

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOSIANE GOMES FIGUEIREDO

**AGROTRANSFORMAÇÃO DE *Guignardia citricarpa* E *Xylaria* sp E
COMPATIBILIDADE VEGETATIVA EM *G.citricarpa* E *Phyllosticta* spp**

**CURITIBA
2011**

JOSIANE GOMES FIGUEIREDO

**AGROTRANSFORMAÇÃO DE *Guignardia citricarpa* E *Xylaria* sp E
COMPATIBILIDADE VEGETATIVA EM *G.citricarpa* E *Phyllosticta* spp**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de concentração: Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Chirlei Glienke

Co - orientadora: Prof^a Dr^a Vanessa Kava-Cordeiro

**CURITIBA
2011**

Mãe...

... Desejando que, de alguma forma, você estivesse aqui novamente; desejando que, de alguma forma, você estivesse perto. Algumas vezes parecia que, se eu apenas sonhasse você estaria aqui...

Dedico

A você Figueiredo, que sempre confiou em mim e nunca me deixou desistir de acreditar em meus sonhos. À minha família que compartilhou os momentos de imensa alegria e de mais profunda dor...

AGRADECIMENTOS

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

À Prof^a Dr^a Chirlei Glienke, por contribuir para realização do meu sonho, tornou-se uma amiga e um exemplo, meus agradecimentos vão muito além da sua orientação e seria impossível expressá-los apenas com palavras em uma folha de papel. OBRIGADA por tudo que você tem feito por mim, sua maneira de ser me inspira!

Ao amigo, Eduardo Henrique Goulin, pelos momentos que passamos juntos na bancada, pelo ombro amigo nas horas do desabafo e pelo carinho!

À Prof^a Dr^a Lygia Vitória Galli-Terasawa pelo ombro amigo nos momentos mais angustiantes deste último ano, pela convivência, sugestões e auxílio no LabGeM;

À Prof^a Dr^a Vanessa Kava-Cordeiro pela amizade, pela companhia agradável, sempre dividindo seus conhecimentos no LabGeM;

Às amigas, Juliana, Rosana e Franciele, amigas sinceras e companheiras de muitos momentos;

Ao Prof^o Dr. Antônio de Goes e à Prof^a Dr^a Patrícia do Rocio Dalzoto, pelas valiosas sugestões no andamento da pesquisa;

À Prof^a Dr^a Maria Luiza Petzel-Erler, do Laboratório de Genética Molecular Humana, à Prof^a Dr^a Enilze Ribeiro, do Laboratório de Citogenética Humana e aos seus alunos, pelas facilidades concedidas neste trabalho;

Aos amigos do doutorado e aos alunos de Pós-Graduação do LabGeM, pelos momentos de convivência dentro e fora da Universidade. Em especial à aqueles que colaboraram para realização da pesquisa, Fabiana Tonial, Patricia de Araújo, Caroline Waculicz, Daniele Stringari, Renata Rodrigues e Juliana Marta;

Aos estagiários do LabGeM por bons momentos de convivência e ajuda naqueles momentos que tudo parecia impossível de ser realizado, em especial à Rosana, Fernanda, Andressa, Douglas e Thaísa;

À Izolde Gaetner, pela ajuda e disponibilidade;

À Anilda Gomes da Silva, pelo eventual auxílio técnico na SEAD;

Ao Maicon, pelo auxílio técnico com o material de laboratório;

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Genética, pelas orientações e informações;

A todos os colegas e funcionários do Departamento de Genética.

Ao corpo docente do Departamento de Genética;

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

Ao CNPq, FUNDECITRUS, Fundação Araucária e FAPESP pelo apoio financeiro;

À minha mãe, que compartilhou comigo e com todos que viveram ao seu lado lições para uma vida, o intenso otimismo, a persistência e fé até os seus últimos dias;

Ao meu pai, que não pode partilhar deste momento e sinto falta da sua presença...

Ao Figueiredo e ao meu filho Raul, pelo amor, carinho e pela compreensão da ausência neste período;

À minha família, em especial à minha irmã, a Helena e ao meu cunhado Angelo, pelo amor, carinho e incentivo em todos os momentos;

À Angelina, pela dedicação ao seu trabalho e pelo carinho que cuida da minha família.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	6
1 INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	10
3. REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 Mancha Preta do Citros e <i>Guignardia citricarpa</i> Kiely	11
3.2 Transformação de fungos filamentosos.....	14
3.3 Antagonismo de microrganismos endofíticos e o controle biológico	19
3.3 Compatibilidade Vegetativa.....	22
4. CAPÍTULO I: TRANSFORMAÇÃO DE <i>Guignardia citricarpa</i> MEDIADA POR <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
5. CAPÍTULO II: ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE <i>Maytenus ilicifolia</i> NO CONTROLE DE <i>Guignardia citricarpa</i>	30
Abstract	30
5.1. Introdução	31
5.2 Materiais e Métodos	32
5.2.1 Isolamento, identificação, obtenção de extratos metanólicos e CCD	32
5.2.2 Seleção de antagonistas contra <i>G. citricarpa</i>	33
5.2.3 Agrotransformação e análise dos transformantes	35
5.3. Resultados	35
5.3.1 Isolamento e identificação de fungos endofíticos de <i>M. ilicifolia</i>	35
5.3.2 Seleção de antagonistas contra <i>G. citricarpa</i>	36
5.3.4 Agrotransformação dos isolados 69JES e 70JES	39
5.4. Discussão e conclusão.....	40
5.5 Referências	43
6. CAPÍTULO III: Compatibilidade vegetativa e caracterização molecular de <i>Guignardia citricarpa</i>, <i>Phyllosticta capitalensis</i> e <i>P. citribraziliensis</i>	48
Abstract	48
6.1 INTRODUÇÃO	49
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
6.2.1 Isolados e condições de crescimento.....	50
6.2.2 Avaliação da compatibilidade vegetativa.....	51
6.2.3 Caracterização Molecular.....	53
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
6.3.1 Avaliação da compatibilidade vegetativa.....	54
6.3.2 Caracterização molecular	62
6.4 Referências	65
7. DISCUSSÃO	68
8. CONCLUSÕES GERAIS	71
9. PERSPECTIVAS	72
10. REFERÊNCIAS	73
APÊNDICES	76

1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se na citricultura, sendo detentor de um terço da produção mundial e 85% da produção internacional do suco de laranja, representando uma das principais atividades do agronegócio brasileiro (AGRIANUAL 2009; ASSOCITRUS, 2010). Entretanto, em que pese à importância do setor, o mesmo é afetado por vários problemas de ordem fitossanitária, notadamente as doenças causadas por micro-organismos. E, dentre estas, destaca-se a Mancha Preta dos Citros (MPC), ou Pinta Preta, como também é designada.

Os sintomas da MPC restringem-se quase que exclusivamente à casca dos frutos de onde vem os prejuízos causados pela sua depreciação, principalmente no mercado externo. De tal forma, muitas pesquisas fazem-se prioritárias e urgentes com vistas a minimizar os prejuízos.

A MPC é causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* VAN DER AA, 1973 (anamorfo: *Phyllosticta citricarpa*), uma doença quarentenária A1 para os países da União Européia e Estados Unidos da América. Ela afeta praticamente todas as espécies de citros com importância econômica, especialmente as laranja doces (*Citrus sinensis*) (WULANDARI *et al.*, 2009). Há relatos da ocorrência da MPC em países da África, Ásia, Oceania, América do Sul e Caribe (EPPO 2009; CABI, 2010)

Duas espécies morfológicamente similares do gênero estão associadas às plantas cítricas: *G. citricarpa* (anamorfo: *Phyllosticta citricarpa*) e *Phyllosticta capitalensis* (GLIENKE *et al.*, 2010). Baldassari *et al.*(2008), relatam que somente *G. citricarpa* causa a MPC mas ambas, *G. citricarpa* e *P. capitalensis*, podem ser isoladas de plantas cítricas, podendo *P. capitalensis* também ser isolada em frutos afetados pela MPC, no último caso, estes isolados são considerados oportunistas e, possivelmente mostram-se como antagonistas à espécie patogênica. *Phyllosticta citribraziliensis* (GLIENKE *et al.*, 2010) foi isolada de citros no Brasil, sendo anteriormente tratada como *Phyllosticta spinarum* (STRINGARI *et al.*, 2009).

Devido à relevância da doença MPC, a busca de alternativas eficientes de controle e, na medida do possível, sob uma ótica e concepção de sustentabilidade mais refinada, fazem-se urgentes e imprescindíveis, tornando-se evidente a importância do seu estudo.

Uma estratégia que demonstrou ser eficiente e promissora no manejo de doenças é a seleção de antagonistas capazes de serem agregados ao arsenal de proteção contra os patógenos. Entre eles, destacam-se os micro-organismos endofíticos que se associam às plantas de forma mutualística, competindo com patógenos, diminuindo a ação dos herbívoros e de insetos, aumentando a tolerância a estresses abióticos e bióticos, protegendo as plantas e favorecendo seu crescimento, em contrapartida, recebem proteção e nutrientes do seu hospedeiro (AZEVEDO *et al.*, 2000; BACON e WHITE, 2000; ARNOLD, 2008; RODRIGUEZ *et al.*, 2009). Na estreita relação entre endofíticos e a planta hospedeira pode ocorrer produção de metabólitos secundários que interferem de alguma forma no desenvolvimento de patógenos (SCHULZ *et al.*, 2006; BACKMAN e SIKORA, 2008; YU *et al.*, 2010).

Figueiredo (2006), em estudos realizados com fungos endofíticos isolados de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa), sugeriu o potencial de endofíticos do gênero *Xylaria* como possíveis agentes no controle de *G. citricarpa*. Estudos de interação *in planta* entre o agente causal da MPC e os isolados endofíticos de *Xylaria* sp. são necessários para verificar o potencial destes para o controle biológico do patógeno e as interações que estes apresentam.

O presente estudo relata um protocolo eficiente de agrotransformação para *G. citricarpa* e *Xylaria* sp., representando uma importante ferramenta para os estudos genômicos de *G. citricarpa* e nas interações planta-patógeno com potenciais controladores biológicos.

Para compreensão sobre a variabilidade genética de *G. citricarpa* torna-se importante estabelecer o estudo da anastomose de hifas e formação de heterocários, bem como o estabelecimento de grupos de compatibilidade vegetativa. Os sistemas de compatibilidade vegetativa geralmente restringem a transferência de material nuclear e elementos citoplasmáticos durante o crescimento do fungo e podem ser utilizados em estudos de variabilidade genética de várias espécies. São denominadas compatíveis vegetativamente as linhagens que apresentam identidade alélica para um conjunto particular de *loci* denominados *het* ou *vic*. A presença de tais *loci* possibilita aos seus portadores a formação de heterocários estáveis. Por outro lado, linhagens que diferem em qualquer um destes *loci* são incapazes de formar heterocários estáveis e são classificadas como vegetativamente incompatíveis (PUHALLA, 1985; LESLIE, 1993; SAUPE, 2000). A heterocariose

consiste no primeiro estágio do ciclo parassexual e podem resultar em haplóides recombinantes através dos processos de recombinação e haploidização, responsáveis pela variabilidade genética de patógenos. Está relacionada com o surgimento de isolados resistentes a fungicidas e de linhagens capazes de quebrar a resistência de plantas (AZEVEDO, 1998).

Nos casos de cruzamentos compatíveis, considera-se que exista uma similaridade genética entre os isolados e uma provável origem geográfica comum, além de haver semelhantes atributos biológicos, fisiológicos e patogênicos (GLASS *et al.*, 2000). Isto significa dizer que, nestas linhagens, quando presentes no mesmo hospedeiro e ao mesmo tempo, podem ocorrer a heterocariose e a complementação de alelos.

O sistema de agrotransformação desenvolvido para *G. citricarpa* possibilitará a visualização das fusões de hifas que estão ocorrendo entre as linhagens e as reações de compatibilidade, por meio de microscopia de epifluorescência. Sendo o protocolo de agrotransformação eficaz para *G. citricarpa*, o mesmo poderá ser realizado com *P. capitalensis*, utilizando um gene repórter diferente, possibilitando a visualização das interações que ocorrem, o entendimento das rotas de colonização entre linhagens patogênicas e endofíticas, bem como a formação dos grupos de compatibilidade vegetativa. A precisão na identificação e entendimento da forma de atuação e colonização das duas espécies adquire grande importância econômica.

