

FERNANDA TANAKA

PROCESSO DE AGROTRANSFORMAÇÃO EM *Guignardia citricarpa*

CURITIBA

2007

FERNANDA TANAKA

PROCESSO DE AGROTRANSFORMAÇÃO EM *Guignardia citricarpa*

Monografia apresentada à disciplina Estágio Em, como requisito à conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Chirlei Glienke

CURITIBA

2007

DEDICO

A todos que me incentivaram e
contribuíram para minha formação

"A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É esta a emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e arte."

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha família, em especial meus pais, meus avós e meus irmãos e irmãs, por todo incentivo, amor, carinho e paciência em todos os momentos.

À Prof^a. Dr^a. Chirlei Glienke pela orientação, incentivo, amizade e ótima convivência durante todo o tempo de realização do estágio.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Vanessa Kava Cordeiro e Lygia Vitória Galli-Terasawa, pela convivência, sugestões e auxílio no LabGeM.

Um agradecimento especial à Mestre e futura Doutora Josiane Aparecida Gomes Figueiredo, por todo auxílio e orientação nos momentos em que mais precisei, pelo incentivo, amizade e ótima convivência e pelas incansáveis horas de trabalho e dedicação durante todo tempo de realização deste trabalho. Muito obrigada!

A todos os colegas de trabalho, Carol(s), Danny, Doug, Jô, Jociney, Josi, Ju, Lari, Lis, Maysa, Renata, Rosana, Tati, pela ótima convivência, pelas conversas e risadas na hora do cafezinho e por tornaram o ambiente de trabalho um local tão agradável. E também ao rádio do LabGem, que em muitas horas era o único companheiro.

Aos meus amigos: Dilza, Lu, Cíntia, Pri, Mariah, Nati, Mari, Doug, Fábio, Jef, Leo. Sem eles nada teria graça. Às “gatas loucas” em especial, por todo carinho e amizade incondicionais, pelas conversas sérias e outras nem tão sérias assim, pelas risadas, saídas, viagens, noites em claro estudando, fazendo trabalho ou só bagunça mesmo, pelos “dias de gorda” e por todos os momentos que tivemos durante esses quatro anos.

A todas as meninas do melhor time de futebol feminino da biologia, pelos animados jogos nas sextas feiras, pelas risadas, chutes na canela, roxos, lesões e contusões e que faziam as sextas feiras serem tão divertidas.

Ao Prof. Dr. Augusto Schrank e ao Mestre Charley Christian Staats do Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo auxílio, sugestões e fornecimento de materiais.

A CAPES / CNPq, Fapesp e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELA.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 MANCHA PRETA DOS CITROS.....	4
3.2 O FUNGO <i>Guignardia citricarpa</i>	8
3.3 TRANSFORMAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS	10
3.3.1 Sistema de transformação genética mediada por <i>A. tumefaciens</i>	11
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO	15
4.2 MEIOS DE CULTURA	16
4.2.1 Meio completo (MC)	16
4.2.2 Meio BDA – Batata-dextrose-ágar.....	16
4.2.3 Meio de Luria e Bertani (LB) (SAMBROOK et al, 1989).....	17
4.2.4 Meios de co – cultivo (IM).....	17
4.2.5 Meio seletivo	18
4.3 SOLUÇÕES E REAGENTES.....	18
4.3.1 Canamicina 100mg/mL.....	18
4.3. 2 Cefotaxima 100 mg/mL	18
4.3.3 Acetoseríngona 10mM (AS)	19
4.3.4 Glifosinato de amônio (40mg/mL)	19
4.3.5 Solução MES 1M.....	19
4.3.6 KOH 5M.....	20
4.3. 7 Elementos Traço	20
4.3.8 Solução salina 0,85% (p/v)	20
4.3.9 Solução de vitaminas	20
4.3.10 Solução Estoque de Sais para IM	21
4.3.11 Solução de sais M-100 para meio seletivo	21
4.3.12 Gel de agarose 0,8%.....	22

4.3.13 Solução de brometo de etídio	22
4.4 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA	22
4.4.1 Seleção do marcador	22
4.4.2 Suspensão de esporos e micélio para agrotransformação.....	22
4.4.3 Otimização das condições de crescimento para agrotransformação	23
4.4.4 Amplificação do vetor	23
4.4.5 Transformação de <i>E.coli</i> com o vetor pPZP201BK	23
4.4.6 Extração do vetor	24
4.4.7 Transformação de <i>A. tumefaciens</i>	25
4.4.7.1 Obtenção de células quimiocompetentes.....	25
4.4.7.2 Transformação de <i>A. tumefaciens</i> com vetor pPZP201BK	25
4.4.7.3 Resistência da cepa EHA105 de <i>A. tumefaciens</i> ao antibiótico cefotaxima .	26
4.4.7.4 Transformação de <i>G. citricarpa</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i>	26
4.4.8 Análise dos transformantes.....	28
4.4.8.1 Microscopia	28
4.4.8.2 Estabilidade mitótica.....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS FÚNGICOS AO COMPOSTO GLIFOSINATO DE AMÔNIO.....	30
5.2 TRANSFORMAÇÃO EM <i>E. coli</i> COM O VETOR pPZP201BK	31
5.3 RESISTÊNCIA DA CEPA EHA105 DE <i>A. tumefaciens</i> AO ANTIBIÓTICO CEFOTAXIMA	32
5.4 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE <i>G. citricarpa</i> PARA AGROTRANSFORMAÇÃO.....	33
5.5 AGROTRANSFORMAÇÃO DO FUNGO <i>G. citricarpa</i>	34
6 CONCLUSÃO	41
7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	42

LISTA DE TABELA

TABELA 1 – RESUMO DOS PROCESSOS CELULARES ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO <i>Agrobacterium</i> -planta	13
---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – TIPOS DE LESÕES DA MPC EM FRUTOS E FOLHAS DE CITROS...	6
FIGURA 2 – VETOR PPZP201BK (COVERT ET AL., 2001)	15
FIGURA 3 – CRESCIMENTO MICELIAL DE 3 LINHAGENS DE <i>G. citricarpa</i> EXPOSTAS AO GLIFOSINATO DE AMÔNIO	30
FIGURA 4 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DO DNA PLASMIDIAL pPZP201BK	32
FIGURA 5 – CEPA EHA105 DE <i>A. tumefaciens</i> EXPOSTA AO ANTIBIÓTICO CEFOTAXIMA.....	32
FIGURA 6 – CRESCIMENTO MICELIAL DA LINHAGEM 33/05 DE <i>G. citricarpa</i> SOBRE PAPEL CELOFANE EM MEIO SELETIVO.....	33
FIGURA 7 – COLÔNIAS DE <i>Guignardia citricarpa</i> TRANSFORMANTES OBTIDAS DE PLACAS COM PERÍODO DE CO-CULTIVO DE 48 E 72 HORAS	35
FIGURA 8 - FOTOMICROGRAFIA EM MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA DOS TRANSFORMANTES DE <i>G. citricarpa</i>	36
FIGURA 9 – ESPOROS DE <i>G. citricarpa</i> TRANSFORMANTE EM MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA (AUMENTO 100X)	37
FIGURA 10 - CRESCIMENTO MICELIAL DAS COLÔNIAS TRANSFORMANTES APÓS TRÊS REPIQUES CONSECUTIVOS EM MEIO SELETIVO	37

RESUMO

O fungo *Guignardia citricarpa* (Anamorfo: *Phyllosticta citricarpa*), é o agente causador da Mancha Preta dos Citros (MPC), uma doença que causa grandes prejuízos em diversas áreas produtoras de frutas cítricas ao redor do mundo, inclusive no Brasil. O Brasil é o maior produtor de laranjas e de suco de laranja do mundo e a lucratividade do setor seria ainda maior caso as perdas, devido ao ataque de patógenos, não apresentasse tamanha magnitude. Muitos estudos têm demonstrado que a bactéria fitopatogênica *Agrobacterium tumefaciens*, freqüentemente utilizada em procedimentos de transformação de plantas, possui a capacidade de transferir parte do seu DNA (T-DNA) presente em seu plasmídeo Ti também para fungos. Plasmídeos contendo o gene *gfp*, que transcreve para a produção da proteína GFP, têm sido amplamente utilizados como marcadores genéticos para investigação dos processos de infecção e colonização do fungo no hospedeiro. O desenvolvimento de um protocolo de transformação genética para o fungo *G. citricarpa* representa um importante passo para a sua caracterização e para o estudo da interação planta-patógeno. Neste trabalho foi descrita a transformação genética da linhagem de 33/05 de *G. citricarpa* mediada pela bactéria *A. tumefaciens*. Primeiramente a linhagem EHA105 de *A. tumefaciens* foi transformada com o vetor pZP201BK, o qual contém o gene GFP e o gene de resistência ao glifosinato de amônio, para posterior transformação do fungo. Também foram realizados testes com a linhagem 33/05 de *G. citricarpa* para verificar sua sensibilidade ao composto glifosinato de amônio, assim como para otimizar as condições de crescimento para agrotransformação. A linhagem 33/05 mostrou-se sensível ao glifosinato de amônio, sendo possível, portanto, a sua utilização no processo de transformação como marcador de seleção dos transformantes fúngicos. A amplificação do vetor pZP201BK foi realizada transformando-se a linhagem DH10B de *E. coli* através da metodologia de cloreto de cálcio seguido de choque térmico. Posteriormente, a bactéria *A. tumefaciens* foi transformada com este vetor utilizando-se a mesma metodologia. Para a transformação do fungo *G. citricarpa* foram utilizados os protocolos desenvolvidos para a transformação dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Fusarium circinatum*, com algumas modificações. No total, foram obtidas 16 colônias de *G. citricarpa* transformantes sendo que, o co-cultivo com duração de 72 horas foi aproximadamente 50% mais eficiente do que a transformação obtida em 48 horas. Além disso, os transformantes só foram visualizados quando as etapas de pré-cultura do *A. tumefaciens* e o co-cultivo foram realizadas na presença de acetoseringona. Parâmetros relacionados ao co-cultivo como tempo de duração, temperatura e pH, também são importantes para a agrotransformação. O desenvolvimento de um protocolo de transformação genética para o fungo *G. citricarpa* representa um importante avanço no estudo da interação planta-patógeno.

1. INTRODUÇÃO

Com mais de um milhão de hectares de plantas cítricas em seu território, o Brasil tornou-se, na década de 80, o maior produtor mundial. A maior parte da produção brasileira de laranjas destina-se à indústria do suco, concentrada no estado de São Paulo, responsável por 70% das laranjas e 98% do suco que o Brasil produz (ABECITRUS, 2007).

De acordo com o Instituto de Desenvolvimento Econômico e Social (Ipardes), no Estado do Paraná, a citricultura ocupa uma área de 26 mil hectares, sendo 15 mil hectares plantados nas regiões Norte e Noroeste que produzem 410 mil toneladas de laranja. No Vale do Ribeira, são 11 mil hectares ocupados com citros que produzem 200 mil toneladas de tangerinas.

A receita com as exportações brasileiras de suco de laranja superou R\$2 bilhões pela primeira vez na história, na safra 2006/07, encerrada em 30 de junho. Só no primeiro semestre de 2007, as exportações totais de suco de laranja atingiram US\$1,19 bilhão e foram 85,24% superiores aos US\$643,38 milhões movimentados no primeiro semestre de 2006. O volume exportado, se comparados os mesmos períodos, cresceu 23,38%, de 830,42 milhões para 1,024 bilhão de toneladas (ABECITRUS, 2007).

Além da importância econômica, a citricultura tem grande função social, gerando cerca de 400 mil empregos diretos ou indiretos no Brasil (ABECITRUS, 2007). Segundo o Departamento de Economia Rural (Deral), estima-se que 14 mil agricultores paranaenses dedicam-se à produção de citros.

A lucratividade do setor seria ainda maior caso as perdas não apresentassem tamanha magnitude, principalmente as que estão relacionadas com o ataque de fitopatógenos. Problemas fitossanitários - entre eles a Mancha Preta dos Citros (MPC), causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* - tem causado grandes prejuízos em diversas áreas produtoras de frutas cítricas ao redor do mundo, inclusive no Brasil. No Estado do Paraná a doença passou a ser relatada a partir de 2004 na Região do Vale do Ribeira.

A despeito da crescente importância da MPC nos pomares brasileiros, pouco se sabe sobre a epidemiologia nas condições paranaenses. Desta maneira, todas as pesquisas realizadas na busca de novas medidas que atuem no controle da MPC tornam-se relevantes para o nosso estado e demais produtores de citros espalhados pelo Brasil.

