & Fladung, 2001).

Além do local de integração, outros fenômenos também interferem na expressão do transgene como o silenciamento transcricional, o silenciamento pós-transcricional, a inativação em *trans* e a co-supressão (Finnegan & McElroy, 1994; Grant, 1999; Meyer, 1999). Estes mecanismos representam um sistema de defesa para a detecção e inativação de DNAs invasivos, como transgenes, transposons e vírus, que poderiam comprometer a viabilidade de células que expressam elevados níveis das proteínas e mRNAs associados a estes elementos exógenos (Matzke & Matzke, 1998; Fu et al., 2000). De modo geral, quando o transgene está presente como cópia única e a quantidade do seu transcrito permanece abaixo de um certo limiar, seu padrão de expressão não é afetado. No entanto, ao transpor este limiar, o gene, o mRNA ou a proteína produzidos por ele tornam-se alvos potenciais para a inativação em qualquer um destes níveis (Wassenegger, 2002). No silenciamento gênico transcricional, a síntese do mRNA correspondente ao transgene é inibida devido à estrutura da cromatina associada e a metilações de resíduos de citosinas nas regiões promotoras das

seqüências de DNA introduzidas. No silenciamento pós-transcricional, as regiões codificadoras estão sujeitas a metilações e este processo está associado à hidrólise de mRNAs produzidos de maneira aberrante (Grant, 1999). Na inativação em *trans*, genes contidos em um T-DNA podem ser inativados por metilação quando um segundo T-DNA é introduzido no genoma da célula vegetal, enquanto na co-supressão ocorre o silenciamento de genes endógenos que compartilham um alto grau de homologia com o transgene inserido, resultando na inativação de ambos (Finnegan & McElroy, 1994; Grant, 1999; Meyer, 1999; Kumar & Fladung, 2001).

Adicionalmente, quando há a integração simultânea de mais de uma cópia do transgene no genoma de uma célula vegetal, a orientação física de cada cópia dentro do loco transgênico também pode ser considerada uma fonte de variação na expressão do gene exógeno. A introdução de cópias inversamente repetidas resulta em silenciamento por orientação complementar das cadeias de mRNA produzidas, caracterizando o fenômeno de silenciamento por RNA antisense (Senior, 1998).

Uma vez ocorridos tais processos, a expressão do transgene pode ser restaurada após a segregação do mesmo em gerações subseqüentes, embora esta reversão ocorra com uma freqüência bastante pequena e sejam necessárias várias gerações para obter uma desmetilação total ou mesmo parcial do transgene (Finnegan & McElroy, 1994; Deineko et al, 2000). Por outro lado, há evidências de que o silenciamento gênico pode ocorrer *de novo* em qualquer geração, mesmo na descendência de plantas expressando ativamente o transgene e que efeitos de silenciamentos alternativos podem acontecer independentemente em transgenes heterólogos adjacentes (Fu et al., 2000)

Com a finalidade de promover a reativação de transgenes silenciados e garantir a estabilidade da expressão dos mesmos, o uso de 5-azacitidina (Komari et al., 1998) e a inclusão de regiões de ligação à matriz (MARs, do inglês, *matrix attached regions*), com elevada homologia a regiões transcricionalmente ativas do genoma, posicionadas próximo ao transgene, têm sido empregados para aumentar os níveis de expressão do transgene e sua estabilidade (Holmes-Davis & Comai, 1998)

Estes fenômenos podem explicar não somente a grande heterogeneidade na expressão do transgene encontrada entre as plantas *chitplus* geradas neste trabalho, mas fornecem possíveis justificativas para os casos em que a presença do transgene é detectada no DNA de plantas transformadas, mas nenhuma ou pequena quantidade de seu produto é sintetizada. Inúmeros trabalhos relatam grande variação nos níveis de expressão de transgenes

codificadores de quitinases entre plantas transformadas, utilizando como receptor plantas como tabaco e batata (Ding et al., 1998; Lorito et al., 1998), maçã (Bolar & Bolar, 2001), arroz (Datta et al., 2001), amendoim (Rohini & Rao, 2001), grama (Chai et al., 2002) e pepino (Kishimoto et al., 2002), o que reforça esta característica como propriedade inerente aos protocolos de transformação genética vegetal. Não raro, esta variabilidade é detectada nas diferentes etapas do processo de expressão gênica, como nas quantidades de mRNA do transgene e no conteúdo de proteína recombinante produzida, que exercem influência direta sobre a resistência das plantas ao ataque por fungos patogênicos (Ding et al., 1998; Lorito et al., 1998; Bolar & Bolar, 2001; Datta et al., 2001, Rohini & Rao, 2001; Chai et al., 2002; Kishimoto et al., 2002).

Quanto à associação entre os níveis de expressão de CHIT42 e o número de cópias presentes no genoma das plantas transformadas, embora nossos dados sugiram que duas cópias do transgene tenham produzido plantas com maior quantidade de proteína recombinante solúvel e atividade específica de quitinase, não houve uma tendência contínua de aumento destas variáveis quando mais de duas cópias foram integradas no DNA nuclear das plantas transformadas. Este fenômeno pode ser explicado pelo fato de que o aumento de cópias do transgene aumenta a suscetibilidade do mesmo a mecanismos de silenciamento, descritos acima. De fato, na literatura, tem sido relatada a tendência de que o número de cópias integradas do transgene não está relacionada diretamente com o nível de expressão do mesmo (Gelvin, 1998). Nenhuma correlação entre o número de cópias e o nível de transcrição e síntese da enzima recombinante foi detectada em plantas de tabaco e batata (Lorito et al., 1998), maçã (Bolar & Bolar, 2001) e grama (Chai et al., 2002).

