

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
ALAN ANTONIO TORQUES

Avaliação das linhagens transformadas do fungo *Phyllosticta citricarpa* com o gene repórter *gfp*, para estudo da interação fungo-planta

CURITIBA
2011

ALAN ANTONIO TORQUES

Avaliação das linhagens transformadas do fungo *Phyllosticta citricarpa* com o gene repórter *gfp*, para estudo da interação fungo-planta

**Trabalho de monografia
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial à
obtenção do Grau Bacharel em
Ciências Biológicas.**

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

CURITIBA

2011

DEDICATÓRIA

A todas as pessoas que acreditaram, ajudaram e incentivaram a conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros e especiais agradecimentos a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho:

À Deus;

À Dra. Chirlei Glienke pela orientação e oportunidade da realização deste trabalho;

Aos funcionários, estagiários, mestrandos e doutorandas do laboratório especialmente ao Maikon, Camila e Juliana Marta;

À Dra. Josiane Aparecida Gomes Figueiredo e ao biólogo e amigo Eduardo Henrique Goulin pelo auxílio e bons momentos;

Às Professoras Dr^a. Lygia Vitória Galli-Terasawa e Dr^a. Vanessa Kava Cordeiro pelo apoio e oportunidade de estágio no laboratório;

À minha família e amigos pelo apoio e confiança;

Ao Departamento de Genética e a Universidade Federal do Paraná por permitir o uso de suas instalações;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS.....	10
3 REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 MANCHA PRETA DOS CITROS.....	11
3.2 TRANSFORMAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS	13
3.3 MARCADORES FLUORESCENTES	18
4 METODOLOGIA	19
4.1- MATERIAL BIOLÓGICO	19
4.2 - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES.....	19
4.3 PRESERVAÇÃO DOS TRANSFORMADOS.....	20
4.4 ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES COM MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA.....	20
4.5 AVALIAÇÃO DA TAXA DE CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIO ÁGAR ÁGUA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE GLIFOSINATO DE AMÔNIO.....	21
4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS EM MEIO ÁGAR ÁGUA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE GLIFOSINATO DE AMÔNIO.....	21
5 RESULTADOS.....	22
5.1 MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA.....	22
5.2 AVALIAÇÃO DA TAXA DE CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIO ÁGAR ÁGUA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE GLIFOSINATO DE AMÔNIO.....	23
5.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS EM MEIO ÁGAR ÁGUA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE GLIFOSINATO DE AMÔNIO.....	27
6 DISCUSSÃO	29
7 CONCLUSÕES	31
8 REFERÊNCIAS.....	32
9 ANEXOS	39

LISTA DE FIGURAS

QUADRO 1 - CICLO DA MANCHA PRETA (MCP).....	12
FIGURA 2 - PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS NA SUPERFÍCIE FOLIAR APÓS 15 DE CRESCIMENTO A 25 ⁰ C (A) E DETALHE DA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS EM AUMENTO DE 20 VEZES (B).....	22
FIGURA 3 – FOTOMICROGRAFIA ÓTICA EM CAMPO CLARO DO TRANSFORMANTE 01 DA LINHAGEM LGMF6 DE <i>Phyllosticta citricarpa</i>	22
FIGURA 4 - FOTOMICROGRAFIA ÓTICA DE EPIFLUORESCÊNCIA DO TRANSFORMANTE 01 DA LINHAGEM LGMF6 DE <i>Phyllosticta citricarpa</i>	23
FIGURA 5 – FOTOMICROGRAFIA DA LINHAGEM SELVAGEM LGMF6 DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> - A) MICROSCOPIA ÓTICA EM CAMPO CLARO, B) MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA.....	23
FIGURA 6 – CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIO AA APÓS 10 DIAS DE INCUBACAO A 25 ⁰ C. (A) LINHAGEM TRANSFORMADA 16 E (B) LINHAGEM TRANSFORMADA 03.....	26
FIGURA 7 - DISCO FOLIAR APRESENTANDO PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DA LINHAGEM SELVAGEM LGMF06 DO FUNGO <i>P. citricarpa</i> EM MEIO AA. A: 20X AUMENTO. B: 7X AUMENTO.....	28
FIGURA 8 – AVALIACAO DE PRODUCAO DE PICINIDIOS NA SUPERFICIE FOLIAR APÓS 30 DIAS DE INCUBACAO A 25 ⁰ C. (A) LINHAGEM TRANSFORMADA 09 SEM PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS. AUMENTO: 7.1X. (B) LINHAGEM TRANSFORMADA 01 APRESENTANDO PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS EM MEIO AA COM GLIFOSINATO DE AMÔNIO. AUMENTO: 20X.....	29

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – MÉDIAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (MM) DOS 13 TRANSFORMADOS E DA LINHAGEM SELVAGEM DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> APÓS 3 E 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ^o C	25
TABELA 2 – MÉDIAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (MM POR DIA) DOS 13 TRANSFORMADOS E DA LINHAGEM SELVAGEM DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ^o C	Erro! Indicador não definido.
TABELA 3 - CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM DMS DAS TAXAS DE CRESCIMENTO PELO TESTE T, NO QUAL LETRAS IGUAIS NÃO POSSUEM DIFERENÇA.....	26
TABELA 4 – VALORES MÉDIOS DA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS NA SUPERFICIE FOLIAR APÓS 30 DE INCUBAÇÃO A 25 ^o C DE 12 LINHAGENS TRANSFORMADAS E DA LINHAGEM SELVAGEM DE <i>Phyllosticta citricarpa</i>	27
TABELA 5 - CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM DMS DAS PRODUÇÕES DE PICNÍDIOS, NO QUAL LETRAS IGUAIS NÃO POSSUEM DIFERENÇA.....	28
TABELA 6- TESTE DE NORMALIDADE PRODUÇÃO DE PICNÍDEOS CONTROLE X TRANSFORMANTES	39
TABELA 7 - TESTE DE VARIÂNCIA PRODUÇÃO DE PICNÍDEOS CONTROLE X TRANSFORMANTES.....	39
TABELA 8- TESTE DE NORMALIDADE PRODUÇÃO DE PICNÍDEOS AA X AA+GLIFOSINATO	39
TABELA 9 - TESTE DE VARIÂNCIA PRODUÇÃO DE PICNÍDEOS AA X AA+GLIFOSINATO	40
TABELA 10- TESTE DE NORMALIDADE CRESCIMENTO MICELIAL CONTROLE X TRANSFORMANTES.....	40
TABELA 11 - TESTE DE VARIÂNCIA CRESCIMENTO MICELIAL CONTROLE X TRANSFORMANTES.....	40
TABELA 12 - TESTE DE NORMALIDADE CRESCIMENTO MICELIAL COMPARAÇÃO DE MEIOS.....	40
TABELA 13 - TESTE DE VARIÂNCIA CRESCIMENTO MICELIAL COMPARAÇÃO DE MEIOS.....	41

RESUMO

O Brasil é destaque na produção de frutas cítricas, especialmente laranjas, sendo o maior produtor e exportador de suco da fruta. A União Européia é o principal mercado importador do produto brasileiro. No entanto, prejuízos nas exportações da fruta ocorrem por doenças que são quarentenárias A1 nos mercados internacionais de destino, uma dessas é a Mancha Preta dos Citros, causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*. A agrotransformação do fungo *P. citricarpa* foi realizada com sucesso anteriormente pelo grupo. Esses tais transformantes expressam a proteína fluorescente verde GFP (Green Fluorescent Protein) e resistência ao glifosinato de amônio. As linhagens transformadas serão utilizadas em experimentos de indução de sintomas em frutos cítricos, com vista a estudos de epidemiologia e transcriptoma. Para tanto, no presente trabalho, fez-se necessária a avaliação de linhagens transformadas a fim de selecionar aquelas que apresentem expressão do gene *gfp in vivo*, observadas pela utilização de microscópio de epi-fluorescência, melhor taxa de crescimento micelial e maior produção de estruturas de reprodução assexuada em discos foliares de citros. A seleção foi realizada com sucesso, sendo que as linhagens escolhidas apresentam emissão de fluorescência verde causada pela expressão do gene *gfp*, produção de estruturas reprodutivas semelhante e crescimento micelial superior à linhagem selvagem.

Palavras chave: Mancha Preta dos Citros, *Phyllosticta citricarpa*, agrotransformação, Green Fluorescent Protein (*gfp*).

1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se no cenário mundial como o maior exportador de suco de laranja, controlando 85% do mercado internacional, e principal produtor desta fruta, seguido por Estados Unidos e México. A laranja é o sexto produto agrícola brasileiro mais exportado, conferindo a citricultura destacável importância sócio-econômica (FAO, 2007). Aproximadamente 93% dos valores das exportações, vêm do suco de laranja concentrado e congelado, cujo principal cliente é a União Européia, sendo a Bélgica a principal porta de entrada do suco brasileiro (NEVES *et al.*, 2004).