A análise de muitos processos fisiológicos em microrganismos fitopatogênicos – imprescindível para a compreensão dos mecanismos de infecção e conseqüente elaboração de estratégias eficientes de controle das doenças – tem sido dificultada pela ausência de um sistema de transformação genética eficiente. Plasmídios contendo o gene *gfp*, que transcreve para a produção da proteína GFP, têm sido amplamente utilizados como marcadores genéticos para investigação dos processos de infecção e colonização do fungo no hospedeiro (MAOR *et al.*, 1998). Neste contexto, o desenvolvimento de um protocolo de transformação genética para o fungo *G. citricarpa* representa um importante passo para a sua caracterização e para o estudo da interação planta-patógeno.

Outras espécies morfológicamente semelhantes a *G. citricarpa*, como *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum*, tem sido relatadas na literatura como endofíticas de plantas saudáveis de citros. Estudos comparativos dos processos de infecção e colonização de plantas cítricas por linhagens endofíticas e patogênicas contendo o gene *gfp*, irão contribuir significativamente para estratégias de controle da doença. Além disso, para o estudo de genes de patogenicidade é imprescindível a existência de um método eficiente de transformação que viabilize o *knockout* gênico.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral:

- Desenvolver o sistema de agrotransformação para o fungo *G. citricarpa*.

E como objetivos específicos:

- Amplificar o vetor pPZP201BK, transformando a linhagem DH10B de *E. coli*.
- Transformar a linhagem EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor pPZP201BK.
- Desenvolver e otimizar um sistema de transformação genética para o fungo *Guignardia citricarpa* utilizando a linhagem transformada EHA105 de *A. tumefaciens*.
- Analisar os transformantes obtidos de *G. citricarpa*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MANCHA PRETA DOS CITROS

A Mancha Preta dos Citros (MPC), ou Pinta Preta, é uma doença causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely. Esta doença ataca plantas e frutas cítricas e vem causando graves e crescentes prejuízos para a citricultura brasileira, tanto pela redução da produtividade em pomares e depreciação dos frutos para o mercado de frutas frescas, como pelo aumento dos custos de produção para o controle da doença. A necessidade de pulverizações com fungicidas para o controle dessa doença onera a produção em cerca de US\$ 0,37 por caixa colhida, o que corresponde a aproximadamente 10,5 a 13,2% (CULTIVAR, 2003; AGRIANUAL, 2005). Frutos com sintomas da doença são depreciados para a comercialização *in natura*. Além disso, a MPC é considerada uma doença quarentenária A1 pela União Européia (EPPO/OEPP, 2003), o que vem ocasionando restrições nas exportações de frutos cítricos brasileiros para estes países.

A MPC foi primeiramente relatada em 1895 na Austrália, causando perdas consideráveis na variedade Valência, tanto nos frutos ainda nos pomares ou em fase pós-colheita (ROBBS & BITTENCOURT, 1995). No Brasil, a doença foi registrada pela primeira vez em 1937, em frutos coletados de uma feira livre na cidade de Piracicaba-SP (FEICHTENBERGER, 1999). Em pomares comerciais, a primeira constatação data de 1980, em plantas de mexerica Rio no estado do Rio de Janeiro (FEICHTENBERGER, 1999). Além destes estados a MPC está presente também no Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Santa Catarina, Paraná, Espírito Santos e Amazonas (CULTIVAR, 2006). A MPC tende cada vez mais atingir os municípios produtores, inclusive os de outros estados, devido a fácil disseminação através do vento ou por meio de material de propagação vegetativa (GOES *et al*, 2005).

Atualmente a doença apresenta ampla distribuição geográfica, sendo registrada em várias partes do mundo, como África, Ásia, Oceania, América Central, América do Sul e Antilhas (ROBBS & BITTENCOURT, 1995).

A MPC afeta todas as variedades de laranjeiras, principalmente as de maturação média-tardia ('Pêra') a tardias ('Valência' e 'Natal'). Com exceção da limeira ácida 'Tahiti', da laranjeira 'Azeda' e seus híbridos, todas as variedades comerciais são suscetíveis (AGUILAR-VILOSÓ, 1997). A doença provoca lesões na casca de frutos depreciando-os para o mercado interno de frutas frescas e restringindo-os para a exportação, mas não afeta a qualidade interna dos frutos, podendo ser utilizados na indústria do suco (FUNDECITRUS, 2007). Uma das principais características na MPC é que folhas e frutos podem estar infectados sem, contudo, apresentarem os sintomas típicos da doença. O aparecimento de sintomas pode demorar até um ano dependendo da variedade e das condições ambientais. Os mecanismos envolvidos na formação destas infecções não estão bem esclarecidos, porém sabe-se que sintomas mais severos da doença estão associados à exposição dos frutos a maior luminosidade, elevação da temperatura durante a maturação, frutos originados de árvores estressadas, velhas e debilitadas (KOTZÉ, 1981). Segundo BAAYEN *et al.* (2002), a estiagem também contribui para o aparecimento dos sintomas.

Os sintomas ocorrem principalmente em frutos, embora também possam aparecer em folhas e ramos. Em ataques severos, como nos casos em que a doença atinge o pedicelo dos frutos, pode ocorrer a queda prematura e acentuada dos mesmos, reduzindo a produtividade das plantas.

Segundo FEICHTENBERGER (1996), podem ocorrer quatro tipos principais de sintomas em frutos:

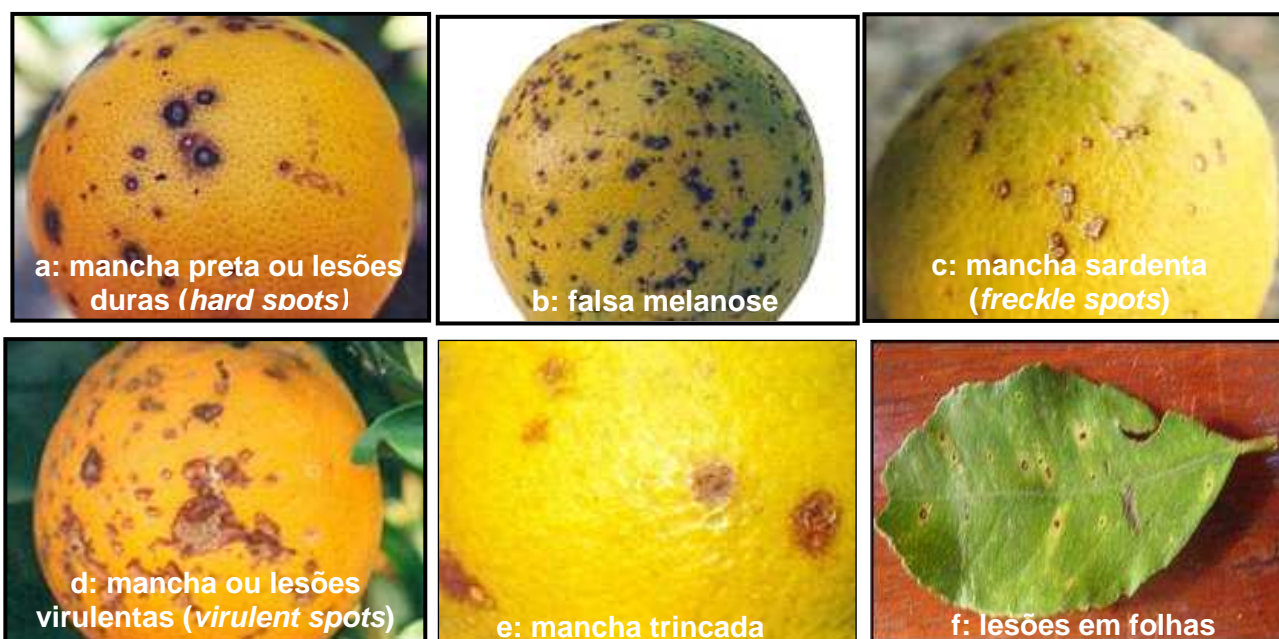
a) mancha preta ou lesões duras (*hard spots*): é o sintoma mais típico e comum da doença e geralmente surge quando os frutos iniciam a fase de mudança de cor da casca, levando a maturação externa. Caracteriza-se por apresentar bordas salientes com depressão no centro onde aparecem pequenas pontuações de coloração negra, que constituem os corpos de frutificação ou picnídios do fungo. Este sintoma pode ocorrer pós-colheita, durante o armazenamento e transporte dos frutos (FIGURA 1a).

b) falsa melanose: caracteriza-se por lesões minúsculas, numerosas e de coloração negra, podendo ser facilmente confundidas com as lesões da melanose causadas pelo fungo *Diaporthe citri* (*Phomopsis citri*) (FIGURA 1b).

c) mancha sardenta (*freckle spots*): geralmente aparecem depois que os frutos já passaram da coloração verde para a amarela ou laranja. As lesões são levemente deprimidas e de coloração avermelhada (FIGURA 1c).

d) mancha ou lesões virulentas (*virulent spots*): são resultantes do crescimento ou coalescência das lesões anteriores originando grandes lesões deprimidas com centro acinzentado e bordos salientes de coloração marrom-escuro ou vermelho-escuro. No centro também aparecem os picnídios e a casca na área da lesão fica completamente necrosada, embora a parte comestível permaneça intacta. Ocorre mais comumente nos frutos ao final da safra ou após a colheita, no armazenamento e transporte (FIGURA 1d).

FIGURA 1 – TIPOS DE LESÕES DA MPC EM FRUTOS E FOLHAS DE CITROS



Fonte: FUNDECITRUS (2007)

No Brasil, observa-se um quinto sintoma conhecido como mancha trincada (FIGURA 1e) (GOES *et al*, 2005) a qual é observada em frutos ainda verdes. Possui aspecto reticulado, ligeiramente saliente e superficial, variável

em tamanho, podendo apresentar halo. Não há formação de picnídios. Essas lesões aparecem sempre associadas com o ácaro da falsa ferrugem *Phyllocoptruta oleivora* (FUNDECITRUS, 2007).

Os sintomas em folhas e ramos são pouco freqüentes. Contudo, quando eles ocorrem, as lesões apresentam aparência semelhante às lesões duras dos frutos, com centro deprimido e os bordos salientes escuros (FIGURA 1f).

O ciclo da MPC pode ocorrer de duas maneiras: através dos picnidiósporos ou conídios (esporos assexuais) e dos ascósporos (esporos sexuais). Os ascósporos são produzidos em folhas cítricas em decomposição no solo durante a fase sexual do fungo (FEICHTENBERGER, 1996; ROBBS, 1990). Tanto a produção de conídios como de ascósporos é importante para a disseminação da doença. Entretanto, nas epidemias a importância dos ascósporos é bem maior, pois possuem maior viabilidade e tolerância ao ressecamento, favorecendo a sobrevivência do patógeno no campo. Sua disseminação dá-se por correntes de ar, as quais levam este tipo de esporo a curtas e longas distâncias. Os conídios ou picnidiósporos são produzidos em picnídios formados principalmente em lesões de frutos maduros, bem como em folhas caídas, ramos e pedúnculos. Estes esporos têm a sua disseminação facilitada pela água, e são os principais responsáveis pela disseminação a curtas distâncias e dentro de uma mesma planta (KOTZÉ, 1981).

O controle do patógeno baseia-se principalmente na utilização de fungicidas protetores e sistêmicos, aplicados isoladamente ou combinados, associados ou não a óleo mineral ou vegetal (GOES, 2002). A supressão por meio da retirada de folhas, assim como a de conídios formados em frutos, pela colheita antecipada, em áreas com alta intensidade de doença, reduzem o inóculo e contribuem para a redução da intensidade da MPC, entretanto, por si só não são suficientes para o controle adequado da doença (SPÓSITO, 2003). Segundo o mesmo autor, o controle químico usualmente aplicado no campo é prática importante, reduzindo de maneira eficaz os danos quantitativos, causados pela queda prematura de frutos sintomáticos, no entanto, não é capaz de reduzir a intensidade da doença em áreas com alta pressão de inóculo. Além disso, aplicações de fungicidas feitas de maneira indiscriminada

podem trazer conseqüências desfavoráveis ao ambiente, promovendo a seleção de isolados resistentes, conforme observado na África do Sul (HERBERT & GRECH, 1985).

3.2 O FUNGO *Guignardia citricarpa*

O fungo *Guignardia citricarpa* Kiely é o agente causal da MPC. É um fungo ascomiceto pertencente à classe dos Loculoascomicetos, ordem Dothideales e família Dothideaceae. Caracteriza-se por apresentar uma fase anamórfica ou assexuada, descrita como *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) VAN DER AA, e uma fase teleomórfica ou sexuada descrita como *Guignardia citricarpa*. Ambas as formas encontram-se geralmente associadas (JOHNSTON & FULLERTON, 1988).