Neste contexto, o desenvolvimento de um eficiente e viável sistema de transformação para *G. citricarpa* relatado aqui, é importante, pois contribuirá para elucidar a função de genes relacionados com a patogenicidade e virulência, abrindo um horizonte de possibilidades de estratégias moleculares para fins de controle biológico.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- Desenvolver a metodologia eficiente de agrotransformação para *Guignardia citricarpa* e analisar os transformantes;
- Isolar fungos endofíticos de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss) e identificar os principais gêneros com sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA;
- Realizar testes de atividade antimicrobiana contra *G. citricarpa*, utilizando os fungos endofíticos isolados de espinheira-santa;
- Desenvolver metodologia de agrotransformação para os endofíticos potencialmente capazes de inibir *G. citricarpa*;
- Verificar a presença de pareamentos de linhagens de *G. citricarpa*, *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis* potencialmente capazes de trocar materiais nucleares e citoplasmáticos entre si, formando Grupos de Compatibilidade Vegetativa (GCV);
- Realizar análise taxonômica com sequenciamento das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA e parcial do gene $\alpha 1$ do fator de alongação das linhagens de *G. citricarpa*, *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis* utilizadas no estudo de compatibilidade vegetativa.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Mancha Preta do Citros e *Guignardia citricarpa* Kiely

Entre os agentes causadores de consideráveis perdas para citricultura brasileira destaca-se o fungo patogênico *Guignardia citricarpa* Kiely (*Phyllosticta citricarpa* Van Der Aa), espécie causadora da doença conhecida como Mancha Preta dos Citros (MPC). A doença foi descrita pela primeira vez em 1895, na Austrália, nas proximidades da cidade de Sidney (KIELY, 1948), como sendo responsável por perdas de frutos de laranjeira da variedade Valência. No ano de 1925, detectou-se sua presença na África do Sul (DOIDGE, 1929), como consequência da importação de mudas provenientes da Austrália. Posteriormente, foi detectada em diversos continentes, entre eles a América do Sul (FEICHTENBERGER, 1996; FEICHTENBERGER *et al.*, 1997). Atualmente a doença está presente em vários países da África (Moçambique, Zimbábue e África do Sul), Ásia (China, Coreia, Hong-Kong, Filipinas, Taiwan, Japão), Oceania (Austrália) e América do Sul (Argentina, Peru, Uruguai e Brasil), Caribe (Cuba), assim como no Estado da Florida, EUA. As maiores perdas vêm sendo registradas na África do Sul, Japão, Argentina e, principalmente, no Brasil (EPPO, 2009; CABI, 2010)

No Brasil, apesar de não ter sido mencionada perda em relação à produção de frutos, a MPC foi descrita pela primeira vez a partir de frutos verificados em uma feira livre em Piracicaba, interior de São Paulo, em 1940 (AVENA-SACCÁ, 1940). Mais tarde a doença foi relatada no Rio de Janeiro, nos municípios de São Gonçalo e Itaboraí, causando perdas em frutos de pomares de “Tangerina-Rio” (ROBBS *et al.*, 1990), e posteriormente disseminando-se pela baixada Fluminense. No Estado do Rio de Janeiro a doença está presente em frutos de laranjas Lima, Seleta, Folha Murcha, Natal e Valência (GOES *et al.*, 1990). Posteriormente, a principal região produtora do Rio Grande do Sul, no Vale do Caí, também foi afetada, no ano de 1986 (FEICHTENBERGER, 1996).

Em 1992, a MPC foi relatada em frutos de limão verdadeiro e laranja doce, nos municípios de Conchal e Engenho Coelho (GOES e FEICHTENBERGER, 1993), espalhando-se de forma endêmica pela região produtora de citros do interior de São Paulo (FEICHTENBERGER, 1996; GOES, 1998). Atualmente a doença está presente em todas as regiões produtoras de citros do Estado, atingindo todas as

variedades de laranja doces, limões verdadeiros, pomelos e algumas variedades de tangerina (FEICHTENBERGER, 1996a). Para o caso do Estado de São Paulo, a rápida disseminação do patógeno pode ter sido favorecida pelas condições ambientais propícias à multiplicação do fungo, no ano de 1994 (FEICHTENBERGER, 1996b), quando o estresse hídrico contribuiu para uma grande desfolha das plantas, e subsequentemente, com as chuvas de primavera e verão, com a formação e liberação de ascósporos do fungo, e conseqüente disseminação para toda a região, ampliando sua distribuição geográfica.

A MPC é causada pelo fungo *G. citricarpa* Kiely, um ascomiceto, *Loculoascomiceto*, pertencente à ordem Dothideales e família Dothideacea. Caracteriza-se por apresentar uma fase assexuada, descrita como *Phyllosticta citricarpa*, e uma fase sexuada descrita como *G. citricarpa*. Geralmente, ambas as formas são encontradas associadas. A fase assexuada foi descrita pela primeira vez, em 1889 por McAlpine (McONIE, 1964), recebendo a denominação de *Phoma citricarpa* McAlpine (ROBBS, 1990).

Em 1964, McOnie (1964) descreveu duas variantes de *G. citricarpa*, morfológicamente idênticas, que ocorriam em citros, sendo uma delas patogênica e a outra endofítica. Atualmente, sabe-se que a forma endofítica é outra espécie, denominada *Phyllosticta capitalensis* (GLIENKE *et al.*, 2011). Diversos autores, como Carroll e Carroll (1978), Petrini (1986), Leuchtmann *et al.*, (1992), Glienke (1995), Rodriguez e Samuels (1999), Penna (2000), Glienke-Blanco *et al.*, (2002) isolaram espécies de *Phyllosticta* de material aparentemente sadio, descrevendo-as como endofíticas.

A fase assexuada corresponde à produção de picnidíósporos ou conídios, que são unicelulares, ovóides, elípticos ou subglobosos, levemente clavados quando jovens, apresentando a base truncada, arredondada e denteada no ápice, recoberta por uma membrana gelatinosa (GLIENKE, 1995; GLIENKE-BLANCO *et al.*, 2002). As estruturas de frutificação são os picnídios, que macroscopicamente são pequenos, globosos, pretos e semi-eruptivos, presentes em lesões nos ramos, frutos e folhas aderidas ou nas já caídas, em processo de decomposição.

A fase sexuada corresponde à produção de ascósporos, os quais se encontram em número de oito no interior dos ascos. Estes apresentam forma de clava, são alongados 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).

As formas assexuadas e sexuadas geralmente são encontradas associadas (JOHNSTON e FULLERTON, 1988). Através de isolamentos realizados a partir de folhas e frutos, obtêm-se colônias de coloração negra, com bordas lobulosas e de aspecto granuloso, que cresce lentamente, atingindo diâmetro aproximado de 7 cm em 20 dias, em vários meios de cultura a 20°C (PUNI THALINGAM, 1982).

O fungo *G. citricarpa* é pouco estudado geneticamente, sabendo-se apenas que possui pelo menos oito cromossomos e genoma de aproximadamente 21,5 Mb (GLIENKE-BLANCO, 1999). Apresenta ainda alta instabilidade, com freqüente formação de setores, e grande dificuldade na obtenção de mutantes auxotróficos utilizando-se a luz ultravioleta como agente mutagênico.

O ciclo da MPC pode ocorrer de duas maneiras: através dos picnidiósporos ou conídios (esporos assexuais) e dos ascósporos (esporos sexuais). Os picnidiósporos são encontrados em frutos sintomáticos, folhas caídas ou aderidas, pedúnculos dos frutos e em ramos mortos e, são responsáveis pela infecção à curta distância, já que são dispersos pela água da chuva, orvalho ou irrigação. Os ascósporos são encontrados em folhas caídas e em decomposição, sendo responsáveis pela infecção tanto à longa quanto à curta distância, pois são liberados a partir dos pseudotécios e podem ser carregados por correntes aéreas (ROBBS e BITTENCOURT, 1995; FEICHTENBERGER, 1996).

Nos frutos e nas folhas a doença caracteriza-se por apresentar lesões com bordas salientes, marrom-escuras, e um halo amarelo ao redor, com depressão no centro onde se encontram os picnídios, pequenos pontos pretos. As lesões podem atingir os frutos maduros ou no início de maturação, ou aparecer após a colheita, no transporte e armazenamento (FEICHTENBERGER, 1996). As lesões podem ser classificadas de acordo com suas características, que variam em função do tamanho, fase de maturação do fruto, condições climáticas e tipo de esporo responsável pela infecção (GOES, 1998; FUNDECITRUS, 2000).

O surgimento de sintomas pode levar de 5 a 30 anos, permanecendo na fase quiescente, dependendo da variedade e condições ambientais. Sabe-se que altas temperaturas, quando o fruto está maduro ou próximo à maturidade (McONIE, 1964), ou o aumento de luminosidade, favorecem o aparecimento dos sintomas

(BRODRICK e RABIE, 1970). A MPC afeta apenas a casca do fruto e o flavedo (epicarpo), sem causar dano interno ao fruto, limitado pelo albedo (mesocarpo).

Os frutos com sintomas da MPC são depreciados para o mercado da fruta fresca ou, em alguns casos, totalmente inviáveis de serem comercializados, devido à elevada expressão de sintomas. Nos casos em que os sintomas se expressam próximo ou no pedúnculo, pode ocorrer a queda precoce do fruto, aumentando ainda mais as perdas na produção, podendo, às vezes, exceder a 80% (GOES *et al.*, 2005). Os prejuízos também decorrem da necessidade do controle sistemático do patógeno, ocorrência de várias colheitas, algumas delas com frutos com características tecnológicas inadequadas para o processamento industrial e redução na produção, já que, muitas vezes, há queda dos frutos antes de atingirem o seu tamanho e peso normais. A sua comercialização no mercado de frutas é prejudicada, assim como a sua exportação devido à barreira fitossanitária existente na União Europeia e Estados Unidos da América, por ser uma doença quarentenária A1.

3.2 Transformação de fungos filamentosos

Entende-se por 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 fungos foi realizado em 1973, com *Neurospora crassa* (MISHRA e TATUM, 1973). Novos sistemas de transformação para fungos filamentosos começaram a ser desenvolvidos, nos quais o emprego de células desprovidas de parede celular (protoplastos) ocorreu 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.

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. Nos últimos anos foi desenvolvido um processo de transferência gênica mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (agrotransformação) (BUNDOCK *et al.*, 1995; De GROOT *et al.*, 1998), principalmente para os casos em que a utilização de sistemas como a obtenção de protoplastos e/ou a biobalística não são viáveis.

Para obtenção de protoplastos são usadas enzimas capazes de degradar a parede celular de diferentes tipos celulares (micélio ou esporos). Protoplastos de micélio são mais utilizados. No entanto, geralmente são multinucleados formando, em consequência, transformantes heterocarióticos. Faz-se necessário uma posterior purificação para a obtenção de colônias monospóricas. A escolha do tipo celular utilizado na obtenção dos protoplastos depende das vantagens e as possibilidades de obtenção de melhores resultados (PIZZIRANI-KLEINER, PEREIRA e AZEVEDO, 1998; DIEZ, 2002). O composto lítico influencia tanto a obtenção como a regeneração dos protoplastos, pois enzimas com atividades mais específicas liberam mais protoplastos, porém com regeneração lenta. É importante a utilização de um estabilizador osmótico que proporcione alto rendimento na produção de protoplastos e com alta frequência de regeneração (reversão à hifa normal). A introdução do DNA exógeno nas células competentes utiliza polietileno glicol (PEG) e íons de cálcio. Os íons de cálcio, dissociados em solução, carregam positivamente a membrana celular, enquanto o PEG tem a função de aglutinar os protoplastos, e aproximar o DNA na superfície da membrana (BALANCE e TURNER, 1985). As moléculas de DNA são internalizadas durante a fusão das membranas dos protoplastos, induzidas por PEG (TIMBERLAKE e MARSHALL, 1989). As concentrações de PEG e íons de cálcio e o tempo de exposição são variáveis. Apesar do baixo custo empregado nesta metodologia, é necessária a otimização das etapas de obtenção e regeneração de protoplastos. Além disso, muitas vezes a frequência de transformação obtida não é satisfatória (LIMA, 2005).

A eletroporação baseia-se na aplicação de um pulso elétrico de alta amplitude e curta duração, que polariza os componentes da membrana criando uma diferença de potencial, possibilitando o aparecimento de micro-rupturas que conferem permeabilidade reversível aos componentes exógenos. Apesar de simples,

a técnica exige o ajuste nas condições de pulso em função do tamanho da célula, da condutividade do meio de eletroporação e da viabilidade das células após os pulsos. A eletroporação foi primeiramente empregada na transformação de *Fusarium solani* e *A. nidulans* (RICHEY *et al.*, 1989), e posteriormente foi expandida para diversas outras espécies de fungos.

As técnicas citadas anteriormente, entretanto, não garantem uma alta eficiência na obtenção de transformantes (LEUNG *et al.*, 1990).

A biobalística baseia-se no emprego de partículas de alta densidade, como ouro e tungstênio, que ao serem aceleradas a uma determinada velocidade, introduzem o DNA exógeno nas células hospedeiras. Este método de transformação em fungos foi primeiramente descrito para *S. cerevisiae* (ARMALEO *et al.*, 1990), e desde então, outras espécies de fungos vêm sendo transformadas (FUNGARO *et al.*, 1995), principalmente em espécies de difícil cultivo, obtenção ou regeneração de protoplastos. Apesar de ter sido inicialmente descrita em plantas, a biobalística é eficiente em alguns fungos filamentosos e leveduras (ARMALEO *et al.*, 1990). As principais vantagens para aplicação desta técnica residem na utilização de células intactas sem a necessidade da obtenção de protoplastos e que as partículas lançadas penetram diretamente no núcleo, evitando a ação de nucleases citoplasmáticas no DNA exógeno.

O método de agrotransformação inicialmente desenvolvido em plantas utiliza uma bactéria Gram negativa de solo, a *Agrobacterium tumefaciens*. Ela é 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 qual se integra 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*) 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, em roseira, foi possível o estabelecimento da metodologia de agrotransformação. A doença caracteriza-se pelo crescimento de galhas na raiz ou na coroa da planta, e 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 demonstraram que a

formação de galhas induzidas por *A. tumefaciens* estava diretamente associada à presença de um plasmídeo de alto peso molecular (120 a 250 kb), denominado plasmídeo Ti (do inglês “*tumor inducing*”). Este plasmídeo está presente somente em linhagens patogênicas de *Agrobacterium* spp, em um baixo número de cópias. O processo envolvido na transferência do plasmídeo Ti para a planta envolve várias etapas, entre elas processos de sinalização entre planta-bactéria. Substâncias liberadas pela planta ativam genes localizados em uma região do plasmídeo Ti, chamada região de virulência (região *vir*), composta de seis a oito *operons*, contendo, aproximadamente, 25 genes. Diversas proteínas codificadas pelos genes da região *vir* promovem a transferência de outra região do plasmídeo 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) (WANG *et al.*,1984). Uma vez no núcleo da célula, o T-DNA é integrado ao genoma vegetal e então expresso de forma estável. O T-DNA de *A. tumefaciens* contém uma série de genes conhecidos como oncogenes, os quais codificam enzimas envolvidas na via de biossíntese de hormônios vegetais (citocininas e auxinas), causando um desequilíbrio hormonal nas células transformadas, e como consequência, a proliferação desordenada das células transformadas leva à formação da galha (BARROS *et al.*, 2004).