O estado de São Paulo é o principal produtor brasileiro. Devido à capacidade de adaptação a diferentes climas e solos, a produção ocorre também em outras regiões, destacando-se Minas Gerais, Sergipe, Bahia, Rio Grande do Sul e Paraná (CULTIVAR, 2009). O Paraná ocupa a quinta posição entre os estados brasileiros com atividade citrícola, sendo considerado um pólo agroindustrial brasileiro (IBGE, 2007). A produção concentra-se nas regiões Norte e Noroeste e também na região conhecida como Vale do Ribeira, apresentando características bastante distintas.

Segundo dados do IBGE, no ano de 2007, o Paraná produziu 502.979 toneladas de laranjas em 19.166 hectares cultivados, representando pouco mais de um terço da área destinada ao cultivo de laranja do sul do país. A produção de laranjas é destinada principalmente a produção de suco concentrado para a exportação e ocorre em grandes propriedades, altamente organizadas e com suporte tecnológico de ponta, localizadas nas regiões Norte e Noroeste, principalmente nos municípios de Paranaíba, Mandaguáçu e Alto Paraná, entre outros (IBGE, 2007).

A região do Vale do Ribeira é a principal produtora de tangerina, com produção de 264.277 ton em 10.281 hectares. Nos municípios de Cerro Azul, Doutor Ulysses, Rio Branco do Sul e Itaperuçu localizam-se um grande número de pomares. O cultivo ocorre em pequenas propriedades, como parte da atividade rural, sendo executada por famílias de agricultores, sem aplicação de recursos tecnológicos. A produção destina-se ao mercado nacional da fruta *in natura* (IBGE, 2007), a produção de óleo essencial, de pellets ou farelo de polpa cítrica entre outros (NEVES, 2000).

A citricultura está sujeita a ações de diversos patógenos que comprometem a qualidade dos frutos e também a produtividade de pomares. Dentre estes patógenos, encontra-se o fungo *Phyllosticta citricarpa* Kiely (forma anamórfica *Phyllosticta citricarpa* VAN DER AA), responsável pela doença conhecida como Mancha Preta dos Citros (MPC). Frutos acometidos por esta doença apresentam como principal sintoma lesões na casca, que depreciam seu valor comercial, apesar de não comprometer a qualidade interna do fruto. Além disto, pomares afetados necessitam de intenso tratamento químico com fungicidas (principalmente a base de cobre) e sofrem com a queda prematura dos frutos comprometendo a produção e causando prejuízos bastante expressivos aos produtores.

Trata-se de uma doença considerada Quarentenária A1 em países da União Européia, o que limita a aceitação destes frutos em função de barreiras fitossanitárias rígidas, que proíbem a entrada de frutos com sintomas de MPC (BONANTS *et al.*, 2003, BALDASSARI *et al.*, 2007; ROSSMAN, 2009).

Figueiredo *et al.* (2010) realizaram com sucesso a agrotransformação do fungo *P. citricarpa*. Tais linhagens transformadas foram utilizadas em experimentos de indução de sintomas em frutos cítricos, com vista a estudos de epidemiologia e transcriptômica. Para tanto, no presente trabalho, fez-se necessária a avaliação de 13 linhagens transformadas a fim de selecionar transformantes que apresentem expressão do gene *gfp in vivo* (observada através da utilização de microscópio de epi-fluorescência), melhor taxa de crescimento micelial e maior produção de estruturas de reprodução assexuada em discos foliares de citros.

2 OBJETIVOS

- Avaliar a produção de picnídios.
- Avaliar a emissão de fluorescência expressa pela proteína GFP.
- Avaliar efeitos do glifosinato de amônio sobre o crescimento do fungo.
- Comparar as taxas de crescimento micelial entre os transformados e o selvagem.

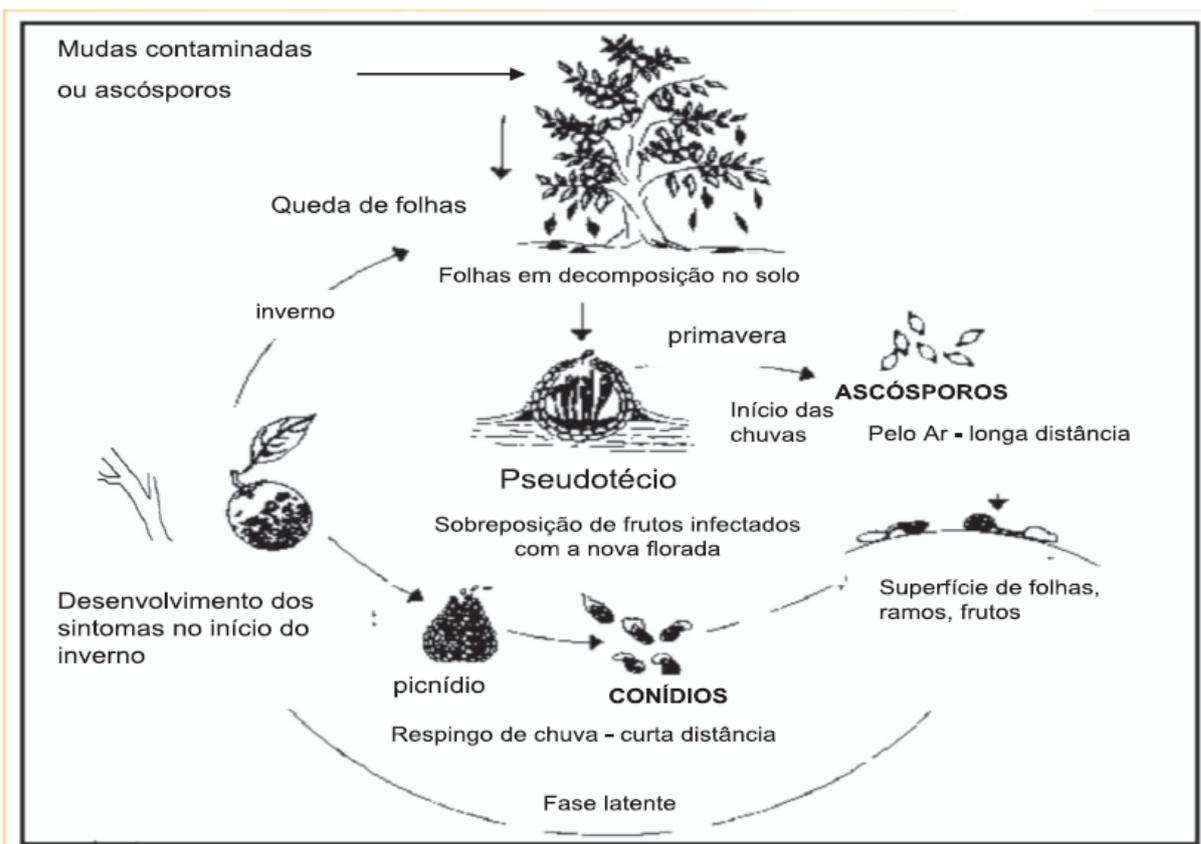
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MANCHA PRETA DOS CITROS

Desde a década de 60, a citricultura tornou-se importante atividade agroindustrial brasileira. A partir da década de 80, o Brasil torna-se o maior produtor de citros, superando a produção americana. Porém, apesar da importância que representa na economia brasileira, a citricultura vem passando por diversos desafios, entre estes, está o controle de diversas pragas e doenças. Um exemplo destas é a MPC; que já foi relatada pela primeira vez no Rio de Janeiro, em 1980 e atualmente já foi constatado em diversas áreas produtoras do país (BALDASSARI; FERRARI; REIS, 2006, p. 337). Como não existem relatos da existência desta doença em outros países, como os da União Européia, os frutos brasileiros passam por rígidos controles fitossanitários que restringem a exportação para estes países, onde a doença é classificada como praga quarentenária A1. A manifestação dos sintomas pode ser tardia, da mesma forma, pode se manifestar durante o transporte sendo rejeitadas no destino final; gerando prejuízos e despesas extras com a logística destes frutos.

Por tratar-se de uma doença de fácil distribuição geográfica, medidas preventivas devem ser adotadas para evitar a disseminação do patógeno, bem como, a pesquisa do patógeno na forma latente deve ser investigada. Assim, será possível decretar áreas livres ou então estabelecer medidas de prevenção da disseminação da doença no estado.

O ciclo se inicia com a formação de ascósporos (esporos sexuais) em folhas em decomposição no solo, que são carregados pelo vento e infectam flores, frutos e ramos de outras plantas. Nos frutos são formadas lesões onde são formados pcinidiósporos (esporos assexuais) que levados a curta distância pela água infectam novamente flores, frutos e ramos dando continuidade ao ciclo ilustrado no quadro 1.