As estruturas de frutificação da fase assexuada são representadas pelos picnídios, receptáculos macroscopicamente pequenos, globosos, pretos e semi-eruptivos que abrigam em seu interior os propágulos do fungo, denominados picnidiósporos ou conídios. Tais estruturas são unicelulares, ovóides, elípticas ou subglobosas, levemente clavadas quando jovens, apresentando a base truncada, arredondada e denteada no ápice, com uma membrana gelatinosa recobrimo-os. O número de núcleos pode variar, encontrando-se conídios uninucleados (quando jovens) e conídios bi, tri ou multinucleados, os quais são formados quando parte dos conídios uninucleados dividem seu núcleo em dois, três ou mais núcleos (GLIENKE-BLANCO *et al*, 2002). O crescimento da colônia apresenta-se como uma crosta negra, com margem de coloração amarelada e forma irregular (JOHNSTON & FULLERTON, 1988; BAAYEN *et al*, 2002), é lento, atingindo diâmetro aproximado de 7 cm em 20 dias em vários meios de cultura a 20°C (PUNITHALINGAM, 1982).

Os ascósporos são produzidos durante a fase sexuada e se encontram dentro de estruturas denominadas pseudotécios. Estes estão organizados em número de oito no interior dos ascos os quais apresentam forma de clava, são arredondados na extremidade superior e bitunicados. Os ascósporos são

unicelulares, hialinos, levemente acinzentados, rombóides, contendo grânulos e um grande vacúolo central, cobertos com um quepe gelatinoso nas extremidades (SIVANESAN, 1984).

Sob o ponto de vista genético, *G. citricarpa* é ainda pouco estudada. Sabe-se que possui pelo menos oito cromossomos e genoma de aproximadamente 21,5 Mb (BLANCO, 1999). Acreditava-se que *Guignardia citricarpa* poderia ser encontrada como patógeno em lesões e de forma assintomática em plantas saudáveis, no entanto estudos utilizando marcadores RAPD e regiões ITS1, 5,8S e ITS2, realizado por diversos autores (BLANCO, 1999; CHRISTO, 2002; STRINGARI, 2004; GLIENKE *et al.*, 2007) indicam a existência de duas populações diferentes: uma endofítica e a outra patogênica.

Em 1999, BLANCO comparou geneticamente, por meio de marcadores de RAPD, isolados de populações patogênicas e endofíticas de *Guignardia* spp. de diversas regiões e hospedeiros, constatando a existência de pelo menos duas populações geneticamente diferentes de *Guignardia* coexistindo de forma endofítica com linhagens patogênicas do mesmo fungo em citros. Em 2002, CHRISTO relatou a presença de pelo menos três espécies distintas de *Guignardia*, mas muito semelhantes entre si morfologicamente, que se encontram associadas em *Citrus* spp. O desenvolvimento de um par de *primers* capaz de amplificar um fragmento de 370 pb, específico para linhagens patogênicas de *G. citricarpa*, veio a corroborar para distinção genética entre estes grupos (GLIENKE *et al.*, 2007).

Outra consideração importante a respeito da diferenciação de linhagens endofíticas e patogênicas de *Guignardia* spp. é o fato de linhagens endofíticas isoladas de citros apresentarem maior similaridade genética com linhagens patogênicas de goiabeira (*G. psidii*), sugerindo que estes endofíticos não são patógenos latentes em citros e sim, endofíticos (GLIENKE *et al.*, 2007). No entanto, não se descarta a possibilidade da coexistência de formas endofíticas e patogênicas em outros hospedeiros, como se observa em *Citrus* spp.

3.3 TRANSFORMAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

A transformação genética caracteriza-se como um processo onde a célula absorve fragmentos de DNA exterior a ela e o incorpora em seu genoma de maneira estável. Bactérias e leveduras são, provavelmente, os únicos organismos conhecidos capazes de realizar o processo de transformação naturalmente. Atualmente, células de organismos superiores podem ser transformadas em condições artificiais.

O sucesso do processo de transformação em fungos filamentosos depende de pelo menos cinco etapas: 1) obtenção de células competentes, ou seja, capazes de captar o DNA; 2) o vetor de transformação; 3) o transporte do vetor ao núcleo; 4) propagação e expressão do vetor e 5) um método eficiente de identificação das células transformadas (POSSIEDE, 2004).

Para a transformação estável em células eucarióticas por DNA exógeno, é necessário vencer pelo menos duas barreiras, a membrana plasmática e a membrana nuclear, e em fungos, além da membrana nuclear não desaparecer durante a mitose (GROTELUESCHEN & METZEMBERG, 1995), há um terceiro obstáculo, a parede celular.

O primeiro relato de transformação genética em fungos filamentosos através de células desprovidas de parede celular (protoplastos) foi para o ascomiceto *Neurospora crassa* (CASE *et al.*, 1979) utilizando o gene que confere prototrofia para quinonas (*qa-2+*). Alguns anos mais tarde, *Aspergillus nidulans* foi transformado com o gene codificador para acetamidase (TILBURN *et al.*, 1983)

Com o passar dos anos, novos sistemas de transformação para fungos filamentosos começaram a ser desenvolvidos. Atualmente outras metodologias de transformação estão descritas para uma grande diversidade de fungos filamentosos. Os mecanismos empregados na transformação destes fungos abrangem aqueles que utilizam células desprovidas de parede celular pelo emprego de polietilenoglicol – PEG (CASE *et al.*, 1979) ou eletroporação (WARD *et al.*, 1988). No processo conhecido com biobalística, microprojéteis contendo DNA transformante bombardeiam as células intactas do hospedeiro receptor (ARMALEO *et al.*, 1990).

O sucesso de trabalhos baseados na complementação funcional para o isolamento de genes de patogenicidade e estudo de processos de infecção de fungos é dependente de um eficiente sistema de transformação genética (DEAN, 1997). No entanto, vários autores, entre eles AZEVEDO (1998) e KNOW-CHUNG *et al.* (1998), tem registrado a dificuldade em transformar fungos patogênicos utilizando as mais diversas técnicas.

3.3.1 Sistema de transformação genética mediado por *Agrobacterium tumefaciens*

Um método que tem sido considerado promissor no processo de transformação de fungos filamentosos envolve a utilização do microrganismo *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bactéria é um bacilo aeróbico, gram-negativo, flagelado, que vive no solo, pertencente à família Rhizobiaceae (GRIFFITHS *et al.*, 2002). É responsável pela doença da galha, na qual a planta infectada produz crescimentos descontrolados (tumores ou galhas), normalmente na base (coroa) da planta (GRIFFITHS *et al.*, 2002). A formação de galhas induzidas pelo *A. tumefaciens* é um processo natural e está diretamente associada à presença de um plasmídio de alto peso molecular (120 a 250kb), denominado plasmídio Ti (*tumor inducing*) (ANDRADE *et al.*, 2003).

Em 1995, BUNDOCK *et al.* otimizaram o método de transformação via *A. tumefaciens*, freqüentemente utilizado em procedimentos de transformação de plantas, para transformar a levedura *Sacharomyces cerevisiae*. Esse método é baseado na habilidade do *A. tumefaciens* de transferir parte de seu DNA, o T-DNA (*Transferred DNA*), presente no seu plasmídio Ti, para células eucarióticas.

Em 1998, De GROOT *et al.* demonstraram que esse sistema de transformação mediado pelo *A. tumefaciens* (agrotransformação), também poderia ser utilizado para a transformação de diversos fungos filamentosos. Após essas publicações iniciais, muitos pesquisadores, utilizando este sistema, conseguiram transformar com sucesso diversos fungos incluindo

representantes dos ascomicetos, basidiomicetos e zigomicetos (MICHIELSE *et al.*, 2005).

O plasmídio Ti pode ser dividido em duas regiões principais: a região de virulência (*vir*) e a região de T-DNA. Além destas duas regiões, o plasmídio Ti possui genes de replicação e incompatibilidade (*ori* e *inc*), catabolismo de opina (*opc*) e função de conjugação (*tra*), sendo nenhuma destas seqüências necessárias à virulência (HOOYKAS & BEIJERSBERGEN, 1994).

Na transformação mediada por *A. tumefaciens* (ATMT – *Agrobacterium tumefaciens mediated transformation*), o processo de infecção e transferência do T-DNA ocorre por uma série de etapas: quimiotaxia, adesão, indução da expressão dos genes *vir*, processamento e transferência do T-DNA, direcionamento do T-DNA até o núcleo e sua integração no genoma (GELVIN, 2003, MICHIELSE *et al.*, 2005)

O processo de transferência de DNA é dependente da expressão de genes *vir* cuja expressão é induzida por compostos secretados por plantas feridas, entre eles o acetoseringona. Este composto é capaz de atuar como sinalizador, promovendo quimiotaxia positiva para o *Agrobacterium* (DUARTE, 2005).

Proteínas codificadas pelos genes *vir* formam uma endonuclease capaz de reconhecer e processar o fragmento de DNA (fita-T) que será transmitido para o hospedeiro (MORGANTE *et al.*, 1999). Segundo os mesmo autores, este fragmento de DNA simples fita é gerado a partir da região de T-DNA do plasmídio Ti.

A região de T-DNA é a única parte do plasmídio transferida para a célula hospedeira e é delimitada por duas seqüências diretamente repetidas, de 24 a 25 pares de base, denominadas borda direita (RB – “*Right Border*”) e borda esquerda (LB – “*Left Border*”), as quais são fundamentais para o reconhecimento desta região. Outras proteínas codificadas pelos genes *vir* estão envolvidas na formação, transporte e possível integração do T-DNA no genoma hospedeiro (MICHIELSE *et al.*, 2005). A tabela 1 mostra um resumo dos principais processos celulares envolvidos na interação *Agrobacterium*-planta.

TABELA 1 – RESUMO DOS PROCESSOS CELULARES ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO *Agrobacterium*-planta (adaptado de SHENG & CITOVSKY, 1996)

Processo celular	Eventos da interação <i>Agrobacterium</i> -planta	Proteínas de <i>Agrobacterium</i> envolvidas no processo ¹
Reconhecimento célula – célula	Adesão do <i>Agrobacterium</i> a receptores de superfície do hospedeiro.	ChvA, ChvB, PscA, Att
Transdução de sinal	Reconhecimento de moléculas sinalizadoras da planta e ativação da via de transporte do T-DNA.	ChvE, VirA, VirG [P21, P10]
Ativação transcricional	Expressão dos genes <i>vir</i> após fosforilação do ativador transcricional.	VirG
Metabolismo de conjugação do T-DNA	Clivagem nas bordas do T-DNA e mobilização da cópia de T-DNA fita simples.	VirD1, VirD2, VirC1, [VirD3]
Transporte celular ²	Formação do complexo-T (proteínas / T-DNA) e do canal transmembrana; transporte do complexo-T para o citoplasma da célula hospedeira.	VirE1, VirE2, VirD2, VirD4, VirB4, VirB7, VirB9, VirB10, VirB11, [VirB1 e outras proteínas VirB]
Importe nuclear	Interação com receptores da membrana nuclear da célula hospedeira e transporte do complexo-T através de poros da membrana nuclear.	VirD2, VirE2
Integração do T-DNA	Integração do T-DNA no genoma da célula hospedeira e síntese da fita complementar.	[VirD2, VirE2]

1 As proteínas cuja participação é proposta, mas ainda não comprovada, estão indicadas entre colchetes.

2 Proteínas VirB estão envolvidas na formação de um canal transmembrana e possivelmente na transferência do complexo-T. Proteínas Vir E e Vir D estão envolvidas na formação do complexo-T e provavelmente participam do transporte do complexo-T através do canal de VirB

Fonte: DUARTE (2005)

Os plasmídios utilizados para sistemas de transformação via *Agrobacterium* são chamados de vetores desarmados por não possuírem os oncogenes do T-DNA, mas conservam os genes de virulência (região *vir*) (DUARTE, 2005). Os vetores podem ser divididos em dois sistemas: sistema cointegrado e sistema binário.

Atualmente o sistema de vetor binário é o mais utilizado na transformação de plantas e fungos (MORGANTE *et al.*, 1999). Neste sistema a agrobactéria deve possuir o plasmídio Ti com a região *vir* intacta e um segundo plasmídio, denominado vetor binário, que contém os genes de interesse e o

marcador clonados entre as seqüências idênticas à das bordas da região-T. A transmissão e o segmento de DNA dar-se-á através da atuação em trans dos produtos de expressão dos genes *vir* sobre as bordas da região-T simulada no vetor binário (MORGANTE *et al.*, 1999).

ATMT possui algumas vantagens em relação aos métodos convencionais de transformação. Além de ser facilmente executada e adaptada a várias espécies de fungos, elimina a necessidade de obtenção de protoplastos, uma vez que células intactas, como conídios e corpos de frutificação, podem ser utilizadas como material inicial (COVERT *et al.* 2001). Este processo também gera uma alta porcentagem de transformantes com uma cópia simples do DNA integrado, o que facilita o isolamento de genes marcadores (MICHELSE *et al.*, 2005, STAATS *et al.*, 2007).