Embora muitos trabalhos destaquem as vantagens do emprego de genes de quitinases no combate a fungos fitopatogênicos, alguns distúrbios fisiológicos e genéticos têm sido encontrados nas plantas transgênicas. Como já descrito anteriormente, no primeiro grupo de desordens, destacam-se o tempo de floração e o crescimento retardados, o aumento no número de flores e frutos, e a redução no peso da planta (Bolar et al., 2000; Bolar et al., 2001; Rohini & Rao, 2001; Gongora & Broadway, 2002). Em relação à herança de transgenes em plantas transformadas geneticamente, uma certa instabilidade no padrão de herança como desvios do padrão Mendeliano de segregação do transgene, tem sido descritos. Deineko et al. (2000) verificaram problemas semelhantes a este em 12 de um total de 102 plantas de tabaco transformadas com o gene marcador *nptII* para a seleção contra o antibiótico aminoglicosídico canamicina. Nestes indivíduos, foram detectadas anormalidades como segregação distorcida

com redução do número de indivíduos com o gene marcador integrado, surgimento de segregantes com fenótipo variegado para a resistência ao antibiótico permanecendo por gerações seguintes, e perda completa do transgene na primeira geração de autopolinização das plantas transgênicas. À semelhança deste último trabalho, encontramos, em um total de 67 plantas testadas, 14 em que houve problemas de herança, demonstrados na diminuição do número de indivíduos apresentando o transgene (Apêndice 1: Figura 5). Tal fenômeno pode ser atribuído à integração do transgene em locais desfavoráveis do genoma vegetal, a perda total do transgene ou a modificação de sua seqüência por mutações, sendo mais comumente vinculados ao aumento no número de inserções do T-DNA (Cherdshewasart et al., 1993; Deineko et al., 2000). Entretanto, deve-se salientar que tais distúrbios têm sido registrados em um pequeno número de trabalhos, nos quais poucos indivíduos exibem tais fenótipos aberrantes, prevalecendo a regularidade e a ausência destes efeitos indesejáveis nas plantas transgênicas.

A aplicabilidade de genes de quitinases na transformação genética de plantas, com o objetivo de promover uma resposta mais efetiva das mesmas frente a doenças causadas por microrganismos patogênicos, representa uma alternativa ao emprego de microrganismos antagonistas aos patógenos vegetais ou de defensivos agrícolas químicos. A eficiência do emprego dos antagonistas biológicos depende de condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento, multiplicação e infecção, o que tem dificultado a sua implementação em ampla escala, principalmente diante das variações ambientais. Os insumos químicos são notoriamente onerosos e, principalmente para o controle de moléstias fúngicas, pouco efetivos. Por meio do presente trabalho, demonstramos uma maneira de superar estes obstáculos, inserindo um gene de um dos microrganismos antagonistas em um sistema vegetal modelo, conferindo às plantas a capacidade de responder aos sintomas da infecção fúngica, mantendo seu aspecto saudável.

4.2 Conclusões e Perspectivas

A busca por estratégias eficientes ao combate de doenças fúngicas em plantas tem sido contínua, sendo a utilização de genes codificadores de quitinases uma valiosa abordagem para a geração de plantas transgênicas resistentes a doenças causadas por microrganismos. Várias espécies cultivadas têm sido transformadas com estes genes oriundos de fungos já empregados no controle biológico, tais como o gênero *Trichoderma*, tendo sido obtido aumento dos níveis de resistência nas plantas transgênicas, inclusive com casos de resistência a mais de um patógeno simultaneamente. Não obstante, relatos de efeitos fisiológicos e genéticos negativos sobre as plantas transformadas têm sido observados isoladamente e restritos apenas a um número bastante reduzido de espécies. Embora o fungo *M. anisopliae* já seja empregado com sucesso no controle biológico de muitas pragas de lavoura, e já tenha sido descrita a sua elevada produção de quitinases, pouco ainda se explora do potencial deste microrganismo, uma vez que poucos genes envolvidos na interface com o hospedeiro foram isolados até o momento.