A demonstração da transferência de informação genética da bactéria para uma planta estimulou pesquisas visando a utilização deste sistema para a transferência de genes nos mais diversos organismos. Porém, o sucesso na construção de vetores derivados do plasmídeo 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, devem-se 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 promovem a excisão e o transporte do T-DNA. Conclui-se, então, que o desenvolvimento de vetores baseados no sistema *Agrobacterium* requer as extremidades da direita e esquerda do T-DNA conservadas, mantendo intacta a região *vir*, entretanto os oncogenes devem ser 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 modificadas geneticamente 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 da 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 *A. fumigatus* por integração aleatória ou sítio-dirigida do DNA transformante (T-DNA), verificando-se que a frequência de transformação foi maior que 100 transformantes/10⁷ esporos/ mL (SUGUI *et al.*, 2005). Os fungos *Coniothyrium minitans* (LI-MOXIAO *et al.*, 2005), *Colletotrichum trifolii* (TAKAHARA *et al.*, 2004), *Colletotrichum lagenarium* (TSUJI *et al.*, 2003) e *Botrytis cinerea* (ROLLAND *et al.*, 2003) foram também eficientemente transformados com *A. tumefaciens*.

A proteína verde fluorescente, GFP (*green fluorescent protein*), tem sido utilizada como repórter e marcador em procariotos e eucariotos (CHALFIE *et al.*, 1994; CUBITT *et al.*, 1995). A 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, sugere que esta pode ser útil como repórter em outros fungos. MAOR *et al.* (1998) utilizaram a 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 e, ainda, seguir a trajetória do fungo dentro das folhas de milho.

3.3 Antagonismo de microrganismos endofíticos e o controle biológico

Segundo BETTIOL (1991), doença é o resultado da interação entre o hospedeiro, o patógeno e eventualmente diversos microrganismos que habitam o sítio de infecção, e o ambiente. Alguns destes micro-organismos apresentam potencial para limitar a atividade do patógeno ou aumentar a resistência do hospedeiro. Para o autor, os componentes do controle biológico são o patógeno, o hospedeiro e os antagonistas, sob a influência do ambiente, todos interagindo num sistema biológico.

COOK e BAKER (1983) definem controle biológico como “a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem”. O controle biológico baseia-se na relação antagônica entre microrganismos e fitopatógenos, podendo ser caracterizado por diferentes modos de atuação como: antibiose, predação, indução de resistência da planta hospedeira, micoparasitismo, produção de enzimas e toxinas, colonização sistêmica da planta hospedeira, competição de nutrientes e sítios de colonização e liberação de enzimas hidrolíticas que atuam na degradação da parede celular (BETTIOL, 1991; MELO e AZEVEDO, 1998).

Atualmente diversos microrganismos são utilizados como agentes no controle de fungos fitopatogênicos, entre eles destacam-se espécies dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Pythium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Streptomyces*, entre outros (MELO e AZEVEDO, 1998).

Os testes de seleção de microrganismos com potencial para o controle biológico podem ser realizados *in vitro* e *in vivo*, em condições controladas ou em condições naturais, sendo os métodos complementares. Os principais métodos de

seleção de microrganismos *in vitro* descritos são: pareamento de culturas, papel celofane, placa sobreposta, líquido metabólico, etc. (MARIANO, 1993). A seleção de microrganismo *in vivo* é realizada através da aplicação do antagonista, seguida da inoculação do patógeno no hospedeiro por meio de pulverização de suspensão de células, imersão de raízes, ferimentos, dentre outros (MELO e AZEVEDO, 1998).

O termo antagonista emprega-se aos agentes biológicos com potencial para interferir nos processos vitais dos fitopatógenos. Desta forma, o nicho ecológico ocupado pelos endófitos favorece o controle biológico, pois neste local podem competir por nutrientes e espaço com os patógenos, bem como produzir substâncias tóxicas a estes organismos ou, ainda, induzir a planta a desenvolver resistência às doenças. Após o isolamento e seleção de um antagonista, o emprego de microrganismo como agente de controle biológico de fitopatógenos ocorre principalmente por meio do tratamento das sementes, do solo, das partes aéreas das plantas e pós-colheita. (MELO e AZEVEDO, 1998).

A seleção de antagonistas baseia-se em evidências de que o organismo candidato interfere, de algum modo, no desenvolvimento do patógeno. Tal interferência implica na destruição ou inibição deste, podendo ser avaliada primeiramente *in vitro* e depois *in vivo*, conforme descreve RUBINI *et al.* (2005). O grupo isolou fungos endofíticos do cacau (*Theobroma cacao* L.) e realizou testes de antagonismo contra o patógeno *Crinipellis perniciosa*, agente causador da doença “Vassoura da Bruxa”, fator limitante na produção do fruto nas Américas. Ainda em relação a *C. perniciosa*, DE MARCO, IGLIS-VALADARES e FELIX (2003) descreveram a produção de enzimas hidrolíticas produzidas por cepas do gênero *Trichoderma*, importantes no controle deste fitopatógeno. MARTINS-CORDER e MELO (1998) realizaram diferentes testes de antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *Verticillium dahliae* KLEB, demonstrando ampla capacidade antagonista. A secreção de metabólitos tóxicos por *Trichoderma* spp. promoveu a degradação das hifas hospedeiras, inibindo o desenvolvimento de *V. dahliae*. Segundo os autores, os mecanismos de controle biológico podem ocorrer ao longo do processo de vida do antagonista, os quais se sobrepõem e prejudicam a vida dos competidores. BARBOSA *et al.* (2001) investigaram o antagonismo entre espécies de *Trichoderma* contra *Cladosporium herbarum*, causador de verrugose em frutos de maracujá. SHALINI, LATA e KOTASTHANE (2006) demonstraram a atuação de isolados de *Trichoderma* contra *Rhizoctonia solani*, onde a hifa se enrola sobre as estruturas

vegetativas do patógeno, penetra, causa a lise e, conseqüentemente, morte do patógeno.

ARNOLD *et al.* (2003) comprovaram o antagonismo entre fungos endofíticos do cacauero e o fitopatógeno *Phytophthora infestans*. Fungos endofíticos foram isolados de árvores de cacaueros e inoculados em mudas cultivadas em ambiente estéril. Posteriormente, nas mesmas mudas foi inoculado o fitopatógeno. Surpreendentemente, mudas inoculadas com os endófitos tiveram apenas uma pequena ocupação do fitopatógeno em suas folhas. Tal fato comprovou que a interação entre os microrganismos endofíticos e o hospedeiro tem efeito negativo sobre o fitopatógeno, resultando na inibição do seu crescimento.

O antagonismo entre microrganismos foi relatado em diversos trabalhos (LINHARES *et al.*, 1995; MARTINS-CORDER e MELO, 1998; MOURA e ROMEIRO, 1999; ETHUR, CEMBRANEL e SILVA, 2001; AMORIM e MELO, 2002; MOREIRA *et al.*, 2002; MONTEALEGRE *et al.*, 2003; KUPPER, GIMENES-FERNANDES e GOES, 2003; ETHUR *et al.*, 2005).

Em função dos prejuízos causados por *G. citricarpa* aos frutos cítricos são imprescindíveis a realização de estudos que dêem ênfase ou suporte ao controle biológico da doença. FIALHO (2004) avaliou *in vitro*, o potencial de linhagens de *S. cerevisiae* como agentes no controle biológico contra *G. citricarpa*, em frutos cítricos na fase de pós-colheita. RODRIGUES (2006) avaliou os fungicidas usados em campo para controle da doença: piraclostrobina e carbendazim, a fim de verificar o efeito da pressão de seleção causada pelo uso contínuo destes compostos. No mesmo trabalho, avaliou as atividades celulolíticas e quitinolíticas de 96 isolados de fungos filogeneticamente distintos para a seleção de potenciais agentes de controle biológico. Quatro isolados que apresentaram maior atividade de cada uma destas enzimas, além de duas linhagens de *Trichoderma*, foram capazes de atuar *in vitro*, como biocontroladores do fitopatógeno. CARDOSO-FILHO (2003) avaliou a viabilidade do emprego de indutores de resistência conferido por *S. cerevisiae*, Bion[®] e ácido salicílico ao fitopatógeno *G. citricarpa*. Segundo o autor, os compostos presentes no albedo (mesocarpo) dos frutos de laranja, como a celulose, carboidratos solúveis, pectinas, compostos fenólicos (flavonóides), aminoácidos e vitaminas podem exibir a ação antimicrobiana e conseqüente controle da MPC. O autor avaliou os extratos produzidos pelo albedo da laranja e comprovou, a

depender da concentração dos extratos, ação fungicida ou fungistática, inibindo a germinação, esporulação e crescimento micelial *in vitro*, de *G. citricarpa*.

A importância das espécies de *Xylaria* spp. é notada em seu potencial no controle biológico de micro-organismos, tanto por sua produção de substâncias antifúngicas, quanto sua capacidade de combate a outros organismos que prejudicam as plantas, como os insetos (AZEVEDO, 2000).

Figueiredo (2006) obteve dois isolados endofíticos pertencentes ao gênero *Xylaria* a partir de espinheira-santa (*M. ilicifolia* Mart. ex. Reiss) e verificou que seus metabólitos secundários promovem inibição do crescimento de *G. citricarpa in vitro*, sugerindo o uso desse fungo como controlador biológico do fitopatógeno. Espécies do gênero *Xylaria* foram documentadas como endofíticos em coníferas, monocotiledôneas, dicotiledôneas, samambaias e licopsidas (BRUNNER E PETRINI, 1992). Liers *et al.* (2007), caracterizaram a produção de lacase por fungos deste gênero. Tal enzima é envolvida em processos fisiológicos de fungos, incluindo fitopatogenicidade. A semelhança de sua associação vascular com micorrizas tem levado alguns a classificá-los como mutualistas, embora a natureza da simbiose não seja bem compreendida (READ *et al.*, 2000).

O gênero *Xylaria* é constituído por um grupo de fungos relatados como endofíticos em uma grande variedade de plantas, como cana-de-açúcar (STUART, 2010), candeia (MAGALHÃES, 2008), gengibre (BUSSABAN, 2001), macieira (CAMATTI-SARTORI *et al.*, 2005), cacau (RUBINI *et al.*, 2005), café (SANTAMARIA E BAYMAN, 2005), *Himatanthus sucuuba* (MAGALHÃES, 2001) e *Palicourea longiflora* (SOUZA *et al.*, 2004). Cafêu *et al.* (2005) demonstraram a produção de antifúngicos com capacidade para uso terapêutico por isolados endofíticos de *Xylaria* sp.

3.3 Compatibilidade Vegetativa

Os fungos filamentosos reproduzem-se sexuada ou assexuadamente, e suas hifas possuem a capacidade de fundir-se, através de um processo denominado anastomose. Este processo permite a comunicação entre os compartimentos das mesmas e também que os núcleos passem livremente de uma unidade micelial para outra, formando um heterocário, ou seja, um citoplasma comum que apresenta dois

ou mais núcleos geneticamente distintos (GLASS, JACOBSON e PATRICK, 2000; ESPOSITO e AZEVEDO, 2004). A formação do heterocário consiste na etapa inicial do ciclo parassexual e em processos de recombinação sexual (DEBETS, 1998; DI PRIMO, CARTIA, KATAN, 2001).

Os processos de recombinação meiótica e mitótica, que ocorrem, respectivamente, nos ciclos sexual e parassexual, constituem fontes de variabilidade genética entre os fungos. Através da heterocariose, os núcleos diplóides, formados entre linhagens compatíveis, podem sofrer recombinação mitótica, ampliando a variabilidade genética (CORRELL *et al.*, 1989). PONTECORVO *et al.* (1953) descreveram a ocorrência do ciclo parassexual em *A. nidulans*, demonstrando que a recombinação genética em fungos não é restrita ao ciclo sexual. A parassexualidade inicia-se pela anastomose de hifas entre as linhagens de genótipo distinto, resultando na formação do heterocário. A existência de dois núcleos distintos em um mesmo citoplasma possibilita a fusão de núcleos haplóides, originando assim, um núcleo diplóide heterozigoto. Durante a multiplicação deste núcleo, os processos de *crossing-over* mitótico e/ou não-disjunção cromossômica poderão ocorrer, originando, após sucessivos estágios de aneuploidia, núcleos haplóides recombinantes. Desta forma, assim como no ciclo sexual, a recombinação intracromossômica (*crossing-over*) e intercromossômica (não-disjuncional) poderá ocorrer no ciclo parassexual (DEBETS, 1998).