QUADRO 1 - CICLO DA MANCHA PRETA (MCP)
 FONTE: SEAB PR (2009)

Os frutos são suscetíveis à infecção por 20 - 24 semanas após a queda da pétala, depois deste período o fruto parece tornar-se resistente à infecção (BALDASSARI; REIS, GÓES, 2006, p.337). Entretanto, o surgimento dos sintomas da mancha preta pode ser tardio, após a coleta dos frutos, no estágio de maturação e durante o armazenamento ou transporte dos mesmos. Este fator é preocupante, pois o patógeno pode estar presente em pomar assintomático, comprometendo a eficácia de um possível tratamento e prevenção da disseminação da doença (FILHO, 2002).

A disseminação dos conídios ou picnidiósporos (esporos assexuais produzidos a partir de transformações do sistema vegetativo e do micélio) e ascóporos (esporos sexuais) do fungo marcam o início do ciclo da doença. Os conídios são responsáveis pelas infecções a curta distância, ocorrendo principalmente em ramos secos e frutos, e por autoinfecção, aumentando a infecção em uma mesma planta. Água, orvalho ou irrigação contribuem para este tipo de infecção, pois dissolvem um agregado de conídios que emerge através da abertura do picnídio (ostíolo). Os conídios caem sobre os frutos susceptíveis, que se formam

após as floradas. Os esporos são liberados em grande quantidade na primeira hora após o molhamento podendo continuar pelas 12 horas seguintes ou mais (ROBBS, 1990, p. 91; FUNDECITRUS, 2009).

O fungo *Phyllosticta citricarpa* agente etiológico da MPC pertencente à ordem *Dothideales*, família *Dothideaceae*. Trata-se de um fungo ascomiceto freqüente em hospedeiros tropicais. O gênero foi descrito em 1892 por Viala e Ravaz e caracterizando-se por apresentar uma fase anamórfica (assexuada) descrita como *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) VAN DER AA.

Segundo TIMOSSI et al (2003) existe influência da temperatura e luminosidade na produção de pseudotécios de *P. citricarpa* em laboratório. Os autores constataram que sob luminosidade contínua e altas temperaturas esta produção é maior, o que provavelmente explica a boa adaptação da espécie em regiões de clima tropical como no estado de São Paulo.

3.2 TRANSFORMAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Pizzirani-Kleiner (1998) definiu transformação 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 primeiro trabalho envolvendo transformação de fungo foi realizado em 1973, com *Neurospora crassa* empregando-se o gene para inositol (MISHRA e TATUM, 1973). Novos sistemas de transformação para fungos filamentosos começaram a ser desenvolvidos, como o emprego de células desprovidas de parede celular (protoplastos), realizado pela primeira vez em 1979 em *N. crassa* (CASE et al., 1979), e posteriormente em *Aspergillus nidulans* (TILBURN et al., 1983). Atualmente muitas são as metodologias de transformação descritas para uma grande diversidade de fungos filamentosos.

Para sistemas de transformação eficientes são necessários parâmetros de extrema importância tais como a competência das células receptoras do DNA exógeno e mecanismos que possibilitam a introdução de vetores contendo marcas de seleção.

Os mecanismos empregados na transformação de fungos filamentosos abrangem aqueles que utilizam células desprovidas de parede celular pelo emprego de polietileno glicol – PEG (CASE *et al.*, 1979) ou eletroporação (WARD *et al.*, 1988). Outros promovem o bombardeamento de células com microprojéteis contendo DNA transformante, processo conhecido como biobalística (ARMALEO *et al.*, 1990) envolvendo a utilização de células intactas. Porém, nos últimos anos foi desenvolvido um processo de transferência gênica mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (agrotransformação) (BUNDOCK *et al.*, 1995), principalmente para aqueles casos em que a utilização de sistemas como a obtenção de protoplastos e/ou a biobalística não são viáveis.

Os vetores são importantes ferramentas no sistema de transformação genética, são moléculas de DNA capazes de replicação autônoma dentro de uma célula hospedeira, na qual outras seqüências de dna podem ser inseridas e amplificadas. Muitos são provenientes de plasmídeos, bacteriófagos ou vírus. São usados para transportar genes estranhos às células receptoras. Estes possuem um local de replicação funcional e contêm marcadores genéticos para facilitar seu reconhecimento seletivo.

A escolha de um vetor baseia-se na natureza do gene ou segmento de DNA a ser inserido na célula hospedeira, apresenta fácil isolamento, possuir marcas de resistência a drogas e sítios de clonagem, para amplificação e manutenção da inserção de DNA exógeno (PIZZIRANI-KLEINER, 1998). Os vetores empregados na transformação de fungos filamentosos constituem-se, em geral, de DNA plasmidial de origem bacteriana (*Escherichia coli*) nos quais são incorporadas marcas seletivas apropriadas para fungos.

O método de agrotransformação baseado na utilização de *A. tumefaciens* foi inicialmente desenvolvido em plantas. *A. tumefaciens* é uma bactéria de solo gram negativa responsável pelo aparecimento de tumores em células vegetais (KADO, 1991). Tal bactéria tem a habilidade natural de transferir um segmento de DNA (T-DNA) de seu plasmídeo Ti, para o interior de células vegetais ou fúngicas. O T-DNA integra-se ao genoma hospedeiro de forma aleatória (BUNDOCK *et al.*, 1995). As extremidades do T-DNA são flanqueadas por regiões repetidas de 24 pb e a transferência é dependente da expressão de genes de virulência (vir) do plasmídeo de *A. tumefaciens*, os quais são induzidos por compostos produzidos pela planta, como o acetosyringone (AS) (CHARLES *et al.*, 1992). A partir de estudos da doença

conhecida desde a antiguidade como galha-da-coroa, foi possível o estabelecimento da metodologia de agrotransformação. A doença caracterizada pelo crescimento de galhas na raiz ou na coroa da planta é provocada por *A. tumefaciens*. Essas galhas, quando isoladas, são capazes de crescer indefinidamente em meio de cultura *in vitro*, sem reguladores de crescimento. Estudos realizados demonstraram que a formação de galhas induzidas por *A. tumefaciens* estava diretamente associada à presença de um plasmídio de alto peso molecular (120 a 250 kb), denominado plasmídio Ti (do inglês “*tumor inducing*”). Este plasmídio está presente somente em linhagens patogênicas de *Agrobacterium* spp, em um baixo número de cópias.

O processo envolvido na transferência do plasmídio Ti para a planta envolve várias etapas, como processos de sinalização entre a planta-bactéria. Moléculas liberadas pela planta irão ativar genes localizados em uma região do plasmídio Ti, chamada de região de virulência (região vir), composto de seis a oito *operons*, contendo, aproximadamente, 25 genes no total. Diversas proteínas codificadas pelos genes da região vir promoverão a transferência de outra região do plasmídio Ti da bactéria para o núcleo da célula vegetal. Essa região, denominada T-DNA (do inglês *transferred DNA*), é delimitada por duas seqüências repetidas de 25 pb, conhecidas como extremidades direita e esquerda (LB e RB). Uma vez no núcleo da célula, o T-DNA é integrado ao genoma vegetal e aí expresso de forma estável. O T-DNA de *A. tumefaciens* contém uma série de genes conhecidos como oncogenes que codificam enzimas envolvidas na via de biossíntese de hormônios vegetais (citocininas e auxinas), causando um desequilíbrio hormonal nas células transformadas. Em *A. tumefaciens*, essa proliferação desordenada das células transformadas leva à formação da galha.

A demonstração da transferência de informação genética da bactéria para uma planta estimulou pesquisas visando utilização deste sistema para a transferência de genes nos mais diversos organismos. Porém, o sucesso na construção de vetores derivados do plasmídio Ti para introduzir genes exógenos em outros organismos foi possível devido a uma particularidade do mecanismo de transferência do T-DNA: nenhum gene presente no T-DNA, exceto os 25 pb de suas extremidades, é necessário ao processo de transferência e integração do T-DNA. Ou seja, é exequível eliminar partes ou todo o T-DNA, incluindo os oncogenes, sem afetar o processo de transferência. A região *vir* é essencial para a transferência do T-DNA, pois contém genes cujos produtos vão promover a excisão e o transporte do

T-DNA. Concluiu-se, então, que o desenvolvimento de vetores baseados no sistema *Agrobacterium* requer a presença das extremidades direita e esquerda do T-DNA conservadas, mantendo intacta a região *vir*, mas que os oncogenes sejam removidos. Dessa maneira, qualquer outra nova seqüência de DNA, inserida entre as extremidades do T-DNA, pode ser transferida e integrada ao genoma do organismo.