O gene *gfp* que transcreve para a proteína verde fluorescente GFP (*green fluorescent protein*) vem sendo utilizado como repórter e marcador em muitos procariotos e eucariotos (CHALFIE *et al.*, 1994; CUBITT *et al.*, 1995). A proteína GFP não necessita de substrato exógeno e sua expressão não altera o tecido examinado, tornando-a um marcador ideal em estudos de interação fungo-planta. Esta proteína foi usada no basidiomiceto *Ustilago maydis*, a partir de uma versão sintética do gene *gfp*, sGFP (Ser65T) (HEIM *et al.*, 1995; CHIU *et al.*, 1996). O alto nível de expressão neste fungo sugeriu que esta poderia ser útil como repórter em outros fungos. MAOR *et al.* (1998) utilizaram a proteína GFP no estudo da interação fungo-planta em *Cochliobolus heterostrophus* por meio da construção de dois plasmídios vetores de expressão do gene sintético SGFP-TYG usados na transformação do fungo. A fluorescência foi usada para detectar alterações citoplasmáticas e de desenvolvimento do fungo, além de seguir a trajetória deste dentro das folhas de milho.

A habilidade que o *A. tumefaciens* tem de transferir seu DNA para fungos pertencentes a diversas classes, juntamente com a utilização do gene *gfp* como repórter e marcador, mostra o grande potencial que estes sistemas têm para a biotecnologia de fungos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

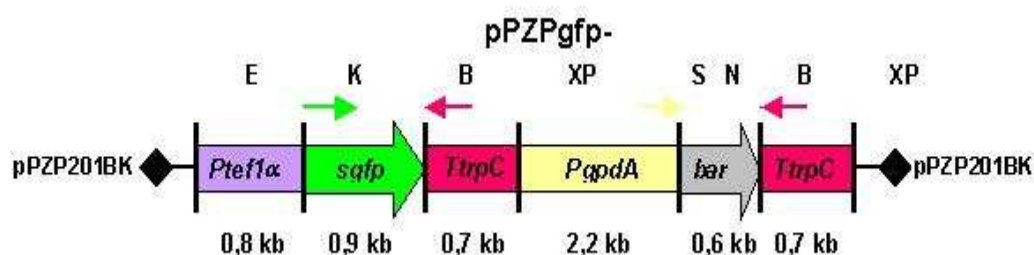
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

A linhagem PC13/96 do fungo *Guignardia citricarpa* foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Genética de Microrganismos da ESALQ-USP, e as linhagens 28/05 e 33/05 pela Universidade Estadual Paulista (UNESP).

A linhagem 33/05 foi escolhida para os experimentos de transformação genética, pois além de possuir resultado positivo em teste de patogenicidade (BALDASSARI, 2005), apresentou, em condições laboratoriais, melhor crescimento e esporulação.

A cepa EHA105 de *A. tumefaciens* e o vetor pPZP201BK o qual contém o gene de resistência à canamicina e os genes de expressão da proteína GFP (*Green Flourescent Protein*) (*sgfp*) e da enzima fosfinotricina acetiltransferase (gene *bar*) utilizados, foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FIGURA 2).

FIGURA 2 – VETOR PPZP201BK (COVERT *et al.*, 2001)



4.2 MEIOS DE CULTURA

4.2.1 Meio completo (MC) de PONTECORVO *et al.* (1953), modificado por AZEVEDO e COSTA (1973).

NaNO ₃	6,0 g
NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	10,0 g
Peptona	2,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Solução de vitaminas	1,0 mL

Completou-se o volume para 1000 mL com água destilada. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 1 mol/L e/ou HCl 1N conforme a necessidade. Para obtenção de MC sólido adicionou-se 1,5% de ágar. O meio foi autoclavado e armazenado à temperatura ambiente.

4.2.2 Meio BDA – Batata-dextrose-ágar

Infusão de 200g de batata	500 mL
Dextrose	20,0 g
Agar	15,0 g

A batata foi fervida em água destilada por 20 minutos, em seguida peneirada de forma a se obter apenas o caldo. A este se adicionou glicose e completou-se o volume para 1000 mL com água destilada. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH e/ou HCl 1N conforme a necessidade. Foram

acrescentados 1,5% de ágar. O meio foi autoclavado e armazenado em temperatura ambiente.

4.2.3 Meio de Luria e Bertani (LB) (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Bacto-Triptona	10,0 g
Cloreto de Sódio	10,0 g
Extrato de Levedura	5,0 g

Completou-se o volume para 1000 mL com água destilada, e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH e/ou HCl 1N conforme a necessidade. Para formulação de meio sólido acrescentou-se 1,5 % de ágar. O meio foi autoclavado e estocado em local escuro à temperatura ambiente.

4.2.4 Meios de co – cultivo (IM)

Solução Estoque de Sais	80 mL
Glicose	0,36 g (0,72 para meio líquido)
0,5 % Glicerol	1,0 mL
Água destilada q. s. p.	200 mL
Autoclavar	
40 mM MÊS (item 4.3.5)	8 mL estoque 1M

O pH foi ajustado para 5,0 com NaOH e/ou HCl 1N conforme a necessidade. Para formulação de meio sólido acrescentou-se 1,5% de ágar. Os meios foram autoclavados e após esfriar foi acrescentado o tampão MES (ácido 2 – [N – morfolino] etanossulfônico).

4.2.5 Meio seletivo

Glicose	10 g
KNO ₃	3 g
Solução de sais M-100 (item 4.3.10)	62,5 mL

Completo-se o volume para 1000 mL com água destilada. Para formulação de meio sólido acrescentou-se 1,5% de ágar. O meio foi autoclavado e estocado em local escuro à temperatura ambiente. Antes de utilizar, acrescentou-se 100 µg/ mL de glifosinato de amônio (item 4.3.4)

4.3 SOLUÇÕES E REAGENTES

4.3.1 Canamicina 100 mg/mL

Canamicina	100 mg
Água milli-Q autoclavada	1000 mL

Dissolveu-se 100mg de canamicina em 1000mL de água Milli-Q autoclavada. A solução foi esterilizada por filtração em filtros de membrana 0,22µm e estocada a -4°C. Ao longo do trabalho a canamicina foi utilizada na concentração de 50µg/mL de meio de cultura.

4.3. 2 Cefotaxima 100 mg/mL

Cefotaxima	1 g
Água milli-Q autoclavada	10 mL

Injetou-se 10 mL de água esterilizada em um frasco contendo 1g de cefotaxima. Misturou-se bem até sua dissolução completa. Foram feitas alíquotas de 1mL as quais foram armazenadas a -20°C.

4.3.3 Acetoseríngona 10mM (AS)

Adicionou-se 0,01962 g de acetoseríngona em 10 mL de DMSO. Foram feitas alíquotas de 1mL as quais foram armazenadas à temperatura de -20°C.

4.3.4 Glifosinato de amônio (40 mg/mL)

Glifosinato de amônio está em uma preparação comercial (FINALE®) em uma concentração de 20mg / mL. Devido a grande quantidade de excipientes, dentre eles detergentes e corantes, um tratamento é realizado para extrair a maioria desses compostos. Para tal, 50mL do volume da preparação comercial foi misturado ao mesmo volume de n-butanol (v/v). Após decantação, a fase superior foi descartada e a fase inferior foi submetida novamente ao mesmo processo de extração adicionando-se à solução restante o mesmo volume de n-butanol (v/v). As extrações de soluções aquosas por n-butanol acarretam em perda de volume de água. Dessa forma, aproximadamente metade do volume da preparação comercial é recuperada nesse processo de extração seqüencial, entretanto há conservação de massa do composto ativo.

4.3.5 Solução MES 1M

MES	19,52 g
Água destilada	80 mL

Dissolveu-se 19,52 g de MES em 80 mL de água destilada. Ajustou-se o pH para 5,3 com KOH 5M. Completou-se o volume para 100mL com água destilada. A solução foi esterilizada por filtração em filtros de membrana 0,45 µm. Foram feitas alíquotas de 10mL as quais foram armazenadas a temperatura de -20°C.

Quando o sal precipitou, o tubo foi colocado em banho - maria à 65°C por alguns minutos, seguido de agitação para completa dissolução.

4.3.6 KOH 5M

KOH	7,0 g
Água destilada	15 mL

Dissolveu-se 7,0g de KOH em 15 mL de água destilada. Após completa dissolução, completou-se o volume para 25 mL com água destilada.

4.3. 7 Elementos Traço

H ₃ BO ₃	30 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	70 mg
ZnCl ₂	200 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	20 mg
FeCl ₃ .6H ₂ O	50 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	200 mg

Completou-se o volume para 500 mL com água destilada.

4.3.8 Solução salina 0,85% (p/v)

NaCl	8,5 g
H ₂ O destilada	1000 mL

A solução foi armazenada em frascos com 9 mL, autoclavada a 1 atm e mantida a 4°C.

4.3.9 Solução de vitaminas

Acido nicotínico	100 mg
Acido p-aminobenzóico	10 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	50 mg

Riboflavina	100 mg
Tiamina	50 mg

Completou-se o volume com 100 mL de água destilada esterilizada. A solução foi aquecida em banho-maria a 98° C por 15 minutos e mantida em frasco escuro a 4° C.

4.3.10 Solução Estoque de Sais para IM

KH_2PO_4	3,625 g
K_2HPO_4	5,125 g
NaCl	0,375 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,250 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,165 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,006 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,250 g

Completou-se o volume para 1000mL com água milli-Q esterilizada. A solução foi estocada a temperatura ambiente sem autoclavar.

4.3.11 Solução de sais M-100 para meio seletivo

KH_2PO_4	16 g
Na_2SO_4	4 g
KCl	8 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 g
Elementos traço	8 mL
H_2O destilada	1000 mL

4.3.12 Gel de agarose 0,8%

Agarose	0,8 g
Tampão TBE1x	100 mL

4.3.13 Solução de brometo de etídio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

De acordo com SAMBROOK FRITSCH, MANIATIS (1989), foram dissolvidos 1,0% (p/v) de brometo de etídio em água destilada, agitando-se por várias horas. A solução foi estocada à temperatura ambiente. Para revelação, diluiu-se 3 μ L em 100 μ L de água destilada.

4.4 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

4.4.1 Seleção do marcador

Os isolados PC13/96, 28/05 e 33/05 de *G. citricarpa* foram testados quanto à resistência ao composto glifosinato de amônio (item 4.3.4). Os fungos foram repicados em duas placas, uma contendo meio seletivo (item 4.2.5) na presença do composto (100 μ g/mL) e outra na ausência do mesmo.

4.4.2 Suspensão de esporos e fragmentos de micélio para agrotransformação

Placas do isolado fúngico 33/05 de *G. citricarpa* contendo cinco colônias de aproximadamente 2 cm de diâmetro com 15 a 20 dias de crescimento em meio completo (item 4.2.1) foi utilizada para a obtenção do micélio e esporos. As colônias foram raspadas com uma lâmina de bisturi e transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL solução salina 0,85% (item 4.3.7) e maceradas com o auxílio de um bastão de vidro a fim de romper os picnídios e liberar os esporos, obtendo-se uma suspensão final com micélio e esporos.

4.4.3 Otimização das condições de crescimento para agrotransformação

O isolado 33/05 de *G. citricarpa* foi repicado em placa contendo meio seletivo sobre o qual foi disposta uma membrana de celofane esterilizada e incubado a 28°C por 15 dias.

Placas do isolado fúngico contendo 5 colônias de aproximadamente 2 cm de diâmetro entre 15 a 20 dias de crescimento em meio completo (item 4.2.1) foram utilizadas para a obtenção da solução de esporos. As colônias foram raspadas com uma lâmina de bisturi, transferidas para tubos de ensaio contendo solução salina 0,85% (item 4.3.8) e maceradas com o auxílio de um bastão de vidro, a fim de romper os picnídios e liberar os esporos. A solução foi então filtrada em seringa de lã de vidro para a obtenção de uma suspensão somente com esporos. A concentração final da suspensão foi de 10^7 esporos/mL.

Dessa suspensão foi retirado 1mL e este colocado em uma placa de Petri contendo meio seletivo e papel celofane. A partir dessa mesma suspensão foram feitas 2 diluições sucessivas (10^6 esporos / mL, 10^5 esporos / mL), e realizado o procedimento anteriormente descrito. As placas foram incubadas por aproximadamente 15 dias a 28°C.

4.4.4 Amplificação do vetor

A amplificação do vetor foi realizada transformando a linhagem DH10B de *E. coli* pela metodologia do cloreto de cálcio seguida de choque térmico (item 4.4.5), para posterior transformação da linhagem EHA105 de *A. tumefaciens* (item 4.4.7).