A grande maioria dos fungos filamentosos é capaz de formar heterocários intraespecíficos. Entretanto, um fungo individualizado é limitado a formar um heterocário com outro fungo de constituição genética similar, devido a um mecanismo genético denominado incompatibilidade vegetativa, ou somática, ou incompatibilidade de heterocário (WORRALL *et al.*, 1997; DEBETS, 1998). Tal mecanismo impõe uma barreira nos organismos geneticamente semelhantes, contribuindo para a conservação da variabilidade genética da população (LESLIE, 1996). O sistema de incompatibilidade vegetativa em fungos é controlado pelos loci *vic* (incompatibilidade vegetativa) ou *het* (incompatibilidade do heterocário) e diz-se que dois isolados pertencem ao mesmo Grupo de Compatibilidade Vegetativa (GCV) quando apresentam identidade alélica para estes loci (PUHALLA, 1985; LESLIE, 1996; DEBETS, 1998). Em fungos de reprodução assexual, membros de um mesmo GCV apresentam maior similaridade genética do que membros de diferentes GCVs. A similaridade pode ser avaliada pelas características de virulência e patogenicidade

(LESLIE, 1996). A compatibilidade vegetativa entre fungos de uma mesma espécie é definida como a habilidade de quaisquer duas linhagens formarem micélios heterocarióticos entre si. Tais linhagens são classificadas como membros de um mesmo grupo de compatibilidade vegetativa. A caracterização de indivíduos através dos GCVs pode ser utilizada na subdivisão de uma espécie em populações distintas de fungos filamentosos, tais como *F. oxysporum* e *F. solani* (PUHALLA, 1985; OLIVEIRA e COSTA 2003) e do Complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado a sementes de algodão (ROCA *et al.*, 2004). A fusão de hifas, ou anastomose, entre membros de diferentes GCVs é seguida pela morte do heterocário relacionada a um processo lítico, por um mecanismo pouco compreendido até o momento (LESLIE, 1993; BEEVER e PARKES, 2003).

Segundo Azevedo (1998), o estudo da anastomose de hifas é importante para compreensão da variabilidade genética apresentada por um determinado patógeno. Os mecanismos de variabilidade genética destes microrganismos têm sido responsáveis pela quebra da resistência do hospedeiro e pela emergência de uma nova raça do patógeno. Com o intuito de se ampliar os conhecimentos sobre a constituição genética dos fungos fitopatogênicos, estudos envolvendo técnicas clássicas e moleculares têm sido conduzidos na tentativa de se estabelecer medidas de controle para os danos causados por estes microrganismos na agricultura.

4. CAPÍTULO I: TRANSFORMAÇÃO DE *Guignardia citricarpa* MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens*

Journal of Microbiological Methods 80 (2010) 143–147



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth



Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*

J.G. Figueiredo^{a,1}, E.H. Goulin^{a,2}, F. Tanaka^{a,2}, D. Stringari^{a,3}, V. Kava-Cordeiro^{a,3}, L.V. Galli-Terasawa^{a,4}, C.C. Staats^{b,5}, A. Schrank^{b,6}, C. Glienke^{a,*}

^a UFPR, Department of Genetics, Curitiba, PR, Brazil

^b UFRGS, Biotechnology Center, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 September 2009

Received in revised form 21 November 2009

Accepted 29 November 2009

Available online 6 December 2009

Keywords:

Agrobacterium-mediated transformation

Guignardia citricarpa

Citrus Black Spot

Ammonium glufosinate resistance

GFP expression

ABSTRACT

Guignardia citricarpa, the causal agent of Citrus Black Spot, was successfully transformed via *Agrobacterium tumefaciens* with cassettes for *gfp* and bar expression. Transformation is essential to understand the role of genes during interaction between plants and its pathogens. Using a binary plasmid vector based in the pPZP201BK, both germinated conidia and physically fragmented hyphae of *G. citricarpa* were transformed. Eight independent transformants of *G. citricarpa* resistant to ammonium glufosinate displayed GFP fluorescence. The majority (93.75%) of the *G. citricarpa* transformants was mitotically stable and contained a single T-DNA copy ectopically integrated to the chromosome. This is the first report of *G. citricarpa* transformation and will allow future work on virulence determinants of the fungus and possibly its control.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Guignardia citricarpa (anamorph: *Phyllosticta citricarpa*) is the causal agent of Citrus Black Spot (CBS), an A1 quarantine disease for

countries of the European Union and for the USA (Wulandari et al., 2009). It affects practically all citrus species of economic importance, especially sweet oranges (*Citrus sinensis*). Currently, CBS is reported in Africa, Asia, Oceania and South America. In some of these countries, CBS is one of the most important fungal diseases. Two morphologically very similar *Guignardia* spp. are associated to citrus plants: *G. citricarpa* (anamorph: *Phyllosticta citricarpa*) and *G. mangiferae* (anamorph: *P. capitalensis*) (Baayen et al., 2002; Glienke-Blanco et al., 2002; Stringari et al., 2009). However, only *G. citricarpa* causes CBS (Baldassari et al., 2008) in spite of the fact that both *G. citricarpa* and *G. mangiferae* can be isolated from the leaves of citrus plants (Baldassari et al., 2008). Baldassari et al. (2008) showed that *G. mangiferae* can also be isolated from citrus fruit affected by CBS. Nevertheless, these isolates are opportunists and they are considered negative for pathogenicity (Baldassari et al., 2008).

In spite of the importance of the disease and the long time that CBS has been associated with *G. citricarpa*, there is still considerable lack of information about this pathosystem. The lack of an efficient transformation system for *G. citricarpa* is detrimental to the progress of the characterization of genes involved in the pathogenicity of this fungus.

Currently, transformation methods for filamentous fungi involve isolation of protoplasts and introduction of an exogenous DNA through electroporation, fusion by polyethylene glycol or calcium chloride treatment followed by heat shock. Intact cells can be transformed using biolistics (Armaleo et al., 1990). A strategy initially developed for plants uses *Agrobacterium tumefaciens* to transform filamentous fungi (Groot et al., 1998; Covert et al., 2001). *A. tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) led to the further expansion of the range of fungal species that could be transformed (Michielse et al., 2005).

* Corresponding author. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, P.O. Box 19071-81531-990, Curitiba, PR, Brazil. Tel.: +55 41 33611562; fax: +55 41 33611793.

E-mail addresses: jo.gomesfigueiredo@gmail.com (J.G. Figueiredo),

eduardo_goulin@yahoo.com.br (E.H. Goulin), fertanaka02@yahoo.com.br (F. Tanaka), danystringari@gmail.com (D. Stringari), vankava@ufpr.br (V. Kava-Cordeiro), lterasawa@ufpr.br (L.V. Galli-Terasawa), staats@cbiot.ufpr.br (C.C. Staats), aschrank@cbiot.ufpr.br (A. Schrank), cglienke@ufpr.br (C. Glienke).

¹ Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, P.O. Box 19071, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil. Tel.: +55 41 3611731; fax: +55 41 33611793.

² Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Centro Politécnico, s/ n°, P.O. Box 19071, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil. Tel.: +55 41 3611731; fax: +55 41 33611793.

³ Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Centro Politécnico, s/ n°, P.O. Box 19071, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil. Tel.: +55 41 3611557; fax: +55 41 33611793.

⁴ Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Centro Politécnico, s/ n°, P.O. Box 19071, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil. Tel.: +55 41 3611772; fax: +55 41 33611793.

⁵ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Bloco IV, Prédio 43421, Laboratório 205 Agronomia 91509-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Caixa-Postal: 15005. Tel.: +55 51 33167767; fax: +55 51 33167309.

⁶ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Campus do Vale UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500 Agronomia, 91501970 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33166071; fax: +55 51 33167309.

The development of a reliable and efficient transformation system for *G. citricarpa* is important for the elucidation of gene function related to pathogenicity and virulence, in turn opening up the possibility of targeted molecular improvements for the purpose of biological control.

In the present study we report for the first time an efficient protocol for the ATMT of *G. citricarpa*. This transformation approach represents a useful tool for genomic studies in *G. citricarpa*.

2. Methods

2.1. Strains and growth conditions

The *G. citricarpa* LGMF06 wild-type strain was isolated from CBS lesions in São Paulo, Brazil, and tested for pathogenicity according to Baldassari et al., 2008. Strains were stored in Citrus Medium Fabris-Nishimura (CFN) (28 g l⁻¹ of citrus leaves, 20 g l⁻¹ glucose, 15 g l⁻¹ agar, adjusted to pH 5.8 with HCl) and are currently part of the biological bank of the Laboratory of Microorganisms (LabGeM) at the Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil. *A. tumefaciens* strain EHA 105 harboring the appropriate binary vectors (Fig. 1) *A. tumefaciens* EHA105 strain was a kind gift from G. Pasquali (Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul) and was grown at 28 °C and maintained in Luria-Bertani medium (10 g l⁻¹ tryptone, 5 g l⁻¹ yeast extract, 5 g l⁻¹ NaCl).

2.2. *A. tumefaciens*-mediated transformation

A. tumefaciens-mediated transformation of *G. citricarpa* LGMF06 was carried out as previously described (Covert et al., 2001; Reis et al., 2004; Staats et al., 2007) with modifications. *A. tumefaciens* strain EHA-105 harboring the appropriate binary vectors (Fig. 1) was grown at 28 °C for 24 h at 180 rpm in liquid LB medium supplemented with 50 µg kanamycin ml⁻¹. The culture was diluted to OD₆₆₀ of 0.15 in 20 ml of IM medium amended with 200 µmol l⁻¹ acetosyringone (AS). Cells were grown under the same conditions to reach OD₆₆₀ of 0.6. *G. citricarpa* (LGMF06) was grown on CFN medium, pH 5.8 at 28 °C for 7–10 days; conidia and mycelium were harvested from the growing colonies and placed in tubes containing 2 ml of saline solution. After homogenization, the solution was incubated at 40 °C for 5 min. Co-cultivation between *A. tumefaciens* and conidia and mycelia of *G. citricarpa* was performed by adding 100 µl of bacterial culture to 100 µl of fungal conidia suspension (1 × 10⁸ conidia ml⁻¹). The mix was plated onto membranes of cellulose (90-mm diameter) on a co-cultivation medium (IM) (10 mM K₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, 2.5 mM NaCl, 2 mM MgSO₄, 0.7 mM CaCl₂, 9 mM FeSO₄, 4 mM

NH₄SO₄, 10 mM glucose, 40 mM 2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid, pH 5.3, 0.5% glycerol (w/v),) with or without 200 µmol l⁻¹ AS. Following co-cultivation at 28 °C for 48 h, 5 ml of molten CM agar (same as IM, except containing 5 mM instead of 10 mM glucose) and Citrus FN supplemented with 100 µg ammonium glufosinate ml⁻¹ and 200 µg cefatoxim ml⁻¹ were poured over the plates as an overlay. Molten CM agar was used to select fungal transformants, and CFN was supplemented with 100 µg ammonium glufosinate ml⁻¹ and 200 µg cefatoxim ml⁻¹ to inhibit *A. tumefaciens* growth. Each putative transformant was transferred to CM or CFN agar along with 100 µg ammonium glufosinate ml⁻¹ and incubated as described.

2.3. Transgene stability in the *G. citricarpa*

All transgenic isolates from agro-transformed *G. citricarpa* were propagated on M-100 (10 g l⁻¹ glucose, 3 g l⁻¹ KNO₃, 62.5 ml⁻¹ M-100 Salt Solution, 1.5% agar) or CFN medium in absence of ammonium glufosinate. Plates were incubated at 28 °C for 7 days. This procedure was repeated three times. Fungal colonies were then transferred to selective media and their growth rate evaluated.

2.4. Expression analysis of reporter GFP

The green fluorescence emission associated with GFP was detected using a Leica UV microscope (DMKLB or MZFL111) with the following filter settings: 488 nm excitation and 515 nm emission. Images were recorded and processed using Picasa 3.1.0 software.

2.5. PCR assays

For the detection of the transgenes in *G. citricarpa* by PCR, total DNA was extracted from mycelium grown on CFN medium for three days at 28 °C. The mycelium was harvested, lyophilized for 24 h and ground with mortar and pestle under liquid nitrogen. Genomic DNA was obtained according to the methods described by Raeder and Broda (1985), and modified by Glienke-Blanco et al. (2002). The reaction of 49 putative transformants was performed on a thermocycler (Mastercycler, Eppendorf) using primers barR (TCAGATCTC-GACGGG) and barF (ATGAGCGAACGACGC). The reaction was carried out using 50 ng of *G. citricarpa* total DNA, 3 mM MgCl₂, 4 µM of each primer, 0.2 mM of each dNTP (Invitrogen®), 1 × PCR buffer, and 1.5 units of Taq polymerase (Invitrogen®). PCR conditions were as follows: 94 °C, 30 s; 60 °C, 30 s and 72 °C, 45 s, for 30 cycles. PCR products were resolved by electrophoresis on a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized under UV light

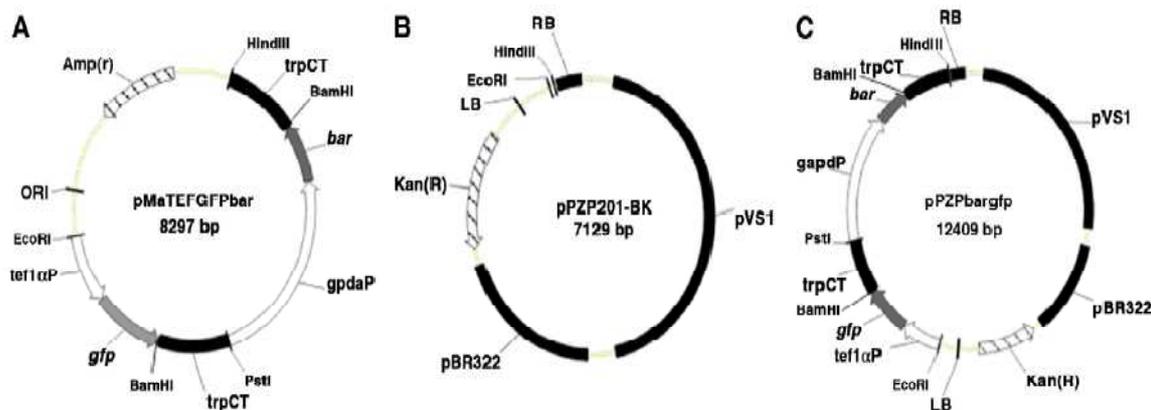


Fig. 1. Construction of pPZPbarGFP. The *gfp* and *bar* expression cassette was obtained by subcloning an EcoRI–HindIII restriction fragment from pMaTEFGFPbar (A – Nakazato et al., 2006) into the binary vector pPZP201-BK (B – Covert et al., 2001). The pPZPbarGFP (C) plasmid T-DNA contains an ammonium glufosinate resistance gene (*bar*) expression cassette (*Aspergillus nidulans* *gpdA* promoter and *trpC* terminator) and a *gfp* expression cassette (*Metarhizium anisopliae* *tef* promoter and *A. nidulans* *trpC* terminator) between its left and right borders.