Os primeiros estudos de transformação genética de plantas envolveram a inoculação de tecidos de fumo (*Nicotiana tabacum*) com linhagens engenhradas de *Agrobacterium* (HERRERRA-ESTRELLA *et al.*, 1983; ZABRYSKI *et al.*, 1983). A partir de então, o sistema de transformação via *Agrobacterium* vem sendo utilizado para transformar um grande número de plantas. A alta eficiência de transformação, o baixo custo operacional, a simplicidade dos protocolos de transformação e de seleção são as principais razões para a universalidade do uso do sistema *Agrobacterium*.

Para transformação de fungos a agrotransformação apresenta algumas vantagens, entre elas:

- A alta eficiência de transformação; a simplicidade na metodologia (não é necessária a utilização de equipamentos de alto custo como o eletroporador ou o acelerador de microprojéteis);
- A possibilidade de inserção de qualquer segmento de DNA entre as bordas esquerda e direita (LB e RB) do T-DNA ser integrado no genoma hospedeiro;
- A ocorrência de integração do T-DNA em cópias simples em sítios aleatórios no genoma.

O sistema de transformação com *A. tumefaciens* em representantes fúngicos alcançou uma eficiência de transformação 600 vezes superior àquela obtida com outros métodos. Covert *et al.* (2001) destacaram na agrotransformação de *Fusarium circinatum*, a simplicidade e economia no tempo consumido, em comparação com os métodos anteriores. *A. tumefaciens* foi usado para transformar *Aspergillus fumigatus* por integração aleatória ou sítio-dirigida do DNA transformante (T-DNA), verificando-se que a freqüência de transformação foi maior que 100 transformantes/107 esporos (SUGUI *et al.*, 2005). Os fungos *Coniothyrium minitans* (LI-MOXIAO *et al.*, 2005), *Colletotrichum trifolii* (TAKAHARA *et al.*, 2004), *C. lagenarium* (TSUJI *et al.*, 2003),

Botrytis cinerea (ROLLAND *et al.*, 2003) e *Phyllosticta citricarpa* (FIGUEIREDO *et al.*, 2010) foram também eficientemente transformados com *A. tumefaciens*.

3.3 MARCADORES FLUORESCENTES

O gene *gfp* codifica a proteína fluorescente verde (Green Fluorescent Protein), foi clonado da água viva *Aquoria Victoria* (CHALFIE *et al.*, 1994) e tem sido um importante gene repórter utilizado principalmente na visualização da expressão gênica e localização subcelular de proteínas em uma variedade de organismos (GAGE *et al.*, 1996; TOMBOLINI *et al.*, 1997; XI *et al.*, 1999; BLOEMBERG *et al.*, 2000; MILLER *et al.*, 2000; STUURMAN *et al.*, 2000).

Como vantagem da utilização do *gfp* destaca-se a preservação do tecido durante o tempo de análises. Variantes modificadas em termos de propriedades espectrais (incluindo elevada emissão), solubilidade, preferência de códon e cores da fluorescência (verde, vermelho, azul e amarelo), facilitam e aumentam a gama de aplicações desse gene como marcador ou gene repórter (BLOEMBERG *et al.*, 2000; STUURMAN *et al.*, 2000).

O fluoróforo da GFP tem origem em uma seqüência interna de aminoácidos Ser-Tyr-Gly, o qual é modificado pós-traducionalmente para uma ciclização destes resíduos formando um anel imidazolidona (CODY *et al.*, 1993).

O uso de proteínas repórter é, atualmente, uma excelente ferramenta para o estudo da interação entre plantas e microrganismos. Com essas, é possível monitorar o comportamento dos microrganismos transformados nos tecidos da planta, sobre variações fisiológicas na mesma, além de compreender as interações entre os microrganismos que convivem endofiticamente ou patogenicamente com essas plantas (NAHALKOVA e FATEHI, 2003).

Para estudo de interação de dois organismos, simultaneamente, com a planta, ou entre si, a utilização de genes que codificam as proteínas repórter GFP e DsRed, uma para cada organismo, são as mais indicadas, pela facilidade para a microscopia confocal, já que o espectro de excitação máxima e emissão de fluorescência são próximos (Clayton *et al.*, 2002).

4 METODOLOGIA

A monografia foi realizada no Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) do departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

4.1- MATERIAL BIOLÓGICO

A linhagem controle é o isolado LGMF6 com resultado positivo em teste de patogenicidade para MPC (BALDASSARI *et al.* 2008) e selecionada para agrotransformação seguindo a metodologia descrita por Figueiredo *et al.* (2010) com algumas modificações. Os vetores binários utilizados têm o gene de resistência a canamicina e o gene *bar* (que confere resistência ao glifosinato de amônio) e o gene *gfp* para expressão da proteína GFP (*Green Flourescent Protein*).

4.2 - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

MEIO ÁGAR-ÁGUA (AA) ACRESCIDO DE 3% DE MC E GLIFOSINATO DE AMÔNIO

Meio completo	30mL
Água destilada	1000mL
Agar	15g
Glifosinato de amônio	880µL

Foram acrescentados 3% de meio completo líquido em água destilada. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 1N e o ágar acrescentado diretamente aos frascos. O meio foi autoclavado a 121°C, 1 atm, por 20 minutos e armazenados em temperatura ambiente. O glifosinato de amônio foi adicionado posteriormente à autoclavagem.

MEIO ÁGAR-CITROS

Folhas cítricas	28g
Glicose	20g
Água destilada	1000mL
Agar	15g

As folhas de citros foram pesadas, lavadas em água corrente e autoclavadas em 80% do volume final. As folhas foram descartadas e a glicose acrescentada ao caldo restante. O volume foi completado para 1000mL, o pH ajustado para 5,8 com NaOH 1N e o ágar acrescentado diretamente aos frascos. O meio foi autoclavado a 121°C, 1 atm, por 20 minutos e armazenados em temperatura ambiente.

4.3 PRESERVAÇÃO DOS TRANSFORMADOS

Para preservação dos isolados foi utilizado o Meio Citros. O meio foi derretido e distribuído 10 – 20 mL de meio em pequenos frascos de vidro e tampados com rolha de algodão. Foram autoclavados a 121°C, 1 atm, por 20 min. Após este processo, foram inclinados em um suporte (aproximadamente 30°) de forma que o meio solidificou inclinado, de forma que houve uma “rampa” para repique. Os fungos foram repicados em meio e levados para incubação a 28°C durante 3 – 6 dias, após este período foram armazenados em refrigerador (2 – 4°C) por um mês. Após este período, as linhagens foram novamente repicadas conforme descrito anteriormente.

4.4 ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES COM MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

As linhagens de *Phyllosticta citricarpa*, controle selvagem e os transformantes foram cultivados por um período de sete dias e submetidas a análise de microscopia de epifluorescência. As imagens foram capturadas para análise dos resultados usando um microscópio Olympus UV com filtros Fit C para comprimento de onda de 488 nm de excitação e emissão de 515 nm, correção de luminosidade automática para fotos óticas convencionais, ISO 200 e exposição de 5 segundos para fotos sob raio UV.

4.5 AVALIAÇÃO DA TAXA DE CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIO ÁGAR ÁGUA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE GLIFOSINATO DE AMÔNIO

Neste experimento foi feita a determinação da velocidade do crescimento micelial das 13 linhagens transformadas e a linhagem selvagem LGMF6 cultivadas em meio AA e na presença do glifosinato de amônio (50µg/ml). Discos de 10mm de diâmetro foram obtidos das bordas de uma colônia cultivada em meio AA puro e transferidos para as novas placas de Petri com o mesmo meio e na presença do glifosinato. Para cada repetição, representada por uma placa, um disco foi posicionado no centro e após a repicagem, as linhagens foram incubadas a temperatura de 25°C.

A avaliação do experimento foi realizada nos dias 3, 7 e 10 de crescimento, através da mensuração de diâmetros perpendiculares da colônia com a utilização de régua milimétrica e a taxa média de crescimento expressa em mm/dia.

O experimento foi realizado em 3 repetições para os dois tratamentos, sendo cada parcela representada por uma placa. Os dados obtidos foram submetidos a testes estatísticos com auxílio do software ASSISTAT 7.6 2011.

4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS EM MEIO ÁGAR ÁGUA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE GLIFOSINATO DE AMÔNIO

Para a comparação da produção de picnídios, as linhagens foram repicadas em placas com meio àgar-água (AA), com e sem glifosinato, em quatro pontos perpendiculares de discos foliares de citros (Ø15mm) (FIGURA 2), incubadas a 25°C por 30 dias. Após este período os picnídios produzidos na superfície foliar foram contados com o auxílio de uma lupa e analisados estatisticamente com auxílio do software ASSISTAT 7.6 2011.