Os resultados apresentados nesta Dissertação visam à avaliação da capacidade do gene *chit1*, que codifica uma dessas quitinases, de conferir resistência a fungos fitopatogênicos em plantas transgênicas. As principais conclusões obtidas são as seguintes:

- (i) plantas transgênicas de tabaco capazes de expressar o gene *chit1* de *M. anisopliae* foram geradas de forma estável, o número de cópias de *chit1* integradas nos seus genomas variou de 1 a 4, e a herança do transgene segue o padrão Mendeliano;
 - (ii) as plantas transgênicas contendo *chit1* são capazes de processar corretamente o produto da tradução, produzindo uma quitinase recombinante ativa;
 - (iii) as plantas transgênicas com 2 cópias de *chit1* integradas nos seus genomas apresentam maiores quantidades da proteína recombinante, maiores níveis de atividades enzimáticas geral e específica e maior resistência à infecção por *R. solani*;
 - (iv) o gene *chit1* de *M. anisopliae* codifica uma proteína com nítido efeito fungicida ao inibir a sintomatologia da infecção por *R. solani* em plantas transgênicas de tabaco;
 - (v) há uma relação direta entre a atividade específica de quitinase recombinante e o aumento nos níveis de resistência às lesões causadas pela infecção por *R. solani* nas plantas transgênicas.
 - (vi) a expressão do transgene não mostrou qualquer efeito adverso observável nas plantas transgênicas.
-

Este trabalho abre perspectivas mais amplas de emprego do gene *chit1* (e genes homólogos e heterólogos) no controle de doenças e pragas de culturas vegetais. Entre estas perspectivas, gostaríamos de destacar a introdução do gene *chit1* em plantas cultivadas de interesse econômico como arroz, milho, cevada e soja suscetíveis aos fungos *Piricularia oryzae* (ou brusone, do arroz), *R. solani* (ferrugem-da-bainha em gramíneas) e *Bipolaris sorokiniana* (mancha-marrom-da-cevada e da aveia). Sugere-se, ainda, que testes sejam executados com um número maior de patógenos, para verificar a hipótese de resistência múltipla, além da realização de experimentos com o objetivo de verificar uma possível resistência das plantas transgênicas a insetos herbívoros.

Referências Bibliográficas

Capítulos 1, 2 e 4

5. Referências Bibliográficas

Alves SB (1998) Controle microbiano de insetos. Editora da Fundação de estudos agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, 407 p.

Baratto CM (2001) Detecção e expressão de quitinases do entomopatógeno e acaricida *Metarhizium anisopliae*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, 80 p.

Bolar JP, Norelli JL, Wong KW, Hayes CK, Harman GE, Aldwinckle HS (2000) Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to scab and reduces vigour. *Phytopathol* **90**: 72-77.

Bolar JP, Norelli JL, Harman GE, Brown SK, Aldwinckle HS (2001) Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgen Res* **10**: 533-543.

Bogo MR, Rota CA, Pinto Jr H, Ocampos M, Correa CT, Vainstein MH, Schrank A (1998) A chitinase encoding gene (*chit1* gene) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterisation of genomic and full-length cDNA. *Curr Microbiol* **73**: 221-225.

Bradfish GA & Harmer SL (1990) Omega canatoxin GVIA and the nifedipine inhibit the depolarizing action of the fungal metabolite destruxin B on muscle from the tobacco budworm *Heliothis virescens*. *Toxicon* **28**: 1249-1254.

Chai B, Maqbool SB, Hajela RK, Green D, Vargas Jr JM, Warkentin D, Sabzikar R, Sticklen MB (2002) Cloning of a chitinase-like cDNA (*hs2*), its transfer to creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) and development of brown patch (*Rhizoctonia solani*) disease resistant transgenic lines. *Plant Sci* **163**: 183-193.

Cherdshewasart W, Gharti-Chhetri GW, Saul MW, Jacobs M, Negrutiu I (1993) Expression instability and genetic disorders in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* L. plants. *Transg Res* **2**: 307-320.

Clarkson JM & Charnley AK (1996) New insights into mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol* **4**: 197-203.

Datta K, Jumin T, Oliva N, Ona I, Velazhahan R, Mew TW, Muthukrishnan S, Datta SK (2001) Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Sci* **160**: 405-414.

Deineko EV, Novoselya TV, Zagorskaya AA, Filipenko EA, Shumnyi VK (2000) Expression instability of the marker *nptII* gene in transgenic tobacco plants. *Russ J Plant Physiol* **47**: 394-399.

de la Riva GA, González-Cabrera J, Vázquez-Padrón R, Ayra-Pardo C (1998) *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Elect J Biotechnol* **1**: 1-16.

Ding X, Golappakrishnan B, Johnson BL, White F, Wang X, Morgan T, Kramer KJ, Muthukrishnan S (1998) Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. *Transg Res* **7**: 77-84.

Dumas C, Matha V, Quiot JM, Vey A (1996) Effects of destruxins, cyclic dipeptide mycotoxins, on calcium balance and phosphorylation of intracellular proteins in lepidopteran cell lines. *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol Toxicol* **114**: 213-219.

Flach J, Pilet PE, Jollès P (1992) What's new in chitinase research? *Experientia* **48**: 701-712.

Ferron P (1981) Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: Burges HD (ed), *Microbial control of pests and diseases*. Academic Press, Londres, 465-481.

Finnegan J & McElroy D (1994) Transgene inactivation: plants fight back! *BioTechnol* **12**: 883-888.

Frazzon AP, Vaz Junior IS, Masuda A, Schrank A, Vainstein MH (2000) In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* **94**: 117-125.

Fukamizo T & Kramer KJ (1987) Effect of 20-hydroxyecdysone on chitinase and β -*N*-acetylglucosaminidase during the larval-pupal transformation of *Manduca sexta* (L.). *Insect Biochem* **17**: 547-550.

Fu X, Duc LT, Fontana S, Bong BB, Tinjuangjun P, Sudhakar D, Twyman RM, Christou P, Kohli A (2000) Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transg Res* **9**: 11-19.