Table 1
Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *G. citricarpa* LGMF06 to ammonium glufosinate resistance, mitotic stability and PCR analysis.

	<i>G. citricarpa</i>	LGMF06
Number of transformants*	M-100	CFN
+ AS	14	16
– AS	00	00
Percentage of mitotically stable transformants	42.85	93.75
PCR analysis with amplification of gene bar	6	15
Percentage of putative transformants confirmed by PCR	85.7	93.75

*AS: acetosyringone. (+ AS) AS present medium; (– AS) AS-absent medium.

(Ultraviolet Benchtop transilluminators) and photographed (Digi doc it software).

2.6. Southern blot analysis

Purified genomic DNA (10 µg) of individual transformants and wild-type strain were digested with BamHI, EcoRI or PstI, resolved on 1% agarose gel and capillary blotted onto Amersham Hybond-N+ membrane (Buckinghamshire, UK) using standard techniques (Sambrook and Russel, 2001). Probe labeling, hybridization, stringency washes and detection were carried out under conditions recommended by Amersham Genes Images Alkphos Direct Labeling CPD Star Detection kit (GE Healthcare, USA). Using a 600 bp DNA probe obtained of PCR product with specific primers barR and barF.

3. Results

In order to determine the minimum inhibitory concentration *G. citricarpa* mycelium and conidia were grown on PDA at concentrations 50, 75, 100, 150 and 200 µg ammonium glufosinate ml⁻¹. The

concentration of 100 µg ammonium glufosinate ml⁻¹ was found to completely suppress growth (data not shown) and was used to select the transformants.

A. tumefaciens harboring the pPZPbar-gfp binary plasmid efficiently transferred T-DNA to cells as shown by active fungal cell growth on selective culture medium. Ammonium glufosinate-resistant mycelia cells were obtained only when the bacterial culture was induced with acetosyringone (Table 1). The confirmation of transformation was done by PCR, in which an amplicon of 550 bp, representing the bar gene sequence, was obtained (Fig. 2, panel A) using as template DNA extracted from seven day old cultures of the transformants and wt strain. All *G. citricarpa* LGMF06 transformants recovered from CFN medium and 85.7% transformants from M-100 medium yielded the predicted amplicon (Table 1). As shown by control assays, the wild-type strain failed to amplify the bar gene.

Genetic stability of transgenic *G. citricarpa* was evaluated by propagating fungi without selective pressure for 3 months, and then grown in the presence of ammonium glufosinate (100 µg ml⁻¹). Detection of the transgene in previously transformed cells failed in only one out of sixteen tested fungal colonies on CFN medium (Table 1) indicating a high mitotic stability. However, the most important factor observed in CFN medium was the transformant's growth rate. In M-100 medium, colonies had reached a size of approximately 1 cm in diameter after 21 days, while those grown in CFN medium reached the same size in approximately 5–7 days (data not shown). The high growth rate exhibited by transformants in CFN medium made it possible to obtain a more efficient mycelia production for both total DNA extraction and maintenance.

These transgenic isolates were then tested for the presence of the T-DNA insertion by Southern blot analysis. Genomic DNA was digested with BamHI, EcoRI or PstI restriction enzymes (Fig. 2B, C, D) and blots were probed with a fragment of the 600 bp bar gene generated by PCR of the pPZPbar-gfp binary plasmid. As shown in Fig. 2, panels B, C and D,

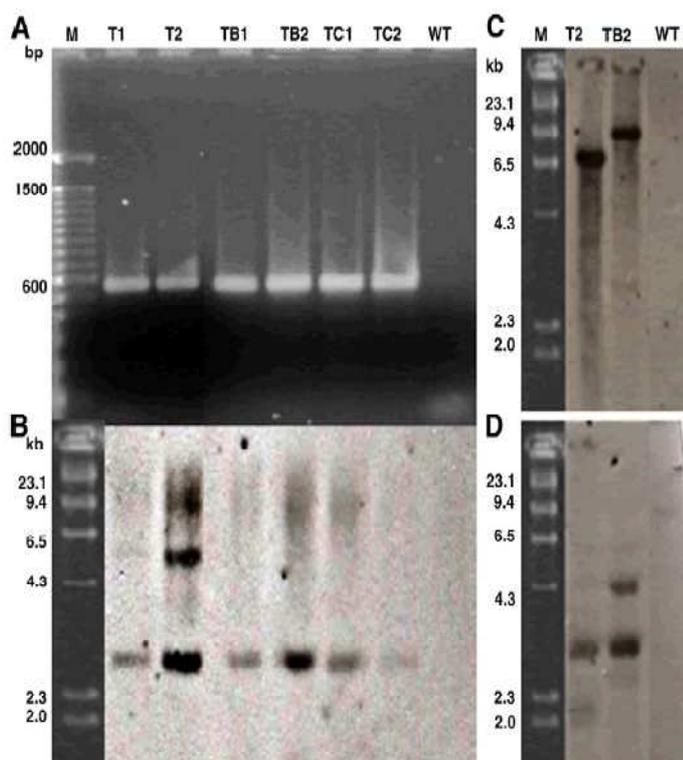


Fig. 2. Detection of *G. citricarpa* transformants. Analysis of wild-type strain LGMF06 (wt) and *G. citricarpa* transformants obtained by ATMT. (A) bar gene amplicon of wt and 8 independent transformants. (B, C, D) Southern blot analysis performed on the wt and 8 independent transformants. Genomic DNA was digested with BamHI (B), EcoRI (C) or PstI (D) and hybridized with bar gene probe. (B) Lanes 2–8 (T1, T2, TB1, TB2, TC1 and TC2): Putative transformants obtained on M-100 medium. (C and D) T2 and TB2 transformants obtained on M-100 medium. M, molecular size markers: 100 bp DNA Ladder (A) or HindIII digest of lambda DNA (B, C and D) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) is indicated on the left.

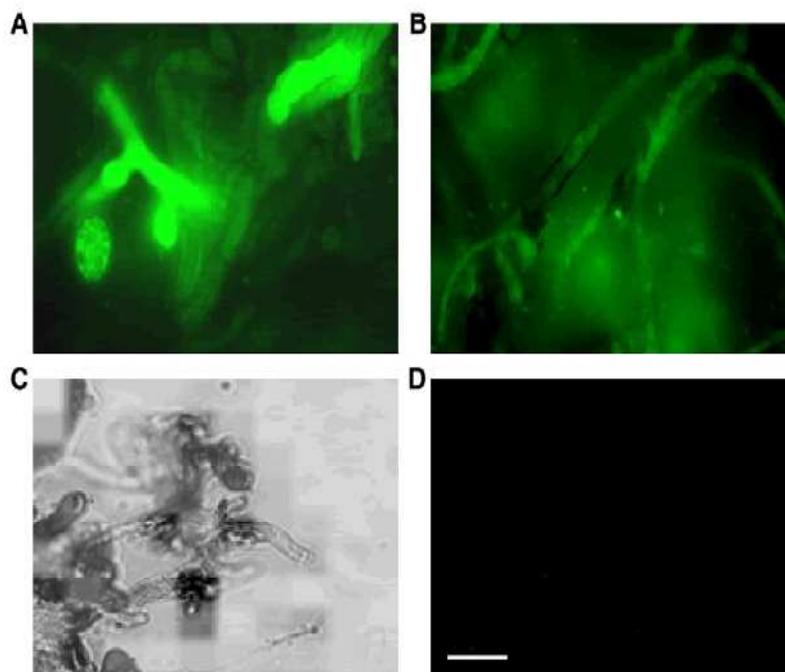


Fig. 3. GFP fluorescence from *G. citricarpa* transformants. Fluorescence of *G. citricarpa* LGMP06 transformant obtained after ATMT with pPZbargfp (A, B), showing spores and mycelia under green light excitation. Bright-field and fluorescence microscopic images of wild-type *G. citricarpa* mycelia (C, D). Scale bar – 10 μ m.

bands of different sizes were detected in independent transformants, indicating random insertion of the T-DNA into the fungal genome. We observed a complex integration pattern of T-DNA in some transformants. Based on hybridization signals of T2 DNA digested with BamHI (Fig. 2B), at least two copies of the T-DNA are integrated in the genome of the transformant. One of the copies possibly harbors a truncated transformant DNA that eliminates the BamHI site in the T-DNA that renders a higher size hybridization signal than the fragment flanked by the BamHI sites within the T-DNA. A multiple integration pattern is corroborated by a more intense hybridization signal in the blots from T2 DNA digested with EcoRI and PstI (Fig. 2C and D, respectively).

Transgenic fungi obtained by Agro-transformation were also analyzed to determine GFP expression and its accumulation in mycelia (Fig. 3). Wild type and transformed mycelium were examined using Epifluorescence microscopy. GFP-associated green fluorescence was present in mycelia and conidia (Fig. 3, panel A and B). No green fluorescence was detected in wild-type *G. citricarpa* (Fig. 3, panel D).

4. Discussion

ATMT has been successfully applied to a variety of different fungal species and systems during the last decade due to its technical simplicity and efficiency (Michielse et al., 2005). The main objective of this work was to establish an efficient system for *A. tumefaciens*-mediated transformation (AIMT) for *G. citricarpa*. An efficient transformation system is an essential tool for gene manipulation and to study the functional genomics of *G. citricarpa*, which is an important pathogen of citrus worldwide. This is the first report of *G. citricarpa* DNA-transformation. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for *G. citricarpa* was developed after some modifications. First, conidia of *G. citricarpa* LGMP06 strain were submitted to 40 °C for 5 min before co-cultivation. Such procedure increased the germination rate facilitating the interaction between the bacteria and fungal germlings. Second, the culture medium pH was changed to 5.8, since this is the optimum pH for *G. citricarpa* growth. And third, after co-cultivation between *G. citricarpa* and *A. tumefaciens*, selective medium was added to the membranes instead of

transferring them to the selective medium. These changes significantly contributed for the success of agro-transformation.

The transformant mycelia cells were obtained only when the bacterial culture was induced with acetosyringone – AS (Table 1). This is consistent with earlier reports that show the essential role of AS for fungal transformation (Michielse et al., 2008; Wang and Li, 2008; Yang et al., 2007; Reis et al., 2004; Mullins and Kang, 2001; Chen et al., 2002; Groot et al., 1998). Given the requirement of AS for *A. tumefaciens* to transform both plants and fungi, it was speculated that *A. tumefaciens* uses a similar mechanism to transform in both systems (Groot et al., 1998).

Despite frequency of transformation to be low (14–16 transformants/ 10^6 spores) the transformation system mediated by *A. tumefaciens* may prove to be a powerful tool to achieve filamentous fungi transformation and functional genomics studies, due to the simplicity of T-DNA integration and genetic stability of the transformants. Considering the efficiency of the ATMT protocol described, this approach would represent a useful way to study genetics in *G. citricarpa* regarding gene knock-out and analysis of genes with known functions (Duarte et al., 2007; Massart and Jijakli, 2007).

Mitotic stability analysis showed that the transformants tested remained mitotically stable, maintaining their resistance conferred by the *bar* gene after being cultured in the absence of ammonium glutofosinate. This mitotic stability is consistent with T-DNA integration into chromosomal DNA and compares favorably with those obtained for several filamentous fungi using AMT (Covert et al., 2001; Rho et al., 2001; Fitzgerald et al., 2003; Meyer et al., 2003; Reis et al., 2004). In addition, the transformants were able to express GFP fluorescence as a result of stable mRNA synthesis and translation.

Therefore we show here the feasibility of ATMT transformation protocol to the important citrus pathogen *G. citricarpa* that opens the possibility of gene function studies to determine pathogenicity determinants.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq, Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/UFPR–Brazil, FAPESP and FUNDECITRUS.