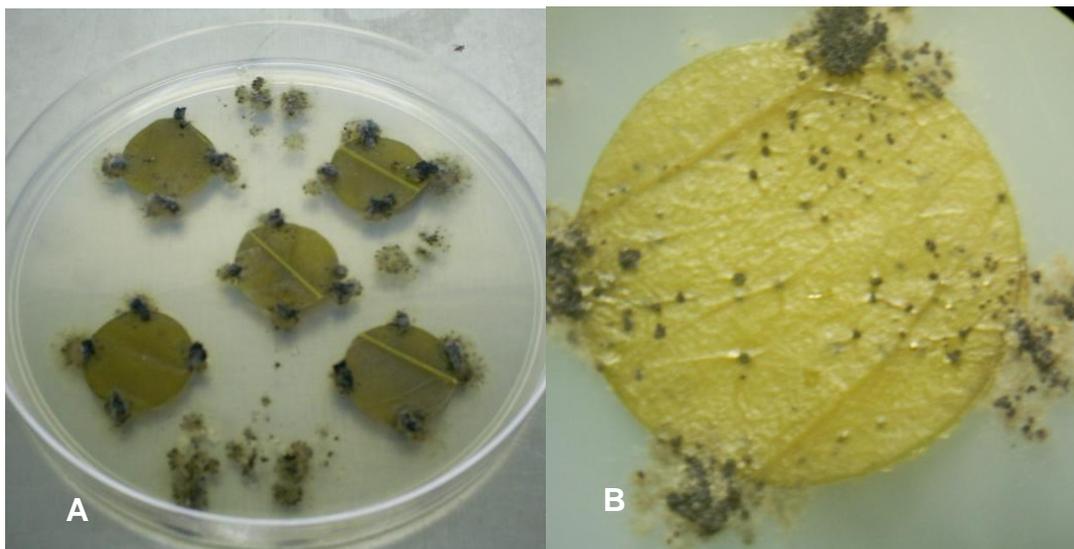


FIGURA 2 - PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS NA SUPERFÍCIE FOLIAR APÓS 15 DE CRESCIMENTO A 25°C (A) E DETALHE DA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS EM AUMENTO DE 20 VEZES (B)
 FONTE: O AUTOR (2011)

5 RESULTADOS

5.1 MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA

Foram avaliadas 13 linhagens transformadas da linhagem LGMF6 de *P. citricarpa* em microscopia de epifluorescência (FIGURA 4) e todos apresentaram emissão de fluorescência. A Figura 4 ilustra a emissão de fluorescência pela linhagem transformada 01 de LGMF6, enquanto nenhuma fluorescência é observada quando a linhagem selvagem é utilizada (FIGURA 5B).



FIGURA 3 – FOTOMICROGRAFIA ÓTICA EM CAMPO CLARO DO TRANSFORMANTE 01 DA LINHAGEM LGMF6 DE *Phyllosticta citricarpa* FONTE: O AUTOR (2011)

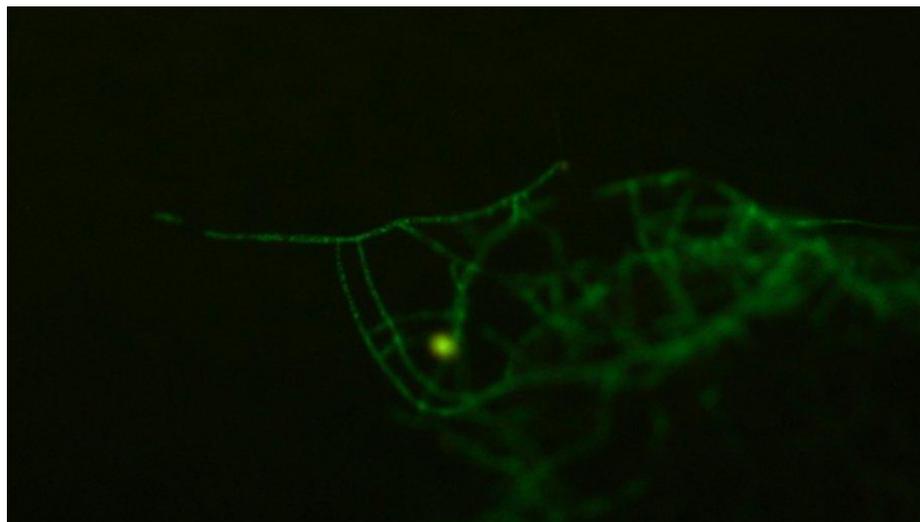


FIGURA 4 - FOTOMICROGRAFIA ÓTICA DE EPIFLUORESCÊNCIA DO TRANSFORMANTE 01 DA LINHAGEM LGMF6 DE *Phyllosticta citricarpa*
 FONTE: O AUTOR (2011)

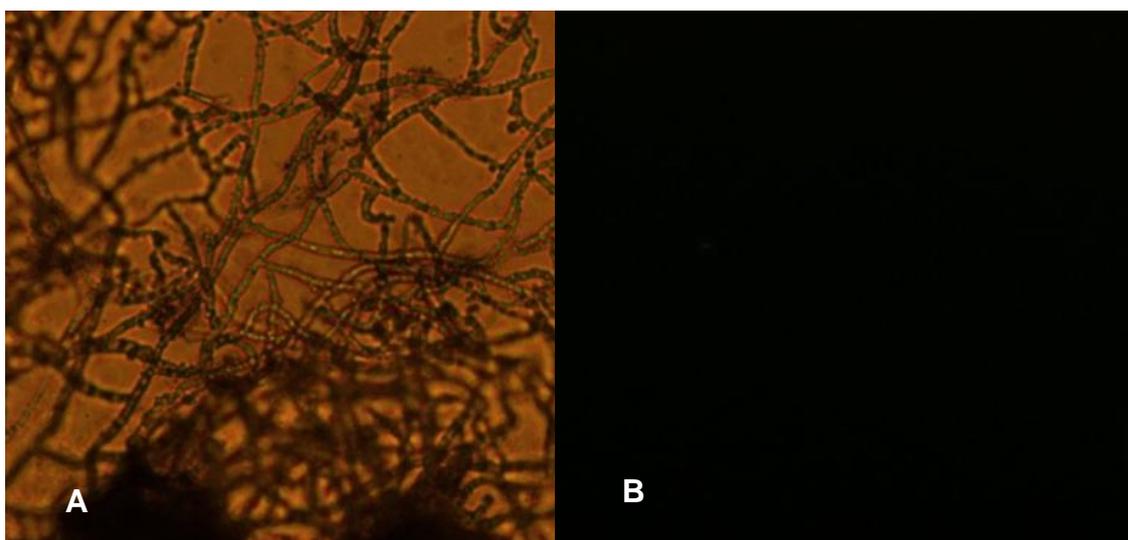


FIGURA 5 – FOTOMICROGRAFIA DA LINHAGEM SELVAGEM LGMF6 DE *Phyllosticta citricarpa* - A) MICROSCOPIA ÓTICA EM CAMPO CLARO, B) MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA
 FONTE: O AUTOR (2011)

5.2 AVALIAÇÃO DA TAXA DE CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIO ÁGAR ÁGUA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE GLIFOSINATO DE AMÔNIO

Os resultados obtidos (TABELAS 1 e 2) foram submetidos a análises estatísticas de normalidade de Shapiro-Wilk e apresentaram dados não normais. Com esta condição, as médias foram avaliadas por testes de variância, não paramétricas, de Kruskal-Wallis demonstrando que as diferenças foram significativas nas comparações entre *P. citricarpa* e os transformantes em meio AA e entre

transformantes em meio AA e em meio AA + glifosinato de amônio. Foi aplicado então um teste t ao nível de 1% de probabilidade de erro que apontou as linhagens transformadas 01 e 16 com crescimento superior ao controle LGMF6 selvagem e às demais que também cresceram mais que o controle em meio AA. Na comparação entre os meios todos os transformantes tiveram crescimento superior em meio AA e as linhagens que apresentaram maiores diferenças (teste t $p < 0.01$), em meio AA+glifosinato de amônio, foram os transformados 01, 06 e 16.