Gelvin S (1998) The introduction and expression of transgenes in plants. *Curr Op Biotechnol* **9**: 227-232.

Gelvin SB (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**: 223-256.

Gongora CE & Broadway RM (2002) Plant growth and development influenced by transgenic insertion of bacterial chitinolytic enzymes. *Mol Breed* **9**: 123-135.

Gooday GH, Zhu WY, Donnel RW (1992) What are the roles of chitinases in growing fungus? *FEMS Microbiol Lett* **100**: 387-392.

Gooday GW (1995) Diversity of roles for chitinases in nature. In: Zakaria MB, Wan Muda WM, Abdullah MP (eds), *Chitin and Chitosan*. Penerbit Universiti Kebangsaan, Malásia, 191-202.

Grant SR (1999) Dissecting the mechanisms of post-transcriptional gene silencing: divide and conquer. *Cell* **96**: 303-306.

Grison R, Grezes-Besset B, Schneider M, Lucante N, Olsen L, Leguay JJ, Toppan A (1996) Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. *Nature Biotechnol* **14**: 643-646.

Hall FR (1991) Pesticide application technology and integrated pest management (IPM). In: Pimentel D (ed), *Handbook of pest management in agriculture*. CRC Press, Boca Raton, 153-163.

Harris RJ, Harcourt SJ, Glare TR, Rose EA, Nelson TJ (2000) Susceptibility of *Vespula vulgaris* (Hymenoptera: Vespidae) to generalist entomopathogenic fungi and their potential to wasp control. *J Inv Pathol* **75**: 251-258.

Henrissat B (1999) Classification of chitinases modules. In: Jollès P & Muzzarelli RAA (eds), *Chitin and chitinases*. Birkhäuser Verlag, Basel, 137-156.

Herrera-Estrella A & Chet I (1999) Chitinases in biological control. In: Jollès P & Muzzarelli RAA (eds), *Chitin and Chitinases*. Birkhäuser Verlag, Basel, 171-184.

Holmes-Davis R & Comai L (1998) Nuclear matrix attachment regions and plant gene expression. *Trends Plant Sci* **3**: 91-96.

Hooykaas PJJ & Mozo T (1994) *Agrobacterium* molecular genetics. In: Gelvin S B & Schilperoort R A (eds), *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, seção B3/1-9.

Jackson CW, Heale JB, Hall RA (1985) Traits associate with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni*. *J Biol Chem* **274**: 9803-9811.

Juarez MP, Crespo R, Fernandez GC, Lecuona R, Cafferata LF (2000) Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a Chagas' Disease vector. *J Inv Pathol* **76**: 198-207.

Kaakeh W, Reid BL, Bennet GW (1996) Transmission of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Imperfect Fungi: Hyphomycetes) and Hidramethylnon among German cockroaches (Dictyoptera: Blatellidae). *J Entomol Sci* **31**: 378-390.

Kaaya GP & Munyinyi DM (1995) Biocontrol potential of the entomopathogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for Tsetse flies (*Glossina* spp) at developmental sites. *J Inv Pathol* **66**: 237-241.

Kaaya GP, Mwangi EN, Ouna EA (1996) Prospects for biological control lives ticks *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomopathogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J Inv Pathol* **67**: 15-20.

Kang SC, Park S, Lee DG (1998) Purification and characterization of a chitinase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Inv Pathol* **72**: 276-281.

Kishimoto K, Nishizawa Y, Tabei Y, Hibi T, Nakajima M, Akutsu K (2002) Detailed analysis of rice chitinase gene expression in transgenic cucumber plants showing different levels of disease resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Sci* **162**: 655-662.

Komari T, Hiei Y, Ishida Y, Kumashiro T, Kubo T (1998) Advances in cereal gene transfer. *Curr Op Plant Biol* **1**: 161-165.

Kumar S & Fladung M (2001) Controlling transgene integration in plants. *Trends Plant Sci* **6**: 155-159.

Lezama-Gutierrez R, Trujillo-De La Luz A, Molina-Ochoa J, Rebolledo-Dominguez O, Pescador AR, Lopez-Edwards M, Aluja M (2000) Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae): laboratory and field trials. *J Econ Entomol* **93**: 1080-1084.

Logemann J & Schell J (1993) The impact of biotechnology on plant breeding, or how to combine increases in agricultural productivity with improved protection of the environment. In: Chet I (ed), *Biotechnology in plant disease control*. Wiley-Liss, Nova Iorque, 1-14.

Lopes RB, Alves SB, Tamai M (2000) Fungo *Metarhizium anisopliae* e o controle de *Frankliniella accidentalis* em alface hidropônico. *Scientia Agr* **57**: 239-243.

Lorito M, Harman GE, Hayes CK, Broadway RM, Tronsmo A, Woo SL, Di Pietro A (1993) Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum* - purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathol* **83**: 302-307.

Lorito M, Hayes CK, Di Pietro A, Woo SL, Harman GE (1994) Purification, characterisation and synergistic activity of a glucan 1,3-Beta-glucosidase and an *N*-acetyl-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathol* **84**: 398-405.

Lorito M, Mach RL, Sposato P, Strauss J, Peterbauer CK, Kubicek CP (1996) Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the ech42 (endochitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 14868-14872.