References

- Armaleo, D., Ye, G.N., Klein, T.M., Shark, K.B., Sanford, J.C., Johnston, S.A., 1990. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Curr. Genet.* 17, 97–103.
- Baayen, R.P., Bonants, P.J.M., Verkley, G., Carroll, G.C., van der Aa, H.A., de Weerd, M., van Brouwershaven, I.R., Schutte, G.C., Maccheroni Jr., W., Glienke de Blanco, C., Azevedo, J.L., 2002. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of wood plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitataensis*). *Phytopathology* 92, 464–477.
- Baldassari, R.B., Wickert, E., DE Goes, A., 2008. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from *Citrus* spp. *Eur. J. Plant Pathol.* 120, 103–110.
- Chen, X., Stone, M., Schlaghauser, C., Romaine, C.P., 2002. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4510–4513.
- Covert, S.F., Kapoor, P., Lee, M., Briley, A., Naim, C.J., 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycol. Res.* 105, 259–264.
- Duarte, R.T.D., Staats, C.C., Fungaro, M.H.P., Schrank, A., Vainstein, M.H., Furlaneto-Maia, I., Nakamura, C.V., Souza, W., Furlaneto, M.C., 2007. Development of a simple and rapid *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *lett Appl. Microbiol.* 44, 248–254.
- Fitzgerald, A.M., Mudge, A.M., Gleave, A.P., Plummer, K.M., 2003. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. *Mycol. Res.* 107, 803–810.
- Glienke-Blanco, C., Aguilar-Vildoso, C.I., Vieira, M.L.C., Barroso, P.A.V., Azevedo, J.L., 2002. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. *Genet. Mol. Biol.* 25, 251–255.
- Groot, De M.J.A., Bunnick, P., Hooykaas, P.J.J., Beijersbergen, A.G.M., 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat. Biotechnol.* 16, 839–842.
- Massart, S., Jijakli, M.H., 2007. Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents: a review. *J. Microbiol. Meth.* 69 (10), 229–241.
- Meyer, V., Mueller, D., Strowig, T., Stahl, U., 2003. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. *Curr. Genet.* 43, 371–377.
- Michielse, C.B., Hooykaas, P.J.J., van den Hondel, C.A.M.J.J., Ram, A.F.J., 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*. *Nat. Protoco.* 3 (10), 1671–1978.
- Michielse, C.B., Hooykaas, P.J.J., van den Hondel, C.A.M.J.J., Ram, A.F.J., 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr. Genet.* 48, 1–17.
- Mullins, E.D., Kang, S., 2001. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. *Life Sci.* 58, 2043–2052.
- Nakazato, L., Dutra, V., Broetto, L., Staats, C.C., Vainstein, M.H., Schrank, A., 2006. Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the *tef1*-alpha homologous promoter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 521–528.
- Raeder, U., Broda, P., 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *lett. Appl. Microbiol.* 1, 17–20.
- Reis, M.C., Fungaro, M.H.P., Duarte, R.T.D., Furlaneto, L., Furlaneto, M.C., 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J. Microbiol. Methods* 58, 197–202.
- Rho, H.S., Kang, S., Lee, H.Y., 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Cells* 12, 407–411.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, vol. 6. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 39–47.
- Staats, C.C., Junges, A., Fitarelli, M., Furlaneto, M., Vainstein, Marilene H., Scharank, A., 2007. Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungus *Metarhizium anisopliae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 945–950.
- Stringari, D., Glienke, C., de Christo, D., Maccheroni Jr, W., Azevedo, J.L., 2009. High Molecular Diversity of the Fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae* and New Primers for the Diagnosis of the Citrus Black Spot. *Braz Arch Biotechnol.* 52 (n. 5), 1063–1073. September–October 2009. ISSN 1516-8913 Printed in Brazil.
- Wang, J., Li, H., 2008. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 9 (10), 823–828.
- Wulandari, N.F., To-anun, C., Hyde, K.D., Duong, L.M., de Gruyter, J., Meffert, J.P., Groenewald, J.Z., Crous, P.W., 2009. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov. the cause of Citrus tan spot of *Citrus maxima* in Asia. *Fungal Divers.* 34, 23–39.
- Yang, Q., Yang, L., Liu, P., Li, S., Song, J., 2007. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Trichoderma harzianum*. *KMITL Sci. Tech. J.* 7, 185–191.

5. CAPÍTULO II: ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Maytenus ilicifolia* NO CONTROLE DE *Guignardia citricarpa*

Josiane Gomes Figueiredo², Eduardo Henrique Goulin², Danyelle Stringari², Fabiana Tonial¹, Ida Chapaval Pimentel¹, Vanessa Kava Cordeiro²; Lygia Galli-Terasawa²; Juarez Gabardo² e Chirlei Glienke^{1 2}

¹ Universidade Federal do Paraná; Departamento de Patologia Básica, Cx Postal 81531-990; Curitiba- PR. ²LabGeM – Laboratório de Genética de Microrganismos; Departamento de Genética; Universidade Federal do Paraná; Cx Postal 19071; Curitiba- PR.

Abstract

Sixty-six endophytic fungi were isolated from leaves of the medicinal plant *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa), widely used in the treatment of stomach ulcers and other gastric problems. Isolates were grouped into morphospecies based on morphology and cultural characteristics. DNA sequence analysis of the internal transcribed spacer region (ITS1, 5.8S, ITS2), resolved six clades: *Colletotrichum* sp. / *Glomerella* sp. (16.5%), *Pestalotiopsis* sp. (6.5%), *Alternaria* sp. (1%), *Guignardia* sp. (1%), *Xylaria* sp. (1%) and *Phomopsis* sp. (1%). The others were separated into two groups: I and II, with colonization rates of 25.5 and 42% respectively. Antimicrobial activity of *Pestalotiopsis* sp., *Xylaria* sp and group I isolates were investigated. The strains of the genus *Xylaria* sp. (69JES and 70JES) showed antagonistic properties against the pathogen *G. citricarpa*; methanol extracts inhibited *in vitro* mycelial growth and production of pycnidia on leaves. Thin layer chromatography of these extracts revealed the presence of alkaloid and coumarin. The isolated 69JES was transformed via *Agrobacterium tumefaciens* with cassettes for GFP and BAR expression using a binary plasmid vector based in the pPZP201BK. This is the first report of the genus *Xylaria* endophytes isolated from a medicinal plant operating in the control of *G. citricarpa*. Promising results were obtained with the early elucidation of compounds and obtaining transformants. Transformation is essential to understand the role of genes during interaction between plants and its pathogens.

Keywords: Endophytic fungi, espinheira-santa, *Agrobacterium*-mediated transformation; *Guignardia citricarpa*; *Xylaria* sp.,

Este será submetido para publicação no periódico “Biological Control”.

5.1. Introdução

Todas as plantas estudadas até hoje são hospedeiras de micro-organismos endofíticos, estes se associam de forma mutualística, competindo com patógenos, diminuindo a herbivoria e o ataque de insetos, aumentando a tolerância a estresses abióticos e bióticos, protegendo as plantas e favorecendo seu crescimento, recebendo em contrapartida proteção e nutrientes do seu hospedeiro (Bacon e White, 2000; Azevedo et al. 2000; Sikora et al. 2007; Arnold e Lutzoni, 2007; Rodriguez et al. 2009). Na estreita relação entre endofíticos e a planta hospedeira pode ocorrer produção de metabólitos secundários que interferem de alguma forma no desenvolvimento de patógenos (Azevedo et al. 2000; Rodrigues et al. 2000; Bills, et al. 2002; Espósito e Azevedo, 2004; Schardl et al. 2004; Schulz et al. 2006; Backman e Sikora, 2008; Yu et al. 2010).

Atualmente, os fungos endofíticos de plantas medicinais são estudados na busca de novos metabólitos secundários potencialmente úteis. Destaca-se neste contexto a “espinheira-santa” (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss), planta medicinal nativa da América do Sul, encontrada principalmente na região Sul do Brasil, comumente destinada ao tratamento de úlceras no estômago e outros problemas gástricos (Figueiredo et al. 2007). A bioprospecção de micro-organismos ou seus metabólitos que atuem no controle de fungos fitopatogênicos como o fungo responsável pela doença Mancha Preta dos Citros (MPC), *G.citricarpa* Kiely, faz-se necessária, gerando o uso menor de fungicidas e possivelmente um controle mais eficiente da doença.

Sendo o Brasil detentor de um terço da produção mundial de citros e 85% da produção do suco da fruta, a citricultura representa uma das principais atividades do agronegócio brasileiro (Agrianual, 2009; Associtrus, 2010), é crescente o interesse na busca por fungos endofíticos e na descoberta de compostos bioativos que poderão ser utilizados como ferramentas no controle de fitopatógenos, em especial ao controle do fitopatógeno *G. citricarpa*.

O estudo genético deste fitopatógeno e suas associações endofíticas, era inviável devido à falta de um sistema de transformação genética para fungos deste gênero. Figueiredo et al. (2010), descreveram um sistema de agrotransformação para *G. citricarpa*, possibilitando a utilização de linhagens de transformantes em diferentes estratégias para o estudo de controle biológico e do entendimento da

interação planta-patógeno. Estudos de interação *in vivo* entre o agente causal da MPC e os isolados endofíticos são necessários para verificar o potencial destes no controle biológico e as interações que apresentam. Neste contexto, o presente estudo relata o isolamento, identificação, seleção de fungos endofíticos com capacidade de inibir *in vitro* o crescimento de *G. citricarpa*. Além da agrotransformação dos isolados com capacidade antagonista para futuros estudos de interação entre patógeno-antagonista.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Isolamento, identificação, obtenção de extratos metanólicos e cromatografia de camada delgada (CCD) de fungos endofíticos de *M. ilicifolia*

Os fungos endofíticos utilizados neste estudo foram isolados de folhas de *M. ilicifolia* (espinheira-santa), do Centro Nacional de Pesquisa de Floresta (CNPQ) da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) – Paraná/Brasil, utilizando a metodologia para isolamento de fungos endofíticos descrita por Petrini (1991). A taxa de colonização (TC) foi estimada usando a fórmula TC: número de fragmentos com um ou mais isolados / total de fragmentos da amostra, expressa em percentagem (Petrini et al.1992).

Os fungos isolados foram classificados por morfo-tipo como descrito por Arnold et al. (2000). Para identificação molecular o DNA genômico foi obtido de acordo com a metodologia descrita por Raeder e Broda (1985), modificada por Glienke-Blanco et al. (2002) e identificados com base na análise de sequenciamento da região ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA com os *primers* V9G (De Hoog et al. 2003) e ITS4 (White Jr. et al. 1990). As condições da reação foram realizadas seguindo protocolo de White et al. (1990), modificado por Stringari (2009). As sequências obtidas foram comparadas com outras sequências existentes no banco de dados do GenBank pelo programa BLAST (Altschul et al.1997). A análise filogenética foi realizada no *software* PAUP* 4.0 b10 (Swofford 1998).

Os isolados fúngicos com atividade inibitória do crescimento micelial contra *G. citricarpa* LGMF06 foram submetidos à extração de metabólitos, análise de

compostos em cromatografia em camada delgada (CCD) e à caracterização morfológica mais detalhada.

Para obtenção dos extratos, a fermentação foi realizada de acordo com bibliografia especializada (Rodrigues et al. 2000; Corrado e Rodrigues, 2004). Os filtrados da cultura foram extraídos com acetato de etila P.A. (AcOEt, Merck). Depois da rotaevaporação da fase orgânica o extrato bruto seco foi pesado e diluído em metanol (10 mg/ml).

O extrato bruto metanólico de isolados com potencial para controle biológico de *G. citricarpa* foram analisados via cromatografia em camada delgada, descrito por Wagner e Bladt (1996) para a detecção de classes de compostos, como ácidos graxos, alcalóides, antraquinonas, cumarinas, flavonóides e terpenóides (Ordóñez et al. 2006; Rodrigues et al. 2009).

A caracterização morfológica foi realizada a partir do cultivo em meio ágar-aveia (20,0 g de aveia, 20,0 g de dextrose, 15,0 g de ágar e água destilada q.s.p.) em placas de Petri incubadas durante 21 dias com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 22°C.

5.2.2 Seleção de antagonistas contra *G. citricarpa*

Foi realizado um levantamento inicial utilizando a Técnica de Cultura Pareada (Mariano, 1993) para avaliar o antagonismo de 66 isolados endofíticos contra *G. citricarpa* LGMF06. Foram justapostos discos (\emptyset 6 mm) de micélio retiradas da borda de culturas crescidas em meio BDA durante 7 dias (28°C, fotoperíodo de 12 horas, em BOD) dos isolados endofíticos e do fitopatógeno, em direções opostas nas placas de Petri nas mesmas condições do cultivo citado. Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Cada unidade amostral foi representada por uma placa de Petri. O controle negativo recebeu apenas o fitopatógeno.

Para determinar a porcentagem de inibição do crescimento, foi medido o diâmetro das colônias e calculado de acordo com a fórmula:

$$\text{Porcentagem de inibição (PI\%)}: \frac{D_c - D_t}{D_c} \times 100$$

Onde, **Dc** é o diâmetro médio da colônia do fitopatógeno no controle e **Dt** é o diâmetro médio da colônia nos tratamentos testados (Quiroga et al. 2001).

Com os isolados que apresentaram capacidade de inibição do crescimento micelial do fitopatógeno superior a 50%, foram obtidos extratos metabólitos para confirmação dos resultados. Para esta avaliação, discos de colônias (\varnothing 12 mm) obtidos de cultura de *G. citricarpa* LGMF06 foram justapostos no centro de placas de Petri contendo BDA. A 1,0 cm da borda, em posições opostas e equidistantes, foram colocados discos de papel filtro estéril (\varnothing 5 mm). Sobre os discos foram adicionados 10,0 μ L do extrato metanólico na concentração 10 mg/mL. As placas foram incubadas (28°C, fotoperíodo de 12 horas, em BOD) e o potencial de inibição foi avaliado medindo o diâmetro das colônias após 7 dias de crescimento, comparando com o controle negativo, onde foi adicionado água destilada autoclavada. Como controle positivo foi utilizado o fungicida carbendazim (Derosal[®] 1,0 mg/mL), Bayer Leverkusen).