TABELA 1 – MÉDIAS DE CRESCIMENTO MICELIAL (MM) DOS 13 TRANSFORMADOS E DA LINHAGEM SELVAGEM DE *Phyllosticta citricarpa* APÓS 3º, 7º E 10º DIAS DE INCUBAÇÃO A 25°C

Linhagem	3º DIA		7º DIA		10º DIA	
	AA + Glifosinato de Amônio	AA	AA + Glifosinato de Amônio	AA	AA + Glifosinato de Amônio	AA
LGMF6	0	0.33	0	5	0	8.16
1	0.5	5.16	4.16	31.5	11	48.83
2	0	3.33	3.33	24.667	6.5	31.83
3	0	2.83	2.83	24	6.5	39.83
5	0.83	3.16	3	22.83	7.16	39.5
6	0.33	2.16	4	23.83	10.5	38.5
7	0	6	3.5	28.33	5.83	39.16
8	0	1.83	3	12.16	6.16	19.16
9	0	1.83	3.66	14	7.16	24.16
11	0	3	2.33	11.5	3	18
13	0	0	3.33	14.5	3.5	22
14	0	0	3.5	8.5	4.66	16.66
15	0	4	4	22	6.5	38.33
16	1	2.66	8.66	31	13.66	42.83

FONTE: DO AUTOR (2011)

TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM DMS DAS TAXAS DE CRESCIMENTO PELO TESTE T, NO QUAL LETRAS IGUAIS NÃO POSSUEM DIFERENÇAS

MEIO AA		MEIO AA X MEIO AA + Glifosinato de amônio		
DMS	9.841	DMS	15.675	
Linhagem	Classificação	Linhagem	AA	GLIFOSINATO
LGMF6	i			
1	a	1	a	F
2	e	2	c	Gh
3	c	3	b	Gh
5	cd	5	b	Gh
6	cd	6	b	F
7	cd	7	b	H
8	gh	8	de	H
9	f	9	de	Gh
11	gh	11	e	I
13	fg	13	de	I
14	h	14	e	G
15	d	15	b	Gh
16	b	16	a	F

FONTE: DO AUTOR (2011)

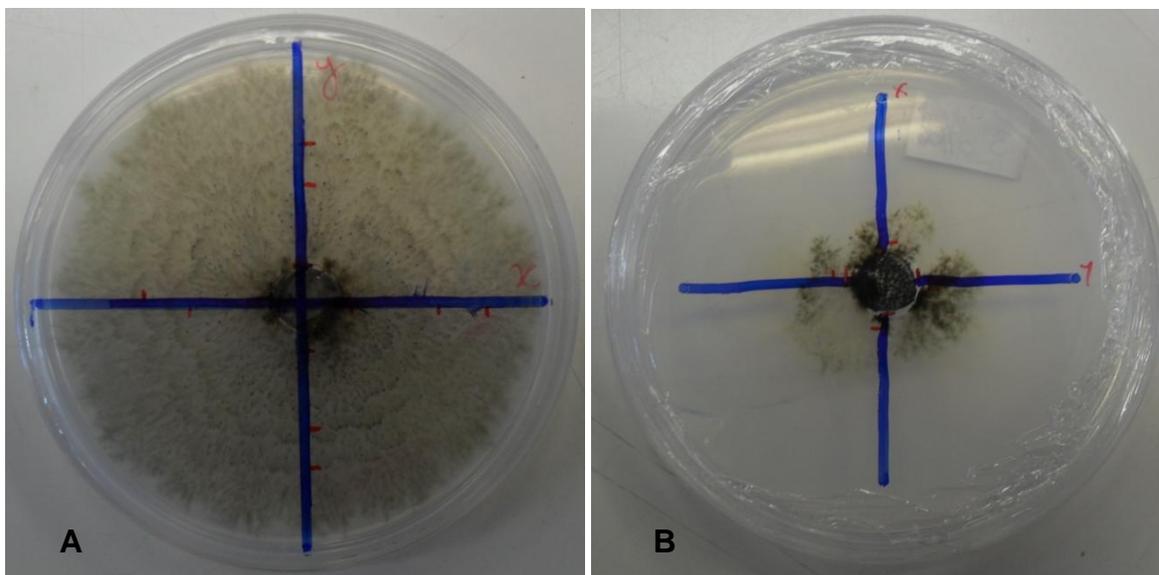


FIGURA 6 – CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIO AA APÓS 10 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25°C. (A) LINHAGEM TRANSFORMADA 16 E (B) LINHAGEM TRANSFORMADA 03
FONTE: DO AUTOR (2011)

5.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS EM MEIO ÁGAR ÁGUA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE GLIFOSINATO DE AMÔNIO

Os resultados obtidos (TABELA 3) foram submetidos a análises estatísticas de normalidade de Shapiro-Wilk e apresentaram assimetria nos dados. Com esta condição, as médias foram avaliadas por testes de variância de Kruskal-Wallis demonstrando que as diferenças foram significativas nas comparações entre *P. citricarpa* x transformantes em meio AA e entre transformantes em meio AA e em meio AA + glifosinato de amônio. Então foi aplicado o Teste t ao nível de 1% de probabilidade com DMS (Diferença mínima significativa) = 25.15 que indicou as linhagens 1, 3 e 13 com diferenças significativas para maior esporulação ao controle LGMF6 selvagem e às demais linhagens, em meio AA. Na comparação entre os meios o Teste t ao nível de 1% de probabilidade com DMS (Diferença mínima significativa) = 37.449 mostrou que o transformante 8, em meio AA + glifosinato de amônio, foi a linhagem que mais produziu picnídios.

TABELA 3 – VALORES MÉDIOS DA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS NA SUPERFÍCIE FOLIAR APÓS 30 DE INCUBAÇÃO A 25^oC DE 12 LINHAGENS TRANSFORMADAS E DA LINHAGEM SELVAGEM DE *Phyllosticta citricarpa*

Linhagem	AA + Glifosinato de Amônio	AA
LGMF6	0	86.8
1	92.9	88.3
2	69.3	69.7
3	99	90.3
5	37.1	68.6
6	13.2	11.7
7	1.8	4.4
8	135.1	94.3
9	0	1.7
13	35.5	106.9
14	96.5	47.3
15	41.4	56.1
16	100.8	71

FONTE: DO AUTOR (2011)

TABELA 4 - CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM DMS DAS PRODUÇÕES DE PICNÍDIOS, NO QUAL LETRAS IGUAIS NÃO POSSUEM DIFERENÇA

MEIO AA		MEIO AA X MEIO AA + Glifosinato de amônio		
DMS = 25.15		DMS=37.499		
Linhagem	Classificação	Linhagem	AA	GLIFOSINATO
LGMF6	c	-	-	-
1	b	1	cd	b
2	de	2	e	f
3	ab	3	bc	b
5	e	5	f	j
6	h	6	-	-
7	i	7	-	-
8	c	8	d	a
9	j	9	-	-
13	a	13	b	j
14	g	14	h	b
15	f	15	g	i
16	d	16	ef	b

FONTE: DO AUTOR (2011)

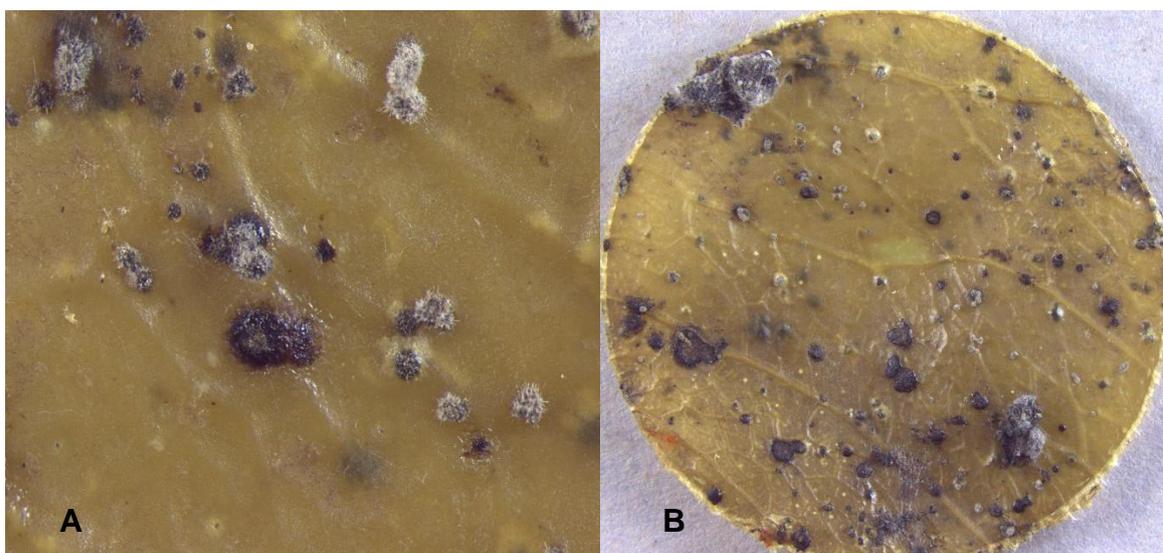


FIGURA 7 - DISCO FOLIAR APRESENTANDO PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DA LINHAGEM SELVAGEM LGMF06 DO FUNGO *P. citricarpa* EM MEIO AA. A: 20X AUMENTO. B: 7X AUMENTO. FONTE: DO AUTOR (2011)