Lorito M, Woo SL, Fernandez IG, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzun S, Scala F (1998) Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7860-7865.

Matzke AJM & Matzke MA (1998) Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr Op Plant Biol* **1**: 142-148.

Messias, CL (1998) Controle microbiano de vetores transmissores da doença de Chagas. In: Controle Biológico. EMBRAPA, Jaguariúna, 264 p.

Meyer P (1999) The role of chromatin remodeling in transgene silencing and plant development. *In Vitro Cell Develop Biol/Plant* **35**: 29-36.

Mora AA & Earle ED (2001) resistance to *Alternaria brassicicola* in transgenic broccoli expressing a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene. *Mol Breed* **8**: 1-9.

Neuhaus JM, Ahl-Goy P, Hinz U, Flores S, Meins F (1991) High level of expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana sylvestris*: susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotinae* infection. *Plant Mol Biol* **16**: 141-151.

Oldach KH, Becker D, Lorz H (2001) Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat. *Mol Plant-Microbe Int* **14**: 832-838.

Patil RS, Ghormade V, Deshpande V (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enz Microbial Technol* **26**: 473-483.

Pinto AS, Barreto CC, Schrank A, Ulhoa CJ, Vainstein MH (1997) Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Can J Microbiol* **43**: 322-327.

Rand KN, Morre T, Sriskantha A, Spring K, Tellam R, Willandsen P, Cobon GS (1989) Cloning and protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9657-9661.

Renn N, Bywater AF, Barson G (1999) A bait formulated with *Metarhizium anisopliae* for the control of *Musca domestica* L. (Dipt., Muscidae) assessed in large-scale laboratory enclosures. *J Appl Entomol* **123**: 309-314.

Robertus JD & Monzingo AF (1999) The structure and action of chitinases. In: Jollès P & Muzzarelli RAA (eds), *Chitin and Chitinases*. Birkhäuser Verlag, Basel, 125-136.

Rohini VK & Rao KS (2001) Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease. *Plant Sci* **160**: 889-898.

Sahai AS & Manocha MS (1993) Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol Rev* **11**: 317-338.

Samuels GJ (1996) *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol Res* **100**: 923-935.

Senior IJ (1998) Uses of plant gene silencing. *Biotechnol Genetic Eng Rev* **15**: 79-119.

St Leger RJ, Charnley AK, Cooper RM (1986a) Cuticle-degrading of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *J Inv Pathol* **47**: 295-302.

St Leger RJ, Charnley AK, Cooper RM (1986b) Cuticle-degrading of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *J Inv Pathol* **48**: 85-95.

St Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK (1991) Characterization of a chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Inv Pathol* **58**: 415-426.

St Leger RJ & Joshi L (1997) The application of molecular techniques to insect pathology with emphasis on entomopathogenic fungi. In: Lacey L (ed), *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, Nova Iorque, 367-394.

St Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ (1995) Protein synthesis in *Metarhizium anisopliae* growing on host cuticle. *Mycol Res* **99**: 6349-6354.

St Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Rizzo NW, Roberts DW (1996) Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. favoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Appl Env Microbiol* **62**: 907-912.

Tabaeizadeh Z, Agharbaoui Z, Harrak H, Poysia V (1999) Transgenic tomatoes plants expressing a *Lycopersicon chilense* gene demonstrate improved resistance to *Verticillium dahliae* race 2. *Plant Cell Rep* **19**: 197-202.

Takatsu Y, Nishizawa Y, Hibi T, Akutsu K (1999) transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Scientia Horticult* **82**: 113-123.

Terakawa T, Takaya N, Horiuchi H, Koike M, Takagi M (1997) A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. *Plant Cell Rep* **16**: 439-443.

Tzfira T & Citovsky V (2002) Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends Cell Biol* **12**: 121-129.

Wang YP, Nowak G, Culley D, Hadwiger LA, Fristensky B (1999) Constitutive expression of pea defense gene DRR206 confers resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in transgenic canola (*Brassica napus*). *Mol Plant-Microbe Int* **12**: 410-418.

Warren RAJ (1996) Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Ann Rev Microbiol* **50**: 183-212.

Wassenegger M (2002) Gene silencing-based disease resistance. *Transg Res* impresso.

Zambryski P (1992) Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 465-490.

Zhu Q, Maher EA, Masoud S, Dixon RA, Lamb CJ (1994) Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Biotechnol* **12**: 807-812.

Zupan J, Muth TR, Draper O, Zambryski P (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J* **23**: 11-28.