4.4.5 Transformação de *E.coli* com o vetor pPZP201BK

Células competentes mantidas em estoque a -70°C foram descongeladas em gelo e a elas acrescentou-se 1µL do vetor. Após 10 minutos de incubação em gelo, as células foram submetidas a um choque térmico de 47

°C em banho-maria pelo período de 1 minuto e 45 segundos e incubadas em gelo novamente por 2-3 minutos. Adicionou-se então 1mL de meio LB líquido (item 4.2.3) incubando-se por um período de 30-45 minutos a uma temperatura de 37°C. Após o período determinado, 100µL foram semeados em placa com meio LB sólido (item 4.2.3) acrescido de canamicina (4.3.1) e outros 100µL semeados em placa com somente meio LB sólido. A amostra restante foi centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi ressuscitado em 100µL de solução salina 0,85% e semeado em placa com meio LB sólido acrescido de canamicina.

O mesmo procedimento foi realizado com uma alíquota de células competentes na qual não foi adicionado o vetor. O controle negativo é obtido com células não transformantes em meio LB com canamicina.

As colônias transformantes obtidas foram repicadas em meio LB com canamicina (50µg/mL) e após seu crescimento, foram inoculadas em meio LB líquido mais canamicina para posterior extração do plasmídeo. Destas, algumas foram estocadas, sendo semeadas em meio LB líquido com canamicina. Depois de 12 horas de crescimento a 37°C, as células foram precipitadas por centrifugação, ressuscitadas em 300µL de meio LB e glicerol autoclavados e acrescidos de canamicina (50µg/mL). O estoque dos transformantes foi mantido em tubos a uma temperatura de -20°C.

4.4.6 Extração do vetor

Para a extração do vetor, 100 µL dos transformantes de *E. coli* foram inoculados em 5 mL de meio LB líquido acrescido de canamicina e mantidos sob agitação de 200 rotações por minuto (rpm) por aproximadamente 12 horas a 37°C. O plasmídeo foi extraído do material crescido e purificado utilizando-se o *Kit FlexiPrep (Amersham Bioscience)*. A extração foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (item 4.3.11) e corado com brometo de etídio (item 4.3.12). O DNA plasmidial foi estocado em tubos de microcentrífuga a -20°C.

4.4.7 Transformação de *A. tumefaciens*

4.4.7.1 Obtenção de células quimiocompetentes

Para a obtenção de células quimiocompetentes de *A. tumefaciens*, 100µL do estoque da linhagem EHA105 foram inoculados em 5mL de meio LB líquido e cultivados por 24 horas à temperatura de 28°C a 180 rpm. Após 24 horas, os 5mL de cultivo foram inoculados em 250mL de LB líquido (2 frascos de 500mL cada contendo 125mL de LB líquido) e cultivados à 28°C, 180 rpm até que a OD₆₀₀ final atingisse um valor entre 0,4 e 0,5. O cultivo foi então resfriado em gelo por 15 minutos e posteriormente transferido para tubos GSA (número de 2 previamente autoclavados e gelados) os quais foram centrifugados por 15 minutos à 4000 rpm. O sobrenadante foi ressuscitado em 150mL de água Milli-Q previamente autoclavada e gelada e centrifugado novamente à mesma temperatura e velocidade. Repetiu-se o último procedimento a fim de eliminar todo o meio. O sobrenadante foi então ressuscitado em 1mL de solução contendo 20mM de CaCl₂ e 10% glicerol. Foram feitas alíquotas de 100µL em tubos previamente autoclavados e gelados. Rapidamente os tubos foram imersos em nitrogênio líquido e armazenados à temperatura de -70°C.

4.4.7.2 Transformação de *A. tumefaciens* com vetor pPZP201BK

Células competentes de *A. tumefaciens* foram descongeladas em gelo e a elas acrescentou-se o vetor pPZP201BK (massa de 1 a 5µg em um volume de até 2µL). Após 30 minutos de incubação no gelo, as células foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente submetidas a um choque térmico de 37 °C em banho-maria por um período de 5 minutos. Adicionou-se, então, 1mL de meio LB líquido às células, as quais foram transferidas para um tubo de cultivo e cultivadas por 2 horas à temperatura de 28°C na rotação de 180rpm para iniciar a expressão dos genes de resistência. Após o período

determinado, volumes de 50µL e 100µL foram semeados em placas com meio LB sólido com canamicina na concentração de 50µg/mL. A amostra restante foi centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi ressuscitado em 100µL de solução salina 0,85% e semeado em placa com meio LB sólido acrescido de canamicina. As placas foram incubadas à 28°C.

O mesmo procedimento foi realizado com uma alíquota de células competentes na qual não foi adicionado o vetor. O controle negativo é obtido com células não transformantes em meio LB com canamicina.

As colônias transformantes obtidas após 2 dias de cultivo foram repicadas em meio LB com canamicina e após seu crescimento, foram inoculadas em meio LB líquido mais canamicina. Depois de aproximadamente 12 horas de crescimento à 37°C, as células foram precipitadas por centrifugação, ressuscitadas em 300µL de meio LB e glicerol autoclavados e acrescidos do antibiótico. O estoque dos transformantes foi mantido a uma temperatura de -20°C.

4.4.7.3 Resistência da cepa EHA105 de *A. tumefaciens* ao antibiótico cefotaxima

A fim de verificar a sensibilidade da cepa EHA105 de *A. tumefaciens* ao antibiótico cefotaxima (item 4.3.2), avaliou-se o seu crescimento na presença e na ausência do produto.

4.4.7.4 Transformação de *G. citricarpa* mediada por *A. tumefaciens*

O protocolo de transformação de *G. citricarpa* mediada por *A. tumefaciens* foi adaptado de protocolos elaborados por COVERT *et al.* (2001) e STAATS *et al.* (2007) para a transformação de *Fusarium circinatum* e *Metarhizium anisopliae* respectivamente.

A cepa EHA105 de *A. tumefaciens*, previamente transformada com o vetor pPZP201BK (item 4.4.6.2), foi inoculada em 10mL de LB líquido

acrescido de canamicina. A suspensão foi incubada à temperatura de 28-30°C na rotação de 180rpm por 24 a 48 horas. Após o devido período de incubação a densidade óptica (OD) da cultura foi estimada em espectrofotômetro¹, no comprimento de onda de 660 nm. O volume da cultura necessário para que a OD₆₆₀ final fosse 0,15 foi adicionado a dois frascos, um contendo meio de indução líquido (IM), e outro contendo meio de indução líquido acrescido do composto fenólico acetoseringona (IM+AS). Ambos os frascos foram incubados a 28°C a uma rotação de 180rpm, até que fosse obtida uma OD₆₆₀ entre 0,5 e 0,6.

Enquanto isso, membranas de celofane previamente autoclavadas foram dispostas sobre placas de Petri contendo meio de indução sólido (IMs) e meio de indução sólido acrescido de acetoseringona (IMs+AS). Em um tubo de ensaio foi preparada uma suspensão de micélio mais esporos de *G. citricarpa* 33/05 (item 4.4.3). A suspensão foi incubada por 5 minutos a 40°C.

Posteriormente, em um tubo, foram misturados 100µL da suspensão de esporos mais micélio e 100µL da suspensão de células bacterianas (ODD₆₆₀=0,5-0,6) cultivadas em IM+AS (líquido). A mistura foi espalhada com o auxílio de uma alça de Drygalsky sobre uma membrana de celofane disposta em uma placa de Petri contendo IMs+AS. O procedimento foi realizado para outras cinco repetições, as quais foram denominadas placas A. Em um outro tubo foram misturados 100µL da suspensão de esporos mais micélio e 100µL da suspensão de células bacterianas cultivadas em IM (líquido). A mistura foi espalhada com o auxílio de uma alça de Drygalsky sobre a membrana de celofane disposta em uma placa de Petri contendo somente meio IMs. O procedimento foi repetido para uma outra placa. Estas foram denominadas placas B.

Para os controles negativos foram preparadas quatro placas com meio IMs+AS. Em duas delas foram espalhados 100 µL da suspensão de esporos (placas C) e nas demais apenas 100 µL da suspensão bacteriana (placas D). Em placas contendo IMs, foi repetido o mesmo procedimento (placas E e F, respectivamente).

¹ Espectrofotômetro: UV – Visible Spectrophotometer, Analytical & Measuring Instruments division, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan.

A fim de verificar a viabilidade do *A. tumefaciens* e da *G. citricarpa* ao longo do experimento foram feitas mais quatro placas IMs+AS (placas G) sobre as quais foram espalhadas 100µL da suspensão de esporos e fragmentos de micélio e 100µL da suspensão de células bacterianas cultivadas em IM+AS.

Para o período de co-cultivo, as 20 placas preparadas foram separadas em duas baterias. A primeira - contendo três placas A, duas G e uma de B até F - foi incubada a 25°C por 48 horas. A segunda bateria com as demais placas foi incubada por 72 horas, nas mesmas condições de temperatura.

Após esta etapa, foram adicionados sobre as co-culturas A, B, C, D, E e F 10mL de meio seletivo com menor concentração de ágar (0,7%) acrescido de glifosinato de amônio (100 µg/mL) e do antibiótico cefotaxima (200 µg/mL). Para as placas G, em duas delas foi adicionado 10mL de meio seletivo (ágar 0,7%) somente com glifosinato de amônio e nas outras duas 10mL de meio seletivo somente com o antibiótico cefotaxima. As placas foram devidamente identificadas e incubadas a 28°C até que colônias dos possíveis transformantes fossem visualizadas.

4.4.8 Análise dos transformantes

4.4.8.1 Microscopia

Os transformantes de *G. citricarpa* obtidos foram analisados utilizando-se o microscópio de epifluorescência *Zeiss Axiophot* (GFP: excitação: 450-490 nm, emissão: 500-550 nm) do laboratório Aquatoxi no Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Para o sistema de captura eletrônica de imagens utilizou-se o programa *BandView™ Expo 2.0*.

4.4.8.2 Estabilidade mitótica

A estabilidade mitótica dos transformantes é realizada cultivando-os em meio seletivo acrescido do composto glifosinato de amônio durante três gerações. Posteriormente, estes são cultivados em meio seletivo na ausência

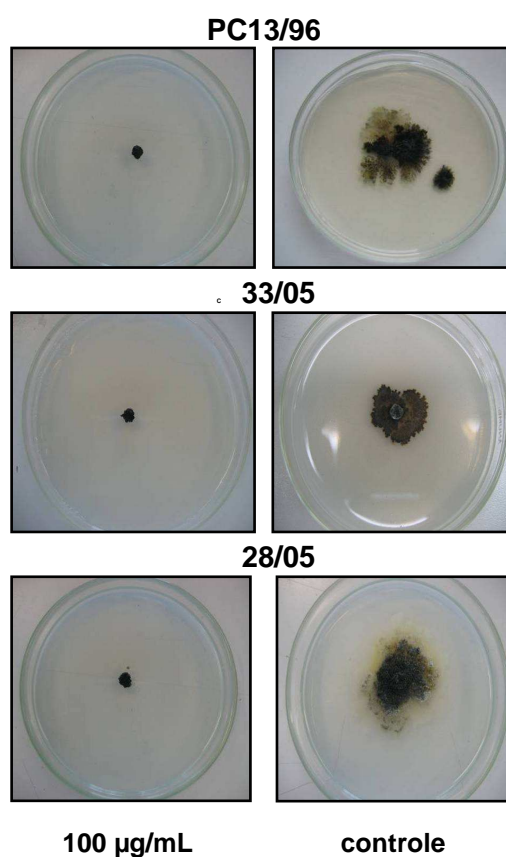
do marcador de seleção por no mínimo cinco gerações, e novamente repicados em meio seletivo na presença do composto.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS FÚNGICOS AO COMPOSTO GLIFOSINATO DE AMÔNIO

O desenvolvimento de uma metodologia de transformação genética envolve vetores contendo genes marcadores, os quais permitem a seleção das células que receberam o DNA exógeno (DUARTE, 2005). Visando testar se a resistência ao glifosinato de amônio poderia ser utilizada como marcador de seleção dos transformantes de *G. citricarpa*, avaliou-se o comportamento das linhagens PC13/96, 28/05 e 33/05 expostas ao produto FINALE®, após 14 dias de incubação a 28°C (FIGURA 3)

FIGURA 3 – CRESCIMENTO MICELIAL DE 3 LINHAGENS DE *G. citricarpa* EXPOSTAS AO GLIFOSINATO DE AMÔNIO APÓS 14 DIAS A 28°C



Fonte: O autor

Verificou-se que o crescimento de todas as linhagens testadas foi completamente inibido quando expostas a uma concentração de 100µg/mL de glifosinato de amônio, assim como verificado por STAATS *et al.* (2007) para o fungo *Mertarhizium anisopliae*. A partir deste resultado, a resistência ao glifosinato de amônio pode ser utilizada como marcador de seleção dos transformantes em *G. citricarpa*.