Para testar o efeito inibitório dos extratos metanólicos na formação de picnídios de *G. citricarpa* LGMF06, foi utilizada a metodologia descrita por Cardoso-Filho (2003) com modificações. Folhas de limão cravo foram lavadas em água corrente, cortadas em fragmentos de 1 cm² e autoclavados em água destilada. Três fragmentos foram colocados em placas de Petri com meio BDA. Discos de micélio (\varnothing 12 mm) de colônias de *G. citricarpa* LGMF06 foram inoculados em pontos adjacentes a cada fragmento foliar. Sobre cada fragmento foram adicionados 10 μ L do extrato metanólico. As placas foram incubadas durante 21 dias (28°C, fotoperíodo de 12 horas, em BOD). Após este período, os picnídios crescidos sobre os fragmentos foliares foram contados, por observação com lupa comparando com o controle negativo (água destilada) e controle positivo (Derosal[®] (1,0 mg/mL), Bayer Leverkusen).

Para testar se os resultados obtidos tiveram significância estatística foi realizado análise de variância (ANOVA). Quando o teste F foi significativo, uma comparação posterior foi conduzida usando teste Tukey por meio do *software* ASSISTAT (Silva et al. 2002).

5.2.3 Agrotransformação e análise dos transformantes

Foi utilizada a metodologia descrita por Figueiredo et al. (2010) para a agrotransformação de isolados de *Xylaria* sp. Antagonistas a *G. citricarpa* LGMF06.

Para determinar a estabilidade mitótica dos possíveis transformantes, os mesmos foram cultivados em meio BDA por 3 gerações na ausência do fungicida glifosinato de amônio (100 µg/mL) e cultivo subsequente com o fungicida.

Os possíveis transformantes e os controles foram cultivados por um período de 1 a 4 dias e submetidos a análise de microscopia de epifluorescência. As imagens foram capturadas para análise dos resultados usando microscópio Leica UV (DMKLB ou MZFL111) com filtros de 488 nm de excitação e emissão de 515 nm. As imagens foram editadas usando Picasa 3.1.0 *software*.

A detecção dos transgenes nos possíveis transformantes foi realizada por meio de PCR. Os isolados foram inoculados em meio BDA e incubados a 28 °C por 3 dias. O micélio foi submetido à extração do DNA genômico utilizando o kit de extração UltraClean® microbial DNA Isolation Kit (MO-BIO®) seguindo instrução do fabricante. A reação de PCR dos possíveis transformantes foi realizada em termociclador (Mastercycler, Eppendorf) usando os oligonucleotídeos barR e barF com condições de PCR descritas por Figueiredo et al. (2010).

5.3 Resultados

5.3.1 Isolamento e identificação de fungos endofíticos de *M. ilicifolia*

Entre os fungos obtidos do isolamento de 200 fragmentos foliares de *M. ilicifolia* foram identificados 6 gêneros principais: *Alternaria*, *Phyllosticta* *Guignardia* e *Xylaria* com taxa de colonização de 1%, *Phomopsis* (2%), *Pestalotiopsis* (6,5%) e *Colletotrichum* sp./*Glomerella* (16,5%). Os demais isolados foram separados em dois grupos, de acordo com a coloração e aspecto do micélio, sendo do Grupo I, os fungos com micélio branco cotonoso (25,5%) e do Grupo II, os fungos com micélio escuro (42%), estes sendo todos aqueles que apresentavam coloração amarela, marrom, cinza e esverdeado (Tabela 1).

Tabela 1 - NÚMERO DE ISOLADOS E TAXA DE COLONIZAÇÃO (TC) EM PORCENTAGEM DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS EM FOLHAS DE *M. ilicifolia* (espinaheira-santa)

Gêneros e Grupos	Isolados	TC (%)
<i>Alternaria</i> sp.	2	1
<i>Phyllosticta</i> sp./ <i>Guignardia</i> sp.	2	1
<i>Xylaria</i> sp.**	2	1
<i>Phomopsis</i> sp.	4	2
<i>Pestalotiopsis</i> sp. **	13	6,5
<i>Colletotrichum</i> sp./ <i>Glomerella</i> sp.	33	16,5
GRUPO I: Fungos de micélio branco cotonoso**	51	25,5
GRUPO II: Fungos de micélio escuro*	84	42
TOTAL	191	95,5

* Fungos com coloração do micélio amarelo, marrom, cinza e esverdeado. ** Isolados utilizados nos testes de antagonismo contra o fitopatógeno *G. citricarpa* LGMF06.

5.3.2 Seleção de antagonistas contra *G. citricarpa*

Dos 191 fungos endofíticos isolados, 66 testados e duas linhagens de *Xylaria* sp. (69JES e 70JES) foram capazes de inibir o crescimento de *G. citricarpa* LGMF06.

Os extratos metanólicos produzidos a partir destes isolados reduziram significativamente o crescimento micelial de *G. citricarpa* LGMF06 (Tabela 2). A inibição ocorreu devido à produção de metabólitos secundários produzidos pelos isolados endofíticos, uma vez que o solvente metanol (Figura 1C e Tabela 2) e água (Figura 1B) não apresentaram efeito no crescimento micelial.

Ocorreu a diminuição no número de picnídios produzidos por *G. citricarpa* LGMF06 na superfície de folhas de citros autoclavadas (Tabela 2) com o uso dos extratos. Novamente avaliou-se o efeito do metanol, não apresentando este efeito sobre a produção de picnídios por *G. citricarpa*. Houve diferença significativa entre os isolados endofíticos, demonstrando que o isolado 70JES é mais efetivo no controle do crescimento micelial de *G. citricarpa in vitro* em relação ao isolado 69JES (Tabela 2).

Tabela 2 - MÉDIA DO CRESCIMENTO MICELIAL E FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS DE *G. citricarpa* LGMF06 NA PRESENÇA DE EXTRATOS METANÓLICOS DOS ENDÓFITOS 69JES e 70JES

Tratamentos	Média de crescimento (cm)	Média do Número de Picnídios
Metanol	3,31 a *	2,36 a
Água	3,23 a	2,45 a
69JES	2,26 b	2,08 b
70JES	1,50 c	1,83 c
Derosal	0,20 d	0,0 d

*Médias seguidas da mesma letra, não apresentam diferença estatística significativa (Tukey teste, $P < 0.05$). d.m.s 0.57 para média de crescimento e 0,24 para o número de picnídios

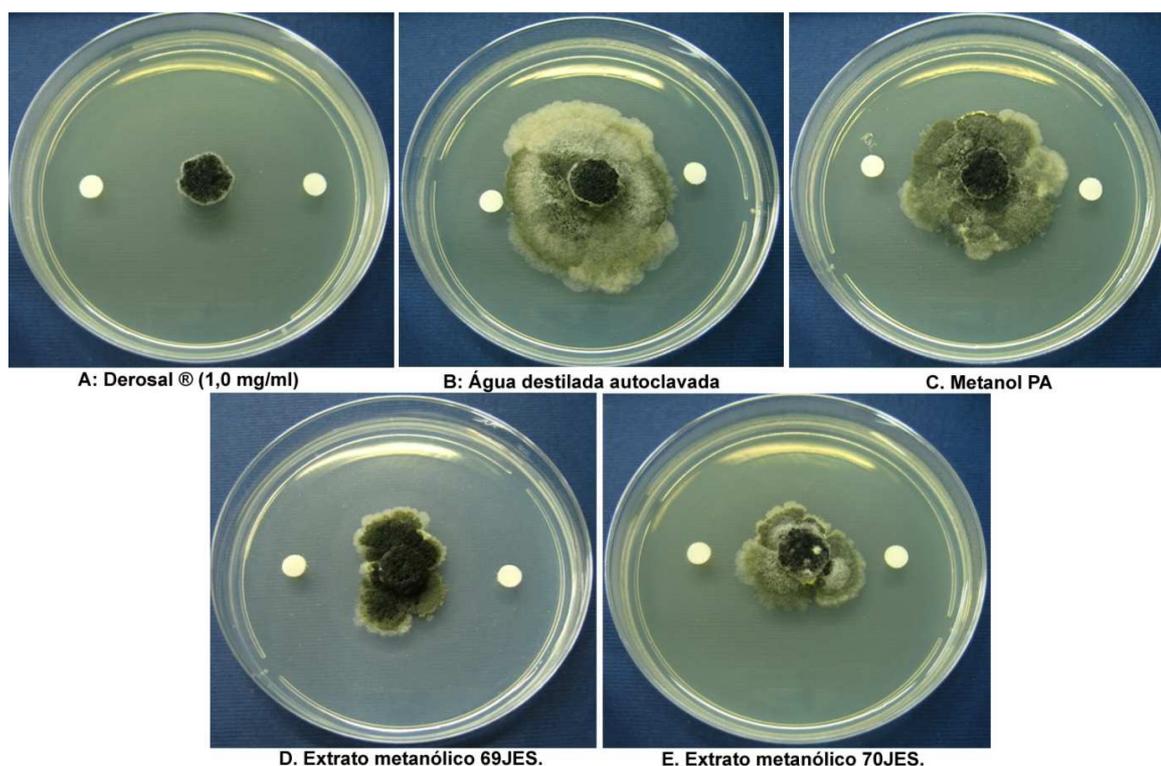


Figura 1 - CRESCIMENTO MICELIAL DAS COLÔNIAS DE *G. citricarpa* LGMF06 NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO EXTRATO METANÓLICO DOS ENDÓFITOS EM MEIO BDA APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C

Os isolados 69JES e 70JES, identificados como promissores para o controle de *G. citricarpa* LGMF06, foram identificados pela macromorfologia e pelo sequenciamento da região ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA como sendo pertencentes ao gênero *Xylaria* (Figura 2).

O isolado 69JES apresentou estruturas de reprodução e foi possível a caracterização morfológica. Em meio ágar-aveia as colônias apresentaram crescimento lento, chegando a 5-6 cm após 4 semanas. Inicialmente, com micélio ralo e cottonoso, branco e uniforme. Quando maduro, o micélio torna-se acinzentado a preto em algumas regiões. Com reverso amarelado com mancha escura em locais de estromas incipiente (dados não mostrados).

Os componentes presentes nos extratos metanólicos dos isolados 69JES e 70JES fracionados em cromatografia em camada delgada indicaram a presença de compostos alcalóides, aminas primárias e cumarinas (Apêndice 3).

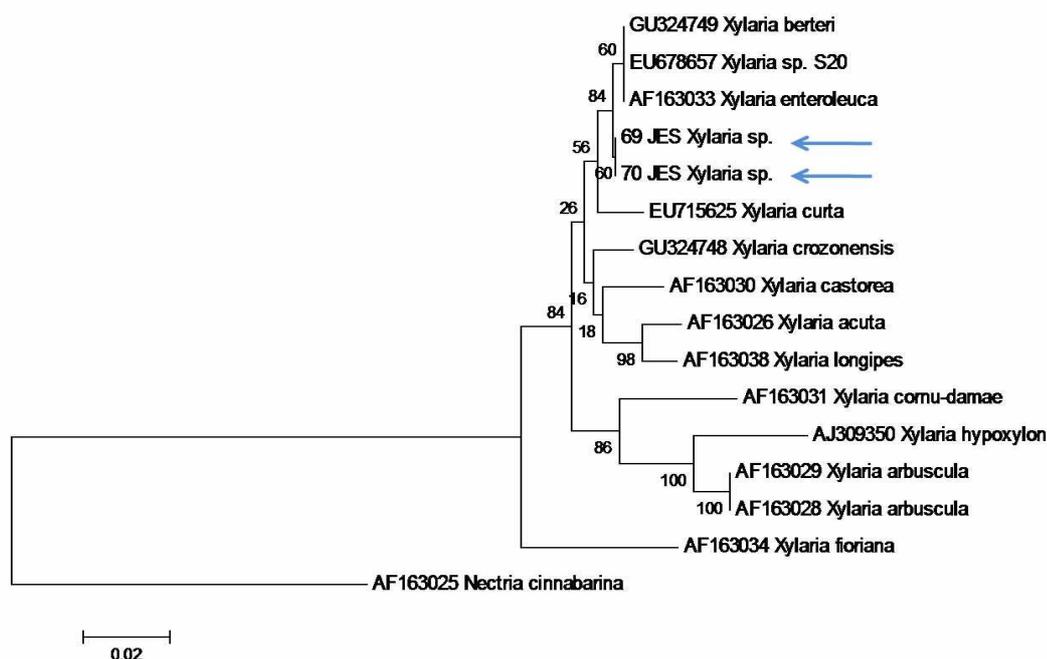


Figura 2 - ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSTRUÍDA PELO MÉTODO DE MÁXIMA PARCIMÔNIA BASEADA NAS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2 DO rDNA DE DOIS ISOLADOS ENDOFÍTICOS E 13 SEQUÊNCIAS REFERÊNCIAS DO GÊNERO *Xylaria*

NOTA: *N. cinnabarina* foi usada como *outgroup*. Os valores de *bootstrap* (n=1000 repetições) maiores que 50 e a escala da distância genética estão indicados. Os isolados avaliados nesse estudo estão indicados.

5.3.4 Agrotransformação dos isolados 69JES e 70JES

Foram obtidos 133 possíveis transformantes de *Xylaria* sp. (69JES) a partir de 14 dias de crescimento no meio contendo acetoseringona. Destes, 50% apresentaram estabilidade mitótica após 4 repiques. Não foram obtidos transformantes da linhagem 70JES de *Xylaria* sp, provavelmente pela falta de esporulação do mesmo. Desta forma, a agrotransformação utilizando apenas hifas do isolado 70JES não se apresentou viável.