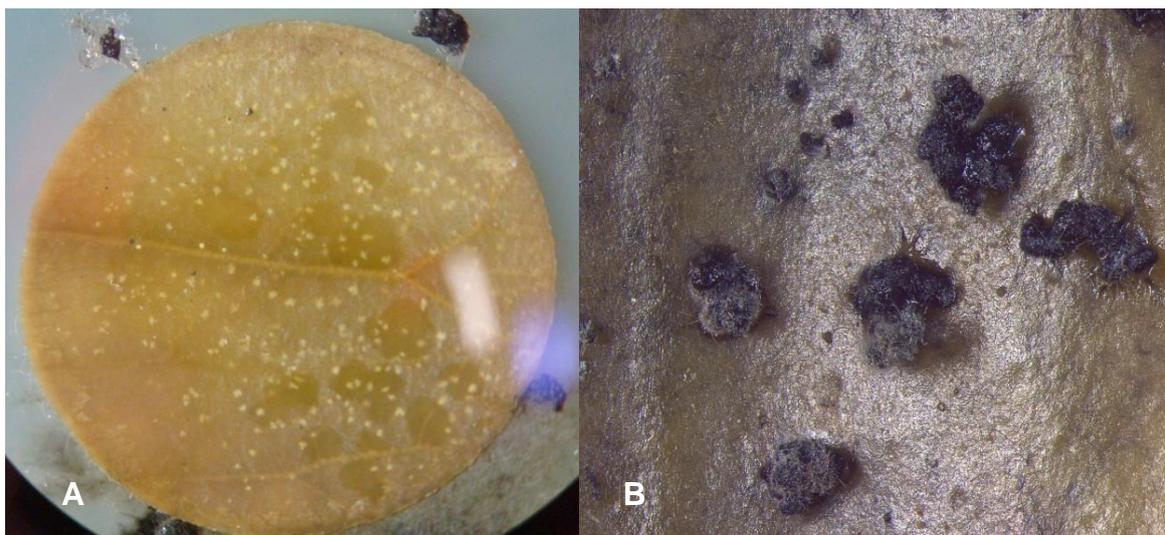


FIGURA 8 – AVALIAÇÃO DE PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS NA SUPERFÍCIE FOLIAR APÓS 30 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25°C. (A) LINHAGEM TRANSFORMADA 09 SEM PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS. AUMENTO: 7.1X. (B) LINHAGEM TRANSFORMADA 01 APRESENTANDO PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS EM MEIO AA COM GLIFOSINATO DE AMÔNIO. AUMENTO: 20X. FONTE: DO AUTOR (2011)

6 DISCUSSÃO

Figueiredo *et al.* (2010) realizaram com sucesso a agrotransformação do fungo *P. citricarpa*. Tais linhagens transformadas serão utilizadas em experimentos de indução de sintomas em frutos cítricos, com vista a estudos de epidemiologia e transcriptômica. Para tanto, no presente trabalho, fez-se necessária a avaliação de 13 linhagens transformadas a fim de selecionar aquelas que apresentem expressão do gene *gfp in vivo* observadas através da utilização de microscópio de epifluorescência, melhor taxa de crescimento micelial e maior produção de estruturas de reprodução assexuada em discos foliares de citros.

O fungo *P. citricarpa* é um ascomiceto que apresenta um crescimento lento se comparado a outros fungos filamentosos, sendo esta característica um fator que dificulta sua utilização em laboratório. Foi comprovado por este trabalho que a agrotransformação para este fungo, causa alterações em fatores de crescimento e esporulação. Como exemplo os indivíduos 06, 07 e 09 apresentaram produção de picnídios inferior ao esperado, apontando uma possível alteração em regiões do DNA ligadas à esporulação com a inserção dos novos genes na agrotransformação.

O seqüenciamento destas regiões através dos genes inseridos possivelmente apresentará dados importantes com relação aos mecanismos e genes envolvidos na esporulação do fungo *P. citricarpa*.

Foi obtida com sucesso a seleção dos indivíduos 01 e 16 que apresentaram expressão fluorescência, crescimento superior e esporulação maior ou semelhante ao controle selvagem.

A seleção de um transformante permite obter indivíduos com características diferentes aos selvagens, em casos como do fungo *P. citricarpa*, facilitando seu uso em experimentos e análises que necessitam de resultados em períodos mais curtos que os anteriores. A agrotransformação com inserção do gene *bar* (que confere resistência ao glifosinato de amônio) auxilia na manutenção dos transformantes contra possíveis contaminantes que não possuem resistência ao glifosinato de amônio.

A presença do glifosinato de amônio demonstrou influencia no crescimento das linhagens estudadas, mesmo com os genes de resistência sendo expressos, causando um possível estresse e alterando sua velocidade de crescimento.

7 CONCLUSÕES

- Todos os transformantes apresentam emissão de fluorescência.
- As linhagens transformadas 06, 07 e 09 apresentaram produção de picnídios inferior ao esperado e podem ser utilizadas em experimentos futuros para identificação de genes envolvidos com este processo.
- Os transformantes que apresentaram crescimento superior em ambos os meios analisados foram o 01 e o 16 além da produção de picnídios semelhante ao selvagem, portanto estes são os mais adequados para a realização de futuros experimentos.

8 REFERÊNCIAS

ARMALEO, D.; YE, G.N.; KLEIN, T.M.; SHARK, K.B.; SANFORD, J.C.; JONHNSTON, S.A. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. **Current Genetics**, v.17, p. 97, 1990.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p.117-137.

BAAYEN, R. P. et al. Nonpathogenic Strains of the Citrus Black Spot Fungus, *Phyllosticta citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *Phyllosticta mangiferae*, (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 5, p.464-477, 2002.

BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROL, G. C.; VAN DER AA, M.; WEERDT, M.; BROUWERSHAVEN, G. C.; SCHUTTE, G. C.; MACCHERONI JR., W.; GLIENKE-BLANCO, C; AZEVEDO, J. L. Nonpathogenic Strains of the Citrus Black Spot Fungus, *Phyllosticta citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *Phyllosticta mangiferae*, (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, v. 92, p. 464-477, 2002.

BAIRD, G.S.; ZACHARIAS, D.A.; TSIEN, T.Y. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.97, p.11984-11989, 2000.

BALDASSARI, R. B. et al. Indução da expressão precoce de sintomas de *Phyllosticta citricarpa* em frutos de laranja 'pêra-rio'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n.2. p. 269-275, ago. 2007.

BALDASSARI, R.; REIS, R. F.; GOES, A. Susceptibility of fruits of the 'Valência' and 'Natal' sweet orange varieties to *Phyllosticta citricarpa* and the influence of the coexistence of healthy and symptomatic fruits. **Fitopatologia Brasileira**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p. 337 - 341, jul./ago. 2006.

BALDASSARI, R.B., WICKERT, E., DE GOES, A. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Phyllosticta citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from *Citrus* spp. **Eur J Plant Pathol.** 120, 103-110, 2008.

BLOEMBERG, G. V.; WIJFLES, A.H.M.; LAMERS, G.E.M.; STUURMAN, N.; LUGTENBERG, B.J.J. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: New perspectives for studying microbial communities. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 13, p, 1170-1176, 2000.

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.

CHARLES, T.C., JIN, S.G., NESTER, E.W. 2-Component sensory transduction system in phytobacteria. **Annual Review of Phytopathology.** v. 30, p. 463-484, 1992.

CLAYTON, A.H.A., Q.S. HANLEY, D.J. ARNDT-JOVIN, V. SUBRAMANIAM and T.M. JOVIN: Dynamic fluorescence anisotropy imaging microscopy in the frequency domain (rFLIM). **Biophys. J.** **83**, 1631-1649, 2002.

CODY, C.W.; PRASHER, D.C.; WESTLER, W. M.; PRENDERGAST, F. G.; WARD, W. W. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. **Biochem.**, v.32, p.1212-1218, 1993.

COVERT, S.; KAPOOR, P.; LEE, M; BRILEY, A.; NAIRN, C.J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. **Mycological Research**. v.105, p.259-264, 2001.

CULTIVAR, 2003. . **Hortaliças e Frutas**. Disponível em <http://revistacultivar.locaweb.com.br/> v.21. Acesso em: 05 de fevereiro de 2011.

FAO, 2005. **Food and Agricultural commodities production** Disponível em: <https://www.fao.org.br/> Acesso em: 05 de fevereiro 2011.

FIGUEIREDO, J. G.; GOULIN, E. H.; TANAKA, F.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L.; STAATS,C.; SCHRANK, A.; GLIENKE, C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Phyllosticta citricarpa*. **Journal of Microbiology Methods**, 2010.

FUNDECITRUS. **Manual técnico sobre Pinta Preta**. Araraquara:Fundo Paulista de Defesa da Agricultura, 2000. 10p. (Boletim Técnico,Edição especial).