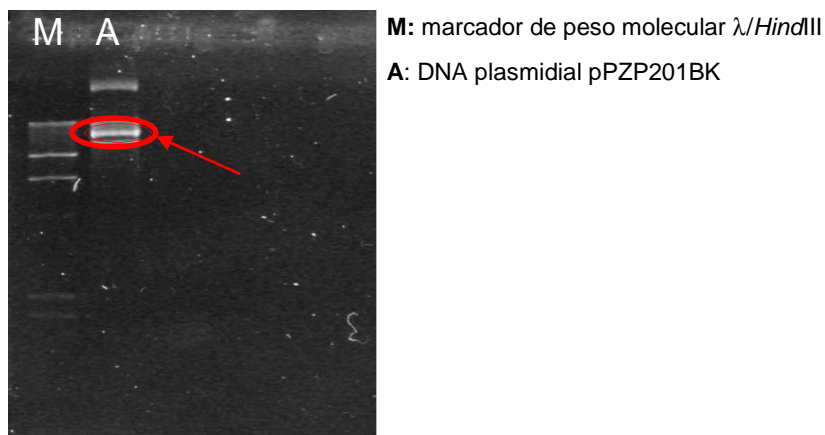
O glifosinato de amônio presente na preparação comercial FINALE® é um análogo de aminoácido que tem a propriedade de inibir a enzima glutamina sintase, responsável pela catálise da reação $\text{glutamato} + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{glutamina}$. Sendo inibida, ocorre o acúmulo de amônio na célula e depleção de glutamina, fatores que levam a célula à morte. O produto do gene *bar*, fosfinotricina acetiltransferase, catalisa a acetilação da molécula glifosinato de amônio, que perde sua capacidade de inibir a enzima glutamina sintase (ARAGÃO *et al.*, 2002). Portanto, meios de cultivo que usam glifosinato de amônio como agente de seleção não podem conter glutamina.

5.2 TRANSFORMAÇÃO EM *E. coli* COM O VETOR pPZP201BK E PURIFICAÇÃO

Verificado que a resistência ao glifosinato de amônio é viável na seleção dos transformantes fúngicos, o vetor pPZP201BK (o qual contém o gene de resistência ao glifosinato de amônio – gene *bar*) pôde ser transformado em *E. coli* para posterior transformação na bactéria *A. tumefaciens*.

A eletroforese em gel de agarose 0,8% é possível confirmou a presença do DNA plasmidial pPZP201BK representado pela banda indicada pela seta vermelha (FIGURA 4).

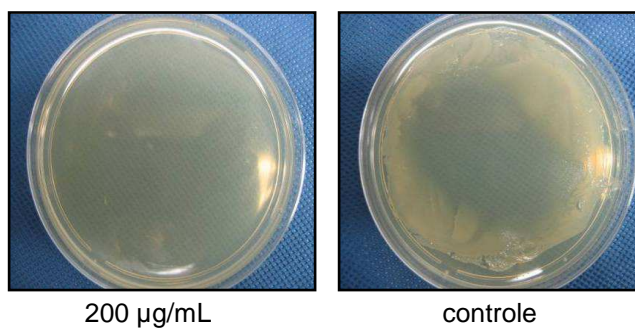
FIGURA 4 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DO DNA PLASMIDIAL pPZP201BK



Fonte: O autor

5.3 RESISTÊNCIA DA CEPA EHA105 DE *A. tumefaciens* AO ANTIBIÓTICO CEFOTAXIMA

Verificou-se que o crescimento da cepa EHA105 de *A. tumefaciens* foi completamente inibido quando exposto a uma concentração de 200 μ g/mL do antibiótico cefotaxima (FIGURA 5). Esta condição foi essencial para a sua utilização na agrotransformação, pois ao longo do experimento é necessário que o crescimento do *A. tumefaciens* seja inibido e, assim, haja somente o desenvolvimento dos transformantes fúngicos.

FIGURA 5 – CEPA EHA105 DE *A. tumefaciens* EXPOSTA AO ANTIBIÓTICO CEFOTAXIMA

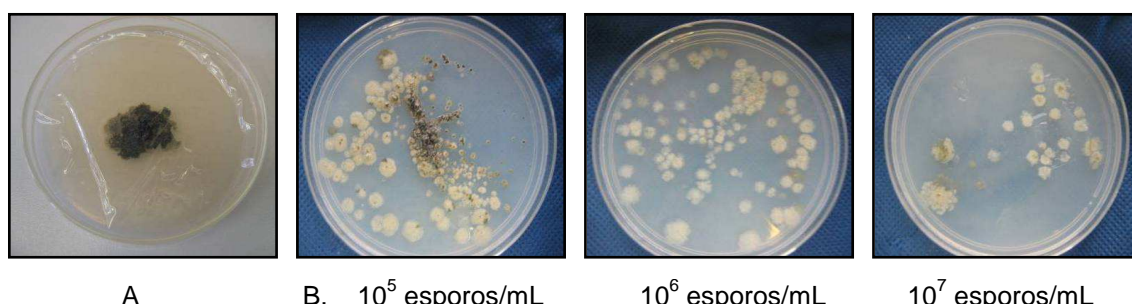
Fonte: O autor

5.4 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE *G. citricarpa* PARA AGROTRANSFORMAÇÃO

O crescimento das colônias de *G. citricarpa* é lento em diferentes meios de cultura (PUNITHALINGAM, 1982; POSSIEDE, 2004). Além disso, enquanto para a maioria dos fungos cultivados em laboratório, a obtenção de uma solução de esporos é tarefa simples e rotineira, para fungos que apresentam tanto esporos sexuais como assexuais dentro de estruturas de frutificação, como em *G. citricarpa*, (VAN DER AA, 1973) uma solução concentrada de esporos viáveis nem sempre é de fácil obtenção. Foi observado por POSSIEDE (2004) que a viabilidade dos esporos para a maioria das linhagens patogênicas analisadas é maior após 15 dias de incubação e diminui à medida que se aproxima de 30 dias de incubação.

A fim de verificar o comportamento da linhagem 33/05 de *G. citricarpa* em meio seletivo, esta foi repicada em placa contendo o meio de interesse sobre o qual foi disposta uma membrana de celofane. Também foi testado o seu crescimento em meio seletivo quando utilizadas suspensões de esporos. Para que os esporos tivessem maior viabilidade, a suspensão foi obtida a partir de colônias com 15 a 20 dias de crescimento. A figura 6A mostra que o fungo cresceu normalmente após 15 dias de incubação a 28°C. O mesmo resultado foi observado quando utilizadas suspensões de esporos em diferentes concentrações: 10^5 esporos/mL, 10^6 esporos/mL, 10^7 esporos / mL (FIGURA 6B).

FIGURA 6 – CRESCIMENTO MICELIAL DA LINHAGEM 33/05 DE *G. citricarpa* SOBRE PAPEL CELOFANE EM MEIO SELETIVO APÓS 15 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C.



Fonte: O autor

5.5 AGROTRANSFORMAÇÃO DO FUNGO *G. citricarpa*

Até o momento, não há relatos na literatura de um protocolo de transformação genética eficiente para o fungo *G. citricarpa*.

Em 2004, POSSIEDE utilizou a técnica de produção de protoplastos com o objetivo de desenvolver um método de transformação para este fungo. A porcentagem de produção e regeneração de protoplastos obtida, no entanto, não foi satisfatória para que o experimento de transformação fosse bem sucedido.

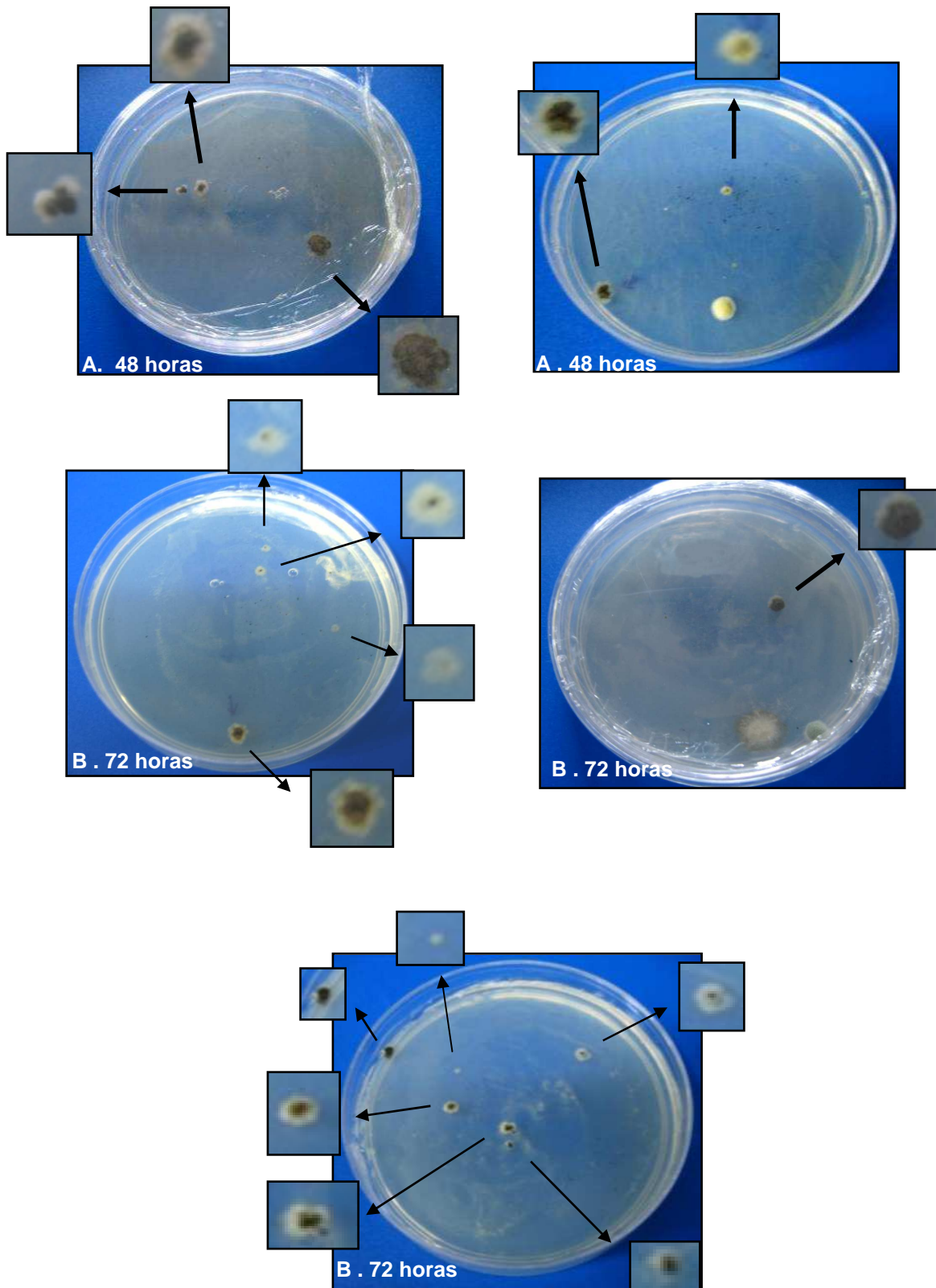
Realizando a transformação de protoplastos por choque térmico, POSSIEDE (2004) obteve 192 colônias da linhagem PC13/96 e 341 da linhagem PCP6 de *G. citricarpa* em meio de cultura com higromicina para seleção dos transformantes. Entretanto, quando estas sofreram dois repiques consecutivos em meio seletivo, não houve crescimento micelial. A mesma autora ainda realizou a transformação de protoplastos por eletroporação, no entanto, os quatro possíveis transformantes obtidos, após novo repique em meio seletivo (com higromicina), também não apresentaram crescimento.

Para este trabalho, os protocolos de transformação para os fungos *Fusarium circinatum* (COVERT *et al.*, 2001) e *Metarhizium anisopliae* (STAATS *et al.*, 2007) foram utilizados com algumas modificações com o objetivo de desenvolver um sistema eficiente de transformação genética para o fungo *G. citricarpa* utilizando-se a bactéria *A. tumefaciens*.

Foram testados vários parâmetros da agrotransformação o que possibilitou a obtenção de 16 colônias de *G. citricarpa* transformantes – 5 colônias obtidas das placas com o período de co-cultivo de 48 horas (FIGURA 7A) e 11 colônias obtidas das placas com o período de co-cultivo de 72 horas (FIGURA 7B).