Resumo

A resistência a doenças em plantas transgênicas tem sido obtida por meio da expressão de genes isolados de bactérias, fungos micoparasitas e plantas. Neste trabalho, relatamos a utilização de um gene do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* como modo de gerar resistência a doenças fúngicas em plantas. O gene *chit1* codifica a quitinase CHIT42 (EC 3.2.1.14), pertencente a uma classe de glicosil-hidrolases capazes de converter quitina em oligômeros de *N*-acetil-glicosamina (NAcGlc). Quando presentes em tecidos vegetais, supõe-se que as quitinases ataquem especificamente a parede celular de fungos invasores, provocando danos às hifas e causando a morte por lise das células fúngicas. Deste modo, dois diferentes grupos de plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* foram produzidos: no primeiro deles, denominado *chitplus*, os indivíduos possuem o gene *chit1* sob o controle do promotor CaMV 35S. O segundo grupo, denominado *chitless*, consiste de plantas transformadas com um T-DNA não contendo o gene do fungo. Trinta e quatro plantas transgênicas resistentes à canamicina (17 de cada grupo) foram regeneradas a partir de discos de folhas infectados por *Agrobacterium tumefaciens*. A produção da quitinase em extratos protéicos de folhas foi analisada por zimogramas em SDS-PAGE contendo glicol-quitina e corados por calcoflúor branco, na forma de um *screening* dos transgênicos primários. As plantas transgênicas foram testadas, ainda, por meio de ensaios colorimétricos empregando oligômeros sintéticos de NAcGlc como substratos específicos, além de *immunoblot* e *Western blot* com soro anti-quitinase. A quantidade de enzima recombinante nas plantas *chitplus* variou desde nenhuma atividade detectável a elevados níveis de expressão da enzima. A hibridização de *Southern blot* demonstrou que o número de cópias do gene *chit1* integradas no genoma vegetal foi estimado entre uma e quatro. A primeira geração de plantas transgênicas geradas por autofecundação de parentais portadores de duas cópias do transgene foi testada com relação à estabilidade da herança do transgene e em 43 de um total de 67 descendentes, originados de quatro cruzamentos independentes, o padrão de segregação não diferiu das proporções Mendelianas esperadas. Ensaio de resistência, desafiando as plantas transgênicas com o basidiomiceto *Rhizoctonia solani* foram realizados e uma evidente diminuição da área foliar contendo lesões fúngicas foi observada entre as linhagens transgênicas, embora variações na atividade quitinolítica tenham influenciado o nível de resistência. Nossos resultados sugerem uma relação direta entre a atividade específica de quitinase e ao aumento nos níveis de resistência às lesões causadas pela infecção por *R. solani*.

Abstract

Plant resistance in transgenic plants has been obtained by expressing genes isolated from bacteria, mycoparasitic fungi and plants. Here we report the employment of a gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* as a tool to generate resistance to fungal diseases in plants. The *chit1* gene encodes the chitinase CHIT42 (EC 3.2.1.14), belonging to a class of glycosyl-hydrolases able to convert chitin into *N*-acetyl-glucosamine (GlcNAc) oligomers. When present in plant tissues, chitinases are supposed to disrupt the invading fungal cell wall specifically, causing hyphae damage and leading to cell lysis. Hence two different groups of transgenic *Nicotiana tabacum* plants were produced. The first group was named *chitplus*, in which individuals harbour the *chit1* gene under the control of the CaMV 35S promoter. The second group, named *chitless*, carried a T-DNA not containing the fungal gene. Thirty-four kanamycin resistant plants (17 of each group) were regenerated from leaf discs infected with *Agrobacterium tumefaciens*. Chitinase production in leaf protein extracts was analysed through zymograms in SDS-PAGE containing glycol-chitin and stained by calcofluor white, as a screening of primary transformants. Transgenic plants were also evaluated by colorimetric assays using synthetic GlcNAc oligomers as specific substrates besides immunoblot and Western blot probed with rabbit anti-chitinase sera. The amount of recombinant enzyme in *chitplus* plants ranged from no detectable chitinase activity to high levels of enzyme expression. Southern blot hybridisation revealed that *chit1* copy number inserted into plant genomes varied from one to four. The first self pollinated generation of transgenic lines bearing two copies of the transgene was tested on inheritance stability and in 43 out of 67 descendants, derived from four independent crosses, the segregation pattern was discovered not to differ from the predicted Mendelian ratios. Resistance assays challenging transgenic plants with the basidiomycete *Rhizoctonia solani* were performed and a clear decrease in the foliar area containing fungal lesions was observed amongst transgenic lines, though variations in chitinase activity also reflected on the resistance level. Our results suggest a direct relationship between chitinase specific activity and the improvement in the resistance to lesions caused by infection.