HERRERRA-ESTRELLA, L., DE-BLOCK, E., MESSENS, E., ERNALSTEENS, J.-P., VAN MONTAGU, M. AND SCHELL, J. EMBO J. v. 2,p. 987-998, 1983.

KADO, C.I. Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. **Critical Review in Plant Science**, v.10, p.1-32, 1991.

IBGE, 2007. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/> Acesso em 05 de fevereiro de 2011.

LI-MOXIAO; GONG-XIAOYAN; ZHENG-JIN; JIANG-DAOHONG; FU-YANPING; HOU-MINGSHENG. Transformation of *Coniothyrium minitans*, a parasite of *Sclerotinia sclerotiorum*, with *Agrobacterium tumefaciens*. **FEMS-Microbiology-Letters**. v. 243, p. 323-329, 2005.

MILLER, W.C.; LEVEAU, J.H.J.; LINDOW, S.E. Improved *gfp* and *inaZ* broad-host-range promoter-probe vectors. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.13, p.1243-1250, 2000.

MISHRA, N. C.; TATUM, E. L. Non-mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora crassa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 11, p. 3875-3879, 1973.

NAHALKOVA J. & FAHETI, J. Red fluorescent protein (DsRed2) as a novel reporter in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **FEMS Microbiology Letters** 225: 305-309, 2003.

NEVES, M.F. & LOPES, F.F. **Estratégias para a laranja no Brasil**. São Paulo SP. Atlas, 2005.

NEVES, M.F. et al. Metodologias de análise de cadeias agroindustriais: aplicação para citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n. 3, p. 468-473, dez. 2004.

PIZZIRANI-KLEINER, A. **Genética de Fungos no Laboratório**. Editora Universidade do Amazonas, 1998, 138p.

REIS, M.C., FUNGARO, M.H.P., DUARTE, R.T.D., FURLANETO, L., FURLANETO, M.C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **J Microbiol Meth.** 58, 197– 202, 2004.

ROBBS, C. F. A mancha preta dos fungos cítricos (*Phyllosticta citricarpa*): ameaça a citricultura paulista. **Laranja**, Cordeirópolis, v.11, n.1, p.75-86, 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.

RODRIGUES, K. F. *et al.* Characterization of *Phyllosticta mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR-PCR amplifications and ITS1-5.8S-ITS2 sequences. **Mycological Research**, United Kingdom, v. 108, n. 15, p. 45-64, jan. 2004.

RODRIGUEZ, K.F.; SAMUELS, G.J. Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. **Journal of Basic Microbiology**: v. 39, p. 131-135, 1999.

RODRÍGUEZ-TOVAR, A. V.; RUIZ-MEDRANO, R.; HERRERA-MARTÍNEZ, A.; BARRERA-FIGUEROA, B. E.; HIDALGO-LARE, M. E.; REYES-MÁRQUEZ, B. E.; CABRERA-PONCE, J. L.; VALDÉS, M.; XOCONOSTLE-CÁZERES, B. Stable genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Journal of Microbiological Methods**, 2005

ROLLAND,-S., JOBIC,-C; FEVRE,-M; BRUEL,-C. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. **Current-Genetics**. v. 44, p. 164-171, 2003.

SEAB-PR, 2009. **Cartilha Mancha Negra do Citros - 2009**. Disponível em: <
<http://www.seab.pr.gov.br/>>

SILVA-PINHATI, A. C. O. ; Goes, A. ; Wickert, E. ; Machado, M. A. Revisão: A mancha preta dos frutos cítricos - epidemiologia e manejo da doença. **LARANJA**, Cordeirópolis, v.30, n.1-2, p.45-64, 2009.

SILVA, F. DE A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. DE. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE**, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, F. DE A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. DE. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: **WORLD CONGRESS**

ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, **Orlando-FL-USA: Anais. Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2006. p.393-396.

SILVA, F. DE A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. DE. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, n.1,p71-78,2002.

SILVA, F.DE A.S.E. The ASSISTAT Software: statistical assistance.In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. **Anais Cancun: American Society of Agricultural Engineers**, 1996. p.294-298

STAATS, C.C., JUNGES, A., FITARELLI, M., FURLANETO, M., VAINSTEIN, MARILENE H., SCHARANK, A. Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*. **Appl Microbiol Biotechnol**. 76, 945-950, 2007.

STUURMAN, N.; BRAS, C.P.; SCHLAMMAN, H.R.M.; WIJFJES, A.H.M.; BLOEMBERG, G. AND SPAINK, H.P. Use of fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. **Mol Plant-Microbe Interact.**, v.13, p.1163-1169, 2000.

SUGUI, J.A.; CHANG, Y.C., KWON-CHUNG,K.J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption. **Applied-and-Environmental-Microbiology**. v. 71, p. 1798-1802, 2005.

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.

TIMOSSI, A. J. et al. Influência da temperatura e da luminosidade no desenvolvimento de *Phyllosticta citricarpa*, agente causal da mancha preta dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**. Jaboticabal, v. 28, p. 489-494, 2003.

TOMBOLINI, R.; JANSSON, J.K. Monitoring of GFP-tagged bacterial cells. **Methods Mol. Biol.**, v.102, p.258-298, 1998.

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.

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.

ZABRYSKI, P., HOLSTERS, M., KRUGER, K., DEPICKER, A., SCHELL, J., VAN MONTAGU, M.; GOODMAN, H.M. **Science**. v.209, p. 1385-1391.1980.

9 ANEXOS

NORMALIDADE				
Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.0749	-	0.0004	Não

TABELA 5- TESTE DE NORMALIDADE PRODUÇÃO DE PICNÍDEOS CONTROLE X TRANSFORMANTES
 FONTE: DO AUTOR (2011)

TESTE DE KRUSKAL-WALLIS
<p>H0: As médias não são diferentes Ao nível de 5% de probabilidade H = 90.8535 Hcrit = 21.0261 p-valor < 0.05 H0 foi rejeitada Ao nível de 1% de probabilidade H = 90.8535 Hcrit = 26.2170 p-valor < 0.01 H0 foi rejeitada</p>

TABELA 6 - TESTE DE VARIÂNCIA PRODUÇÃO DE PICNÍDEOS CONTROLE X TRANSFORMANTES
 FONTE: DO AUTOR (2011)

NORMALIDADE				
Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.94655	-	0.0000	Não

TABELA 7- TESTE DE NORMALIDADE PRODUÇÃO DE PICNÍDEOS AA X AA+GLIFOSINATO
 FONTE: DO AUTOR (2011)

TESTE DE KRUSKAL-WALLIS

H0: As médias não são diferentes
 Ao nível de 5% de probabilidade
 H = 192.1772 Hkrit = 35.1725
 p-valor < 0.05 H0 foi rejeitada
 Ao nível de 1% de probabilidade
 H = 192.1772 Hkrit = 41.6383
 p-valor < 0.01 H0 foi rejeitada

TABELA 8 - TESTE DE VARIÂNCIA PRODUÇÃO DE PICNÍDEOS AA X AA+GLIFOSINATO
 FONTE: DO AUTOR (2011)

NORMALIDADE

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.93613	-	0.02098	Não

TABELA 9- TESTE DE NORMALIDADE CRESCIMENTO MICELIAL CONTROLE X TRANSFORMANTES
 FONTE: DO AUTOR (2011)

TESTE DE KRUSKAL-WALLIS

H0: As médias não são diferentes
 Ao nível de 5% de probabilidade
 H = 37.4570 Hkrit = 22.3620
 p-valor < 0.05 H0 foi rejeitada
 Ao nível de 1% de probabilidade
 H = 37.4570 Hkrit = 27.6882
 p-valor < 0.01 H0 foi rejeitada

TABELA 10 - TESTE DE VARIÂNCIA CRESCIMENTO MICELIAL CONTROLE X TRANSFORMANTES
 FONTE: DO AUTOR (2011)

NORMALIDADE

Teste (Estatística)	Valor	Vcrit	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.87170	-	0.0000	Não

TABELA 11 - TESTE DE NORMALIDADE CRESCIMENTO MICELIAL COMPARAÇÃO DE MEIOS
 FONTE: DO AUTOR (2011)

TESTE DE KRUSKAL-WALLIS

H0: As médias não são diferentes

Ao nível de 5% de probabilidade

H = 71.7753 Hkrit = 37.6525

p-valor < 0.05 H0 foi rejeitada

Ao nível de 1% de probabilidade

H = 71.7753 Hkrit = 44.3140

p-valor < 0.01 H0 foi rejeitada

TABELA 12 - TESTE DE VARIÂNCIA CRESCIMENTO MICELIAL COMPARAÇÃO DE MEIOS
FONTE: DO AUTOR (2011)