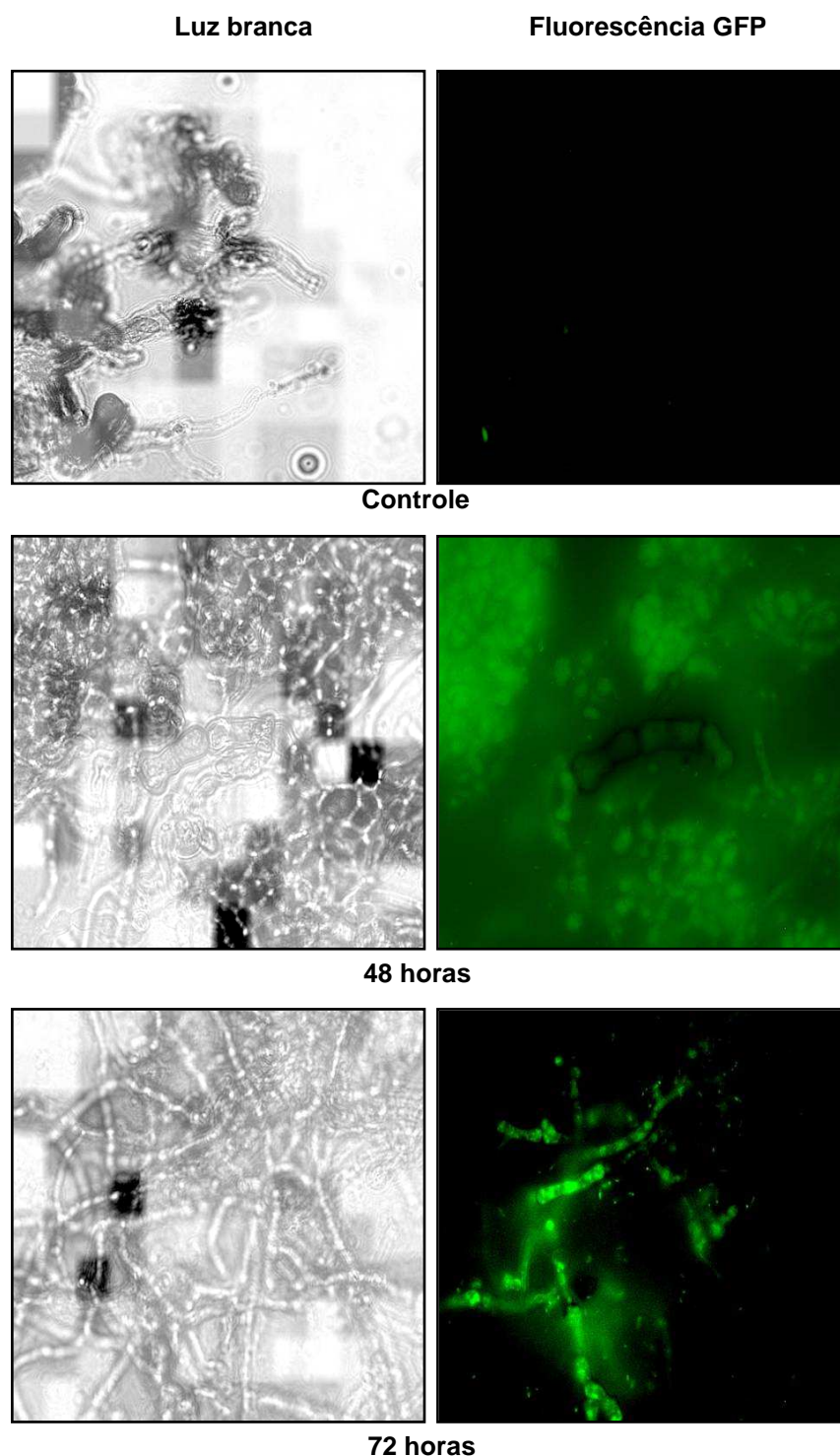
Para a análise microscópica, foram preparadas lâminas de colônias escolhidas ao acaso, as quais foram observadas em microscópio de epifluorescência (Zeiss Axiophot) e cujas imagens foram capturadas utilizando-se o programa *BandView™ Expo 2.0*. (FIGURA 8). Na figura 9 é possível a visualização de um esporo de *G. citricarpa*.

FIGURA 7 – COLÔNIAS DE *Guignardia citricarpa* TRANSFORMANTES OBTIDAS DE PLACAS EM DIFERENTES TEMPOS DE CO-CULTIVO



Fonte: O autor

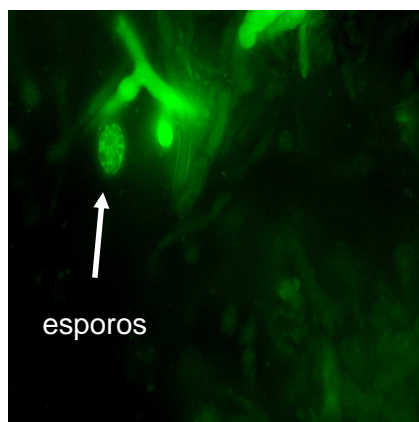
FIGURA 8 – FOTOMICROGRAFIA EM MICROSCÓPIO DE EPIFLUORESCÊNCIA DOS TRANSFORMANTES DE *G. citricarpa*



Fonte: O autor

Nota: Análise microscópica (aumento 100x) dos transformantes de *G. citricarpa* utilizando luz branca (primeira coluna) e fluorescência GFP (segunda coluna). Micélio co-cultivado por 48 horas (48 horas) ou 72 horas (72 horas) na presença do *A. tumefaciens*. O controle negativo (ausência de fluorescência) é mostrado na primeira fileira.

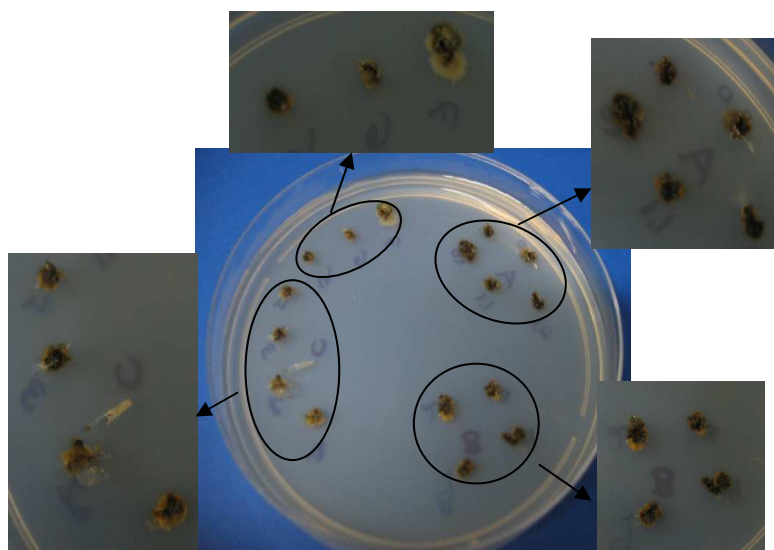
FIGURA 9 – ESPORO DE *G. citricarpa* TRANSFORMANTE EM MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA (AUMENTO 100X)



Fonte: O autor

Posteriormente a visualização e análise microscópica das colônias transformantes, estas foram imediatamente repicadas em meio seletivo acrescido de glifosinato de amônio. A fim de confirmar se as colônias eram de fato transformantes foram realizados mais dois repiques consecutivos em meio seletivo (com glifosinato) por 15 dias a 28°C. Após estes três repiques, as colônias apresentaram crescimento micelial como pode ser observado na figura 10.

FIGURA 10 – CRESCIMENTO MICELIAL DAS COLÔNIAS TRANSFORMANTES APÓS TRÊS REPIQUES CONSECUTIVOS EM MEIO SELETIVO (15 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C)



Fonte: O autor

Apesar das colônias terem se desenvolvido após repiques consecutivos em meio seletivo na presença do glifosinato de amônio, sugerindo-se que estas são de fato colônias transformantes, faz-se necessário ainda análises moleculares por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e *Southern Blot*.

A estabilidade mitótica dos transformantes é realizada, pois dependendo do sítio onde foi inserido o cassete de seleção, pode haver instabilidade e "cura", levando a perda da resistência (STAATS *et al.*, 2007). Para tanto, as colônias transformantes são cultivadas em meio seletivo acrescido do composto glifosinato de amônio durante três gerações. Posteriormente, estas são cultivadas em meio seletivo na ausência do marcador de seleção por no mínimo cinco gerações, e novamente repicadas em meio seletivo na presença do composto. As colônias que permanecerem após estes procedimentos podem ser consideradas mitoticamente estáveis, e é a partir delas que o DNA será extraído para as análises moleculares. No momento está sendo realizada a etapa na qual as colônias transformantes são repicadas em meio não seletivo durante cinco gerações.

Uma das vantagens da ATMT é a variedade de materiais que pode ser utilizada para iniciar a transformação. O uso de protoplastos, esporos, micélio e tecido de corpos de frutificação resultaram em experimentos bem sucedidos (MICHIELSE *et al.*, 2005). Na maioria dos estudos, esporos e esporos germinados são utilizados como material inicial (DE GROOT *et al.*, 1998; COVERT *et al.*, 2001; TAKAHARA *et al.*, 2004, TSUJI *et al.*, 2003). No presente trabalho, foi utilizada uma suspensão contendo esporos e fragmentos de micélio de *G. citricarpa* a qual foi incubada por 5 minutos a 40°C a fim de estimular a germinação destas estruturas. Sugere-se que tal procedimento pode ser considerado essencial para a agrotransformação deste fungo, uma vez que a germinação dos esporos e hifas torna a parede celular mais suscetível à entrada do DNA exógeno.

A eficiência da ATMT em fungos depende de vários fatores, incluindo a densidade e o tipo de célula fúngicas, a linhagem de *A. tumefaciens* utilizada, a razão células bacterianas / células fúngicas, a concentração bacteriana inicial adicionada ao co-cultivo, o tempo e a temperatura de co-cultivo e a

concentração de acetoseringona durante o co-cultivo (CAMBIER *et al.*, 2003; FANG, PEI & BIDOCHKA, 2004; GOTIO *et al.*, 2004; MICHIELSE *et al.*, 2005).

Na maioria dos estudos referentes à agrotransformação de fungos, é exigida a adição do composto fenólico acetoseringona (AS) - o qual induz a região dos genes *vir* - durante o período de co-cultivo com o *A. tumefaciens* (MICHIELSE *et al.*, 2005). O AS, produzido por plantas que sofreram injúria, não é produzido por fungos sendo sua adição, portanto, essencial para que processos de agrotransformação sejam bem sucedidos (DE GROOT *et al.*, 2001)

A adição de AS durante a pré-cultura do *A. tumefaciens* parece não ser absolutamente necessária para a transformação (MICHIELSE *et al.*, 2005), no entanto, a omissão do composto na pré-cultura da bactéria levou a uma menor frequência de transformação em *Beauveria bassiana* (REIS *et al.*, 2006), *Fusarium oxysporum* (MULLINS *et al.*, 2001) e *Magnaporthe grisea* (RHO *et al.*, 2001).

Para este trabalho, a adição de AS nas etapas de co-cultivo e pré-cultura do *A. tumefaciens* foi essencial para que a transformação ocorresse, pois todas as colônias transformantes de *G. citricarpa* foram obtidas somente quando os procedimentos foram realizados na presença de AS.

Outros fatores importantes que determinam a eficiência da ATMT são aqueles relacionados às condições de co-cultivo. Entre estes estão a sua duração, temperatura e pH do meio de cultura.

Temperaturas entre 22°C e 25°C são consideradas ótimas para experimentos de ATMT de plantas e fungos (MICHIELSE *et al.*, 2005). Segundo FULLNER & NESTER (1996) a altas temperaturas (maiores que 28°C), a maquinaria de transferência do *A. tumefaciens* não funciona apropriadamente prejudicando a transformação. Além disso, foi observado por TAKAHARA *et al.* (2004) que o pH durante o co-cultivo que levava às maiores frequências de transformantes em *Colletotrichum trifolii*, variava de 5,0 a 5,3.

Neste trabalho, experimentos foram realizados variando-se a temperatura e o pH do meio de cultura para a etapa de co-cultivo. Colônias

transformantes só foram obtidas em temperatura de 25°C e pH 5,0, corroborando os relatos da literatura.

Trabalhos de transformação genética realizados com os fungos *B. bassiana*, *F. oxysporum*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *M. anisopliae* e *M. grisea* mostraram-se bem sucedidos quando o co-cultivo foi de 48 horas (REIS *et al.*, 2004; MULLINS *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2005; STAATS, 2007; RHO, KANG & LEE, 2001). Porém, para o fungo *G. citricarpa* o co-cultivo com duração de 72 horas foi aproximadamente 50% mais eficiente do que a transformação obtida em 48 horas. Desta forma, pode-se sugerir que, como *G. citricarpa* possui crescimento lento (PUNITHALINGAM, 1982), seja necessário um período maior de co-cultivo para que ocorra interação entre as células bacterianas e fúngicas.