Anexo 1

Resultados não apresentados no manuscrito

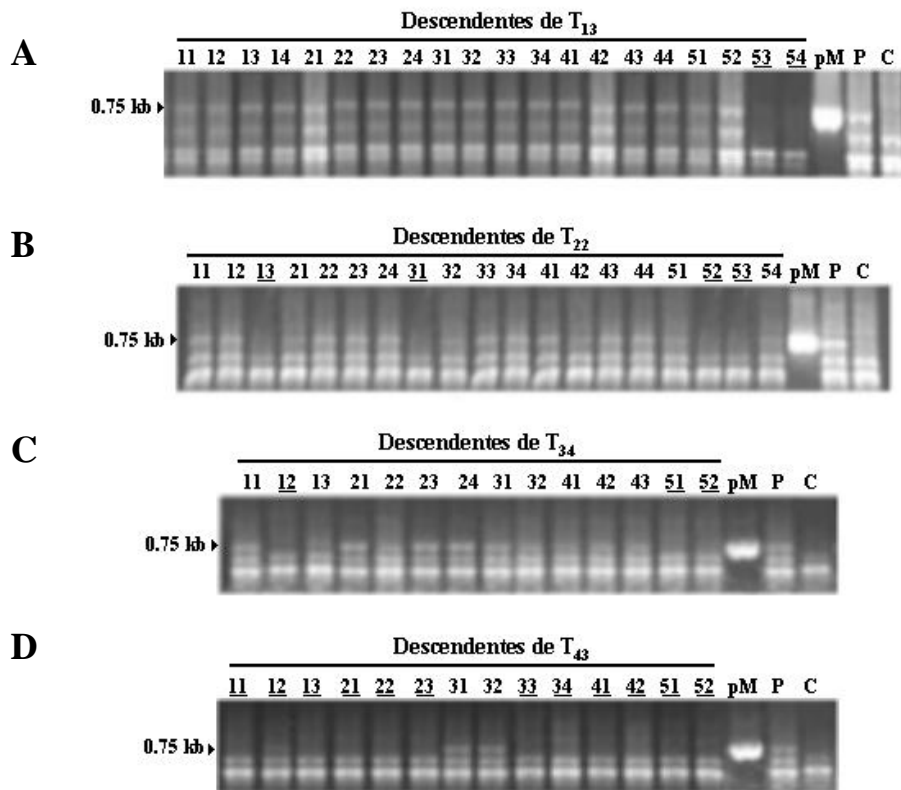


Figura 5. Análise da segregação do transgene *chit1* na progênie de plantas transgênicas primárias. Sessenta e sete indivíduos, gerados por autofecundação das plantas parentais duplo-hemizigotas T₁₃ (A), T₂₂ (B), T₃₄ (C) e T₄₃ (D) foram submetidos à análise por PCR (ver Capítulo 3, seção *Material and Methods, PCR analysis*). A presença do produto de 0,75 kb, que corresponde a um fragmento do gene codificador da quitinase CHIT42 de *M. anisopliae* (canaletas com número não-sublinhado), denota plantas com pelo menos uma cópia do transgene em um dos locos transgênicos. Segregantes sem este o produto foram considerados selvagem para ambos locos transgênicos (canaletas com número sublinhado). pM: plasmídeo binário pMOG22-*chit1*; P: reação de amplificação usando como molde o DNA extraído do respectivo indivíduo parental; C: reação de amplificação usando como molde o DNA extraído da planta *chitless* C₂₃.

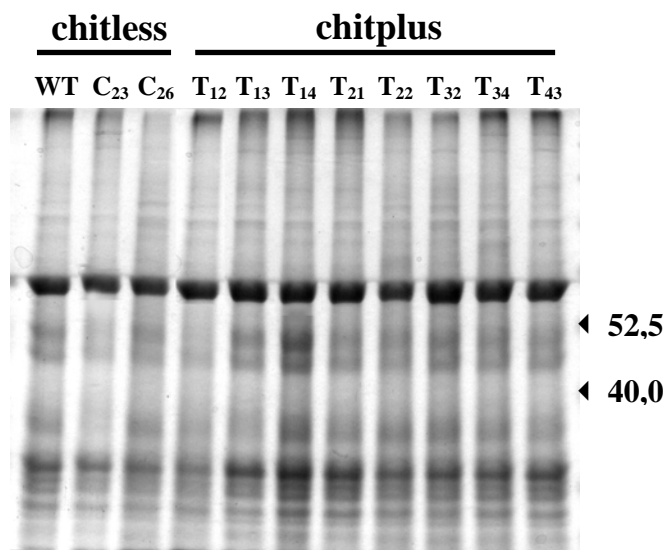


Figura 6. Perfil eletroforético dos extratos protéicos totais foliares de plantas chitless e chitplus em gel desnaturante de SDS-poliacrilamida. Após a preparação dos extratos protéicos, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliácridamida 12% (como descrito para *Immunoblot*, no Capítulo 3, seção *Material and Methods*). A ausência de bandas de 45 e 42 kDa, correspondentes às formas imatura e madura do polipeptídeo CHIT42, revela que os extratos de ambos grupos de plantas parentais são idênticos e, provavelmente, a quantidade de enzima recombinante é insuficiente para ser detectável por SDS-PAGE. Massa molecular indicada está em kDa. Plantas chitless estão indicadas pela inicial C e plantas chitplus, por sua vez, pela inicial T. WT: extrato da planta de tabaco não transgênico.