O desenvolvimento de um protocolo de transformação genética para o fungo *G. citricarpa* representa um importante avanço no estudo da interação planta-patógeno. Sugere-se que repetições do mesmo experimento sejam realizadas para que parâmetros como a frequência de transformação, estabilidade mitótica e resistência dos transformantes possam ser feitas, assim como a análise molecular dos mesmos. Posteriormente, avanços para estudos de *knockout* de genes possivelmente envolvidos em patogenicidade, agrotransformação de *G. mangiferae* com o gene *DsRed*, estudos comparativos dos processos de infecção e colonização de *G. citricarpa* e *G. mangiferae* em plantas cítricas, bem como estudo da interação de ambas espécies no interior de tecidos cítricos poderão ser realizados.

6 CONCLUSÕES

- A cepa EHA105 de *A. tumefaciens* pode ser utilizada para transformação genética do fungo *G. citricarpa*;
- A utilização da resistência ao glifosinato de amônio para seleção dos transformantes fúngicos é viável na agrotransformação de *G. citricarpa*;
- Parâmetros como a duração, temperatura e pH do período de co-cultivo são importantes na agrotransformação de *G. citricarpa*;
- O composto acetoseringone é essencial no processo de agrotransformação de *G. citricarpa*.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABECITRUS, 2007. **A História da Laranja**. Disponível em <<http://www.abecitrus.com.br>>.
- AGRIANUAL: **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP 2005, p.785, 2005.
- AGUILAR-VILDOSO, C.I. Pinta preta espalha-se por São Paulo. **Citricultura Atual** 1:8. 1997.
- ANDRADE, G. M. de.; SARTORETTO, L. M. & BRASILEIRO, A. C. M. Biologia Molecular do Processo de Infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, 28:465-476, 2003.
- ARAGÃO, F. J. L.; VIANNA, G. R.; ALBINO, M. M. C.; RECH, L. Transgenic dry bean tolerant to the herbicide glufosinate ammonium. **Crop Science**, v. 42, p. 1298-1302, 2002.
- ARMALEO, D.; YE, G.N.; KLEIN, T.M.; SHARK, K.B.; SANFORD, J.C.; JOHNSTON, S.A. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. **Current Genetics**, v.17, p. 97, 1990.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: MELLO, I.S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998.
- BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; CARROLL, G. C. ; GLIENKE-BLANCO, C.; AZEVEDO, J. L. Non pathogenic isolates of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**. v. 92, n.5, p. 464-477, 2002.
- BALDASSARI, R. B. **Patogenicidade, morfologia de colônias e diversidade de isolados de *Guignardia citricarpa* e *Guignardia mangiferae* obtidos de *Citrus* spp.** Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista Campus de Jaboticabal, 2005.
- BLANCO, C. G. ***Guignardia citricarpa* Kiely: Análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro.** Piracicaba, Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 200p, 1999.
- BUNDOCK, P., DENDULKRAS, A., BEIJERSBERGEN, A., HOOYKAAS, P.J.J. transkingdon. T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Journal**, v. 14, p. 3206-3214, 1995.

- CASE, M. E.; SCHWEIZER, M.; KUSHNER, S. R. GILES, N. H. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing plasmid DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 5259-5263, 1979.
- CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W.W., PRASHER, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science** v.263, p. 802-805, 1994.
- CHIU, W.L., NIWA, Y., ZENG, W., HIRANO, T., KOBAYASHI, H., SHEEN, J. Engineered GFP as a vital reporter in plants. **Current Biology** v.6, p. 325-330, 1996.
- CHRISTO, D. **Variabilidade Genética e Diferenciação Molecular de Isolados Endofíticos e Patogênicos de *Guignardia spp* e *Phyllosticta sp.*** Curitiba. Dissertação de Mestrado – Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná, 78p, 2002.
- COMBIER JP, MELAYAH D, RAFFIER C, GAY G, MARMEISSE R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 220, p. 141–148, 2003.
- COVERT, S. F.; KAPOOR, P.; LEE, M.; BRILEY, A.; NAIRN, C. J. *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of *Fusarium circinatum*. **Mycological Research**. v.105, n. 3, p. 259-264, 2001.
- CUBITT, A.B., HEIM, R., ADAMS, S.R., BOYD, A.E., GROSS, L.A., TSIEN, R.Y. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. **Trends in Biochemical Science**, v.20, p. 448-455, 1995.
- CULTIVAR 2003. **Hortaliças e Frutas**. Disponível em <<http://revistacultivar.locaweb.com.br/>> v.21. Acesso em setembro de 2003.
- CULTIVAR. Caderno Técnico: Doenças Fúngicas em Citros. **Revista Cultivas Hortaliças e Frutas**, nº36, 2006.
- De GROOT, M. J. A.; BUNDOCK, P.; HOOYKAS, P. J. J.; BEIJERSBERGEN, A. G. M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. **Nature Biotechnology**. v.16, p. 839-842, 1998.
- DEAN, R. A. Signal Pathways and appressorium morphogenesis. **Ann. Rev. Phytopathol.** v.35, p.211-234, 1997
- DUARTE, R. T. D. **Transformação genética do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae var. acridum* (CG423) via *Agrobacterium tumefaciens***. Londrina. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Londrina, 112p, 2005.

- EPPO/OEPP – European and Mediterranean Plant Protection Organization / Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes: diagnostic protocols for regulates pests. **Bulletin OEPP/EPPO**, v.33, p. 245-247, 2003
- FANG, W.; PEI, Y.; BIDOCHKA, M. J. Transformation of *Metarhizium anisopliae* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Can J Microbiol**, v. 52, p. 623–626, 2004.
- FEICHTENBERGER, E. Mancha preta ou pinta preta dos citros. **Laranja & Cia, Matão**, v.43, p.10-11, 1996.
- FEICHTENBERGER, E. A rápida expansão da pinta preta dos citros nos pomares paulistas. **Revista coopercitrus**, edição 158, 1999.
- FULLNER, K. L.; NESTER, E. W. Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v.178, p. 1498-1504, 1996.
- FUNDECITRUS, 2007 **Doenças e Pragas**. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/pinta_preta.html>
- FUNDECITRUS, 2007. **Manual de Pinta Preta**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/manuais.html>>
- GELVIN, S. B. Agrobacterium-mediated plant transformation: The biology behind the “Gene-Jockeying” tool. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 67, p. 16-37, 2003.
- GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; VIEIRA, M.L.C.; BARROSO, P.A.V.; AZEVEDO, J.L. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.25, n.2, p. 251-255, 2002.
- GLIENKE, C.; CHRISTO, D, MACCHERONI JR, W, AZEVEDO, J. L High molecular diversity of the fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae* and new primers for the diagnosis of the Citrus Black Spot. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. No prelo, 2007.
- GOES, A. de. Efeito da combinação de fungicidas sistêmicos e protetores no controle da mancha preta dos frutos cítricos causada por *Guignardia citricarpa*. **Summa Phytopathologica**, v. 28 , p. 09-13, 2002.
- GOES, A. de. *et al.* Etiologia, aspectos epidemiológicos e controle de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta do citros. **Relatório técnico** 100 pg, 2005

- GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Introdução à Genética**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.386-391, 2002.
- GROTELUESCHEN, J.; METZEMBERG, R. L. Some property of the nucleus determines the competence of *Neurospora crassa* for transformation. **Genetics**, Bethesda, v.139, p. 1545-1551, 1995.
- HEIM, R., CUBITT, A.B, TSIEN, R.Y. Improved green fluorescence. **Nature** v. 373, p. 663-664, 1995.
- HERBERT, J. A.; GRECH, N. M. A strain of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen, resistant to bemomyl in South Africa. **Plant Disease**, v. 69, 1007, 1985
- HOOYKAAS, P. J. J.; BEIJERSBERGEN, A. G. M. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. **Annual Review of Phytopathology**, v.32, p. 157 – 1579, 1994.
- IPARDES – **Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social**. Disponível em <<http://www.ipardes.gov.br>>
- JOHNSTON, P. R.; FULLERTON, R.A. Cryptosporiopsis citri sp. nov., cause of a citrus leaf spot in the Pacific Islands. **New Zealand Journal of experimental Agriculture**, Wellington, v.16, p.159-63, 1988
- KOTZÉ. J. M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**. v. 65, p. 945-950, 1981.
- KWON-CHUNG, K. J.; GOLDMAN, W. E.; KLEIN, B.; SZANISZLO, P. J. Fate of transformation DNA in pathogenic fungi. **Medical Mycol.**, v.36 (Supl.1), p.38-44, 1998
- LIMA, I. G. P.; DUARTE, R. T. D.; FURLANETO, L.; BARONI, C. H.; FUNGARO, M. H. P.; FURLANETO, M. C. Transformation of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* with *Agrobacterium tumefaciens*. **The Society for Applied Microbiology, Letter in Applied Microbiology**, v. 42, p. 631-636, 2006.
- MAOR, R.; PUYESKY, M.; HORWITZ, B. A.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, p. 491-496, 1998.
- MICHIELSE, C. B.; HOOYKAAS, P. J. J.; HONDEL, C. A. M. J. J. van den.; RAM, A. F. J. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics. **Curr. Genet**, v. 48, p.1-17, 2005.

- MORGANTE, P. G., LÁZARO, E. P. P. & VAN SLUYS, M. A. Uso de *Agrobacterium rhizogenes* como vetor para obtenção de plantas transgênicas. **Simpósio – Perspectivas das Plantas Transgênicas na Agricultura**. UENESP-Jaboticabal, p. 34 - 44, 1999.
- MULLINS, E. D.; CHEN, X.; ROMAINE, P.; RAINA, R.; GEISER, D. M.; KANG, S. *Agrobacterium* – mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. **The American Phytopathological Society**, v. 91, nº2, 2001.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MAC DONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in genetics**, San Diego, v.5, p.141-238, 1953.
- POSSIEDE, Y. M. **Estudos morfofisiológicos e genéticos em *Guignardia spp* e *Phyllosticta sp***. Curitiba, 129p. Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná, 2004.
- PUNITHALINGAM, E. The Conidial Appendage in *Phyllosticta spp*. **Nova Hedwigia**, v.36, p. 151-175, 1982.
- REIS, M. D.; FUNGARO, M. H. P.; DUARTE, R. T. D.; FURLANETO, L.; FURLANETO, M. C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 197-202, 2004.
- RHO, H-S.; KANG, S.; LEE, Y-H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. **Molecules and cells**, v. 12, p. 407-411, 2001.
- ROOBS, C. F. A mancha preta dos frutos cítricos (*Phyllosticta citricarpa*) ameaça a citricultura paulista. **Laranja**, Cordeirópolis, v.11, p.87-95, 1990.
- ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A.M. A mancha preta dos frutos: um dos fatores limitantes à produção citrícola do estado do Rio de Janeiro. **Comunicado técnico. CTAA-EMBRAPA**, v.19, p.1-5, 1995.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2ª edição. CSH Press, 1989.
- SIVANESAN, A. **The bitunicate ascomycetes and their anamorphs**. J. Cramer., Germany. 701p, 1984.
- SPÓSITO, M. B. **Dinâmica Temporal e Espacial da Mancha Preta (*Guignardia citricarpa*) e Quantificação dos danos causados à Cultura de Citros**. Piracicaba, Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 112p, 2003.

- STAATS, C. C.; JUNGES, A.; FITARELLI, M.; FURLANETO, M. C. VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. *Gene inactivation mediated by Agrobacterium tumefaciens in the filamentous fungi Metarhizium anisopliae*. **Apply Microbiology Biotechnology**, v. 76, p. 945-950, 2007.
- STRINGARI, D. **Estudo da variabilidade genética de isolados do fungo *Guignardia* ssp por meio de marcadores RAPD e seqüências ITS**. Curitiba, Tese de mestrado – Universidade Federal do Paraná, p. 58, 2004.
- TAKAHARA, H., TSUJI, G., KUBO, Y., YAMAMOTO, M., TOYODA, K., INAGAKI, Y., ICHINOSE, Y., SHIRAISHI, T. *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation as a tool for random mutagenesis of Colletotrichum trifolii*. **Journal-of-General-Plant-Pathology**, v. 70, p. 93-96, 2004.
- TILBURN, J.; SCAZZOCCHIO, C.; TAYLOR, G. G.; ZABICKY-ZISSIMA, J. H.; LOCKINGTON, R. A.; DAVIS, R. W. *Transformation by integration in Aspergillus nidulans*. **Gene**, v. 26, p. 205-221, 1983.
- TSUJI, G., FUJII, S., FUJIHARA, N., HIROSE, C., TSUGE, S., SHIRAISHI, T., KUBO, Y. *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation for random insertional mutagenesis in Colletotrichum lagenarium*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 69, p. 230-239, 2003.
- VAN der AA, H. A. *Studies in Phyllosticta I*. **Studies in Mycology**, v. 5, p. 1-110, 1973
- WARD, M.; KODAMA, K. H.; WILSON, L. J. *The oliC gene of Aspergillus niger isolation, sequence and use as a selectable marker for transformation*. **Current Genetics**, v. 28, p. 37-42, 1988.