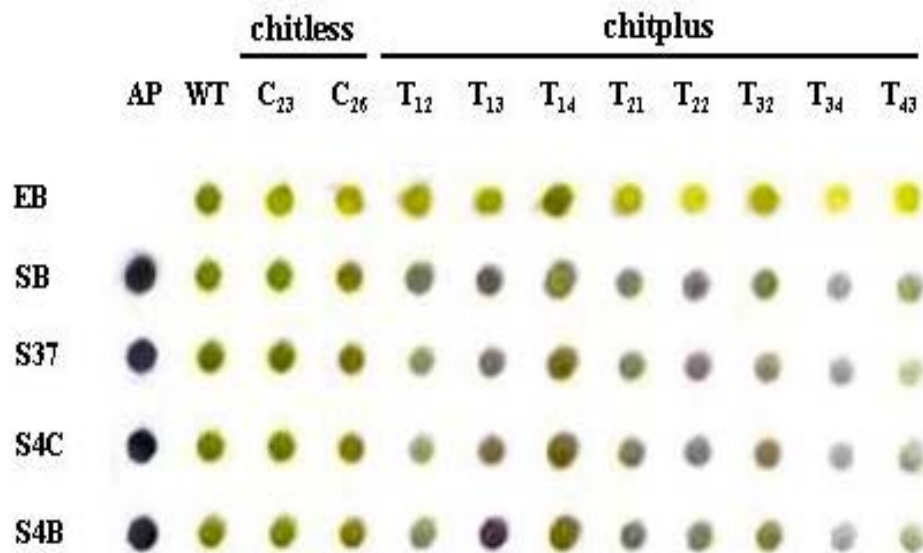


Figura 7. Immunodots para análise da eficiência do pré-tratamento dos anticorpos primários com antígenos de plantas não transformadas. Cerca de 1 mg de proteína foliar de uma planta da cultivar selvagem SR1 (preparada como descrito para *Immunoblot*, no Capítulo 3, seção *Material and Methods*) foram pré-incubados com o soro de coelhos imunizados (diluído 1:100 em PBS 1 X) com a proteína CHIT42. A esta mistura foi adicionado PMSF 5 mM. A seguir, foram testadas várias condições de incubação, como seguem: S37: mistura mantida durante a noite a 37°C; S4C e S4B: mistura mantida durante a noite a 4°C. Nesta condição, diante da precipitação do PMSF, a amostra foi dividida em duas e uma delas foi centrifugada à temperatura ambiente a 13.000 rpm por 30 s e o sobrenadante foi coletado. A alíquota restante (S4B), não centrifugada, foi utilizada diretamente como anticorpo primário para o reconhecimento da enzima recombinante nos extratos das plantas transgênicas. Para detecção, utilizou-se anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina. A intensidade da coloração púrpura é diretamente proporcional à quantidade da quitinase recombinante presente no extrato protéico. Em cada ponto foram aplicados 200 µg de proteína total foliar, (quantificados como descrito para *Glycol-chitin zymograms*, no Capítulo 3, seção *Material and Methods*). EB: extrato vegetal incubado sem soro contendo anticorpos anti-CHIT42; SB: soro anti-CHIT42 sem pré-incubação; AP: 5 µL por ponto do anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina (diluído 1:10.000 (v/v) em PBS 1 X); Plantas parentais chitless estão indicadas pela inicial C e plantas parentais chitplus, por sua vez, pela inicial T. WT: extrato da planta de tabaco não transgênico.

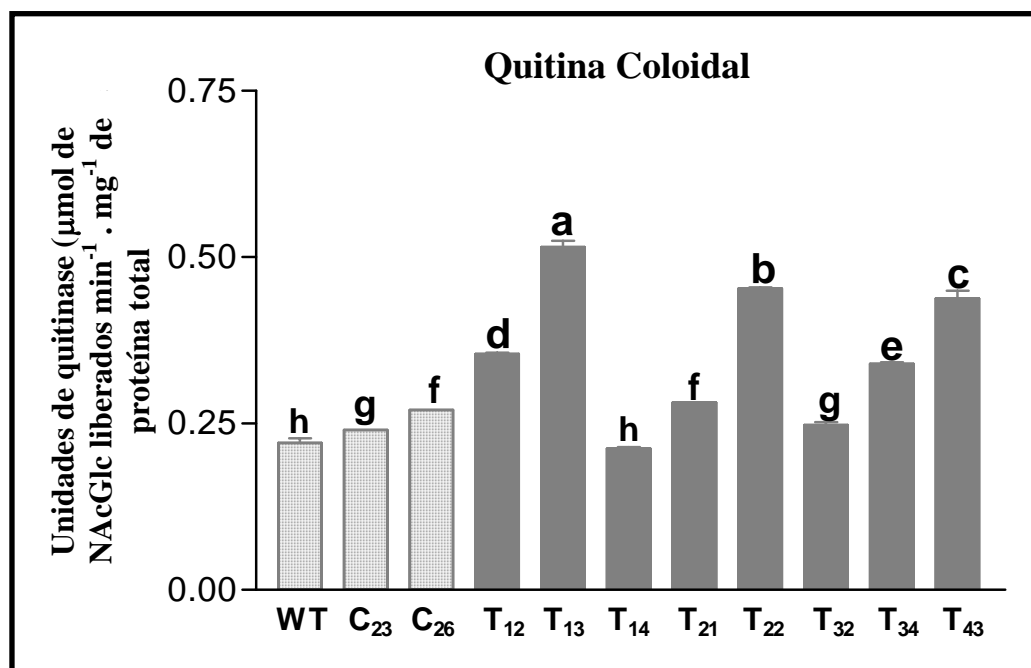


Figura 8. Atividade quitinolítica específica da enzima CHIT42 contra o substrato quitina coloidal. O ensaio enzimático para a detecção da atividade enzimática foi realizado como descrito em *Chitinase activity assays*, no Capítulo 3, seção *Material and Methods*. Reações realizadas em triplicata. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de NAcGlc por min por mg de proteína total. Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Duncan ($\alpha = 0,05$). Plantas parentais chitless estão indicadas pela inicial C e plantas parentais chitplus, por sua vez, pela inicial T. WT: extrato da planta de tabaco não transgênico.