A presença de hifas do isolado 69JES de *Xylaria* sp. emitindo fluorescência (Figura 3A), após 14 dias de crescimento em meio BDA (com glifosinato de amônio), demonstra que o gene *gfp* está sendo expresso nos transformantes, indicando eficiência no processo de agrotransformação.

Nove transformantes de *Xylaria* sp. (69JES) foram escolhidos ao acaso e submetidos à análise de PCR para confirmação da presença do gene *bar*. Todos os transformantes apresentaram como produto de PCR a banda correspondente a aproximadamente 600 pb (Figura 3B), indicando a presença do gene *bar*. Como controle negativo da reação foi utilizada a linhagem selvagem 69JES (SV)

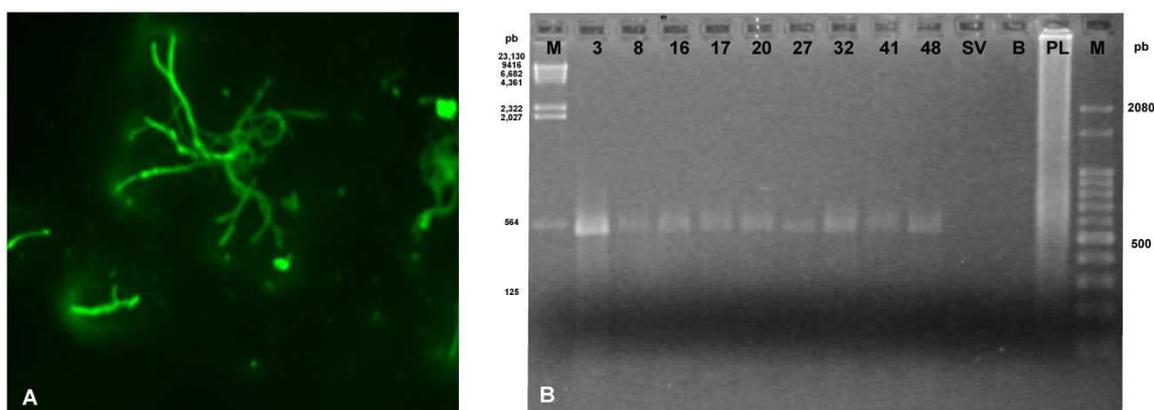


Figura 3 – ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES DE *Xylaria* sp. 69JES OBTIDOS POR AGROTRANSFORMAÇÃO. **A.** MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA DE HIFAS DO TRANSFORMANTE 32 DE *Xylaria* sp. 69JES; **B.** AMPLICONS DO GENE *bar* DE 9 TRANSFORMANTES E DA LINHAGEM SELVAGEM 69JES (SV)

Nota: Os números correspondem aos possíveis transformantes; **SV.** *Xylaria* 69JES selvagem; **B.** branco; **PL.** plasmídeo contendo o gene *bar*; **M.** marcador de peso molecular DNA DE FAGO λ /*Hind* III (esquerda) e DNA ladder de 100 pb (direita).

5.4. Discussão e conclusão

A MPC causada pelo fungo *G. citricarpa* é uma importante doença da citricultura brasileira, que ocasiona grandes prejuízos econômicos ao País. A busca por medidas alternativas de controle, tais como agentes no controle biológico, tem sido um desafio. Muitos fungos endofíticos são relatados como agentes protetores de plantas no controle ao ataque de insetos e patógenos emergindo como importantes ferramentas para o controle biológico (Vu, Hauschild e Sikora, 2006; Clarke et al. 2006; Campanile, Ruscelli e Luisi, 2007; Backman e Sikora, 2008; LI et al. 2008; Rodriguez et al. 2009; Yu, et al. 2010).

Os extratos metanólicos dos dois isolados foram capazes de inibir em até 53% o crescimento micelial de *G. citricarpa*. Tais extratos também foram capazes de inibir até 15 % a formação de picnídios do fitopatógeno na superfície de folhas de citros (Tabela 2). Estes resultados são extremamente importantes em função do ciclo da doença MPC. A fase assexuada é a responsável pelo incremento da doença dentro da planta e próximo a ela, pois os conídios são disseminados circunstancialmente a curtas distâncias (Baldassari et al. 2001). Em frutos maduros e folhas caídas, os conídios emergem de um ostíolo, envolvidos por uma substância mucilaginosa que é facilmente solubilizada e transportada pela água das chuvas, orvalho ou irrigação, atingindo a superfície de órgãos suscetíveis, e iniciando novas infecções (Kotzé, 1981; Robbs et al. 1985). A importância dos conídios na epidemiologia da doença se sobressai com a coexistência, na mesma planta, de frutos infectados e frutos jovens suscetíveis (Feichtenberger, 1996).

Além disso, a produção de picnídios nas lesões de MPC nos frutos cítricos é a característica principal para declarar a existência de frutos com sintomas na amostra analisada, e promovem a recusa na importação dos frutos pela Comunidade Européia. Desta forma, estratégias que minimizem o aparecimento de picnídios de *G. citricarpa* em frutos cítricos, são de fundamental importância e representam um avanço nas pesquisas de controle.

As linhagens endofíticas 69JES e 70JES foram identificadas como *Xylaria* sp. por meio de sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA (Figura 2). O gênero *Xylaria* pertence à família *Xylariaceae*, uma família que compreende aproximadamente 40 gêneros com representantes em praticamente todos os continentes. Espécies de *Xylaria* tem sido isoladas como endófitos de diferentes

plantas (Bayman et al. 1998; Urairuj et al. 2003; Cafêu et al. 2005; Arnold, 2008 ; Liu et al. 2010), incluindo coníferas, orquídeas e bromélias, monocotiledôneas, dicotiledôneas e árvores da floresta tropical em geral (Brunner e Petrini, 1992; Davis et al. 2003; Shibuya et al. 2003 Park et al. 2005; Hata e Sone, 2008). Este é o primeiro relato de espécies de *Xylaria* isoladas como endofíticas de espinheira-santa, uma planta importante para medicina popular da América do Sul (Figueiredo et al. 2007).

Compostos bioativos provenientes do metabolismo secundário de fungos do gênero *Xylaria* apresentam inúmeras funções biológicas como antioxidantes, antitumorais e antimicrobianos (Liu et al. 2007; Hu, 2008; Pongcharoen et al. 2008; Jiménez-Romero et al. 2008; Li et al. 2010; Silva et al. 2010; Liu et al. 2010).

Espécies de *Xylaria* tem tido seus compostos elucidados exhaustivamente para descoberta de novas drogas. Xiaoli Liu et al. (2008) relataram o isolamento e elucidação da estrutura de quatro novos terpenóides, xylarenolide, xylaranol, xylaranol B e ácido xylaranico da linhagem *Xylaria* sp. 101.

A linhagem *Xylaria* sp. F0010 apresenta duas substâncias, a griseofulvina e declorogriseofulvina, com propriedades antifúngicas efetivas no controle do desenvolvimento de *Magnaporthe grisea* e *Corticium sasaki* em culturas de arroz, contra *Puccinia recondita* controlando a ferrugem da folha do trigo e contra *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, o oídio da cevada (Park et al. 2005).

O composto conhecido como sordarina, um terpenóide isolado do gênero *Xylaria* é particularmente interessante, pois apresenta atividade antifúngica via inibição do fator de alongação da síntese protéica (Hu et al. 2010).

As frações ativas dos extratos metanólicos das duas linhagens endofíticas (69JES e 70JES) foram determinadas por CCD e revelaram compostos como alcalóides e cumarinas. Alcalóides são conhecidos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos que atuam como protetores das plantas, diminuindo a herbivoria (Espósito e Azevedo, 2004). A cumarina é um princípio ativo volátil encontrado em diversas espécies de plantas tais como guaco, emburana, agrião, cumaru, canela, entre outras, e em frutas como morango, cereja e damasco. Possui um odor forte e característico de baunilha. É utilizada como fixador de perfumes, aditivo em tintas e spray, aromatizantes de alimentos, produtos de limpeza, além de possuir propriedades antibióticas, bronco-dilatadora, fungicida, anticoagulante, analgésica e também ser utilizada em tratamentos contra o câncer

(Rodrigues, 2009). Tal componente pode ser encontrado em diversas plantas, ocorrendo em diferentes espécies e famílias botânicas, e, excepcionalmente, em bactérias e fungos (Celeghini et al. 2001). Shoeb et al. (2010) relataram a presença de cumarina com propriedades antimicrobianas de fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Aquilaria malaccensis* Lamk. Cumarina foi caracterizada em extratos obtidos de *Periconia atropurpurea*, um fungo endofítico isolado de folhas de *Xylopiya aromatica*, uma planta nativa do Cerrado Brasileiro (Teles et al. 2006) e também a partir de extratos produzidos por *Pestalotiopsis* sp., fungo endofítico isolado de folhas de *Rhizophora mucronata* na China (Xu et al. 2009).

A elucidação da estrutura dos metabólitos revelados por CCD precisa ser melhor investigada, uma vez que fungos endofíticos são fontes naturais de metabólitos de crescente interesse e pelo fato dos extratos metanólicos destes isolados apresentarem atividade antimicrobiana contra *G. citricarpa*, podendo ser utilizado no futuro, com agentes de controle biológico deste fungo.

Uma importante estratégia para o estudo da ação de controladores biológicos *in vivo*, é a utilização de transformantes expressando proteínas fluorescentes, que podem ser visualizadas sob microscopia de epifluorescência. Em trabalho anterior, Figueiredo et al. (2010) obtiveram transformantes de *G. citricarpa* expressando a proteína GFP. No presente trabalho, foram obtidos com sucesso transformantes da linhagem 69JES de *Xylaria* sp expressando esta proteína verde fluorescente. Tais transformantes poderão ser utilizados em estudos de colonização e até controle biológico diretamente em plântulas e frutos de citros.

A frequência de transformação da linhagem 69JES foi alta ($133 / 10^6$ esporos/mL), se comparado com os resultados obtidos por Figueiredo et al. (2010). Quando comparadas as frequências de transformantes estáveis mitoticamente encontradas para outros fungos na literatura, a eficiência da transformação de *Xylaria* sp. é menor (Reis, 2004 e Rodríguez-Tovar, 2005).

Os resultados obtidos sugerem que apenas os conídios e não hifas são viáveis para agrotransformação para tal espécie de *Xylaria*. A agrotransformação de hifas em outros gêneros de fungos foi relatada na literatura (Chen et al. 2000; Michielse et al. 2005) . Com isso, sugere-se que o protocolo de agrotransformação desenvolvido para *G. citricarpa*, pode ser utilizado para os fungos do gênero *Xylaria*. Entretanto, percebe-se que o sucesso da agrotransformação deste gênero é dependente da produção de esporos neste fungo.

O desenvolvimento deste eficiente e viável sistema de transformação para linhagens de *Xylaria* é relevante, por se tratar do primeiro relato de agrotransformação para este gênero e contribuir para o estudo das interações e entendimento dos processos de colonização da planta hospedeira, da atuação e interação deste frente a *G. citricarpa* no interior da planta, abrindo um horizonte de possibilidades de estratégias moleculares para fins de controle biológico.

Agradecimentos

CNPq, Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/ UFPR – Brasil.

5.5 Referências

- Agriannual, 2009. Anuário da Agricultura Brasileira São Paulo, 267-285.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhag, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25, 3389-3402.
- Arnold, A.E.; Maynard, Z.; Gilbert, G.S.; Coley, P.D.; Kursar, T.A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? , 2000. *Ecology Letters*. 3, 267-274.
- Arnold, A. E. 2008. Endophytic fungi: hidden components of tropical community ecology., Henk, D. A., Eells, R. L, Lutzoni, F., Vilgalys, R.. 2007. Diversity and phylogenetic affinity of foliar endophytes associated with loblolly pine inferred by culturing and direct PCR. *Mycologia*. 99,185–206.
- Arnold, A. E., Lutzoni, F., 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*. 88, 541–549.
- Associtrus 2010. <http://www.associtrus.com.br/downloads/28> INFORMATIVO ASSOCITRUS JANEIRO FEVEREIRO 2010. pdf. Acesso em 16/08/2010.
- Azevedo, J. L., Maccheroni Jr., Pereira, J. O., Araújo, W. L., 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Microbiology*. 3, 40-65.
- Backman, P.A. , Sikora, R.A. , 2008. Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control*. 46, 1-3.
- Bacon, C.W., White, J.F., Jr. (Eds.), 2000. *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker, NY, 487p.
- Baldassari, R.B.; Góes, A. de; Santos, J.M. dos; Timossi, A.J. Microscopia eletrônica de varredura de isolados de *Guignardia citricarpa* obtidos de plantas cítricas. *Summa Phytopathologica, Botucatu*, v. 27, n. 1, p. 88-92, 2001.
- Bayman, P., Angulo-Sandoval , P., Baez-Oortiz, Z., Lodge, D. J. , 1998. Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico. *Mycological Research*. 102, 944–948.
- Bills, G., Dombrowsky, A., Pelaez, F., Polishook, J., 2002. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. *Tropical mycology: micromycetes*. 2, 165-194.

- Brunner, F., Petrini, O. 1992. Taxonomy of some *Xylaria* species and xylariaceous endophytes by isozyme electrophoresis. *Mycological Research*. 96, 723–733.
- Cafêu, M. C., Silva, G. H., Teles, H. L. et al. , 2005. Antifungal compounds of *Xylaria* sp., an endophytic fungus isolated from *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Quimica Nova*. 28, 6, 991–995.
- Campanile, G., Ruscelli, A., Luisi, N., 2007. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in planta tests. *European Journal of Plant Pathology*. 117, 237–246.
- Cardoso-Filho, J.A. Efeito de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) e dos indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-s-metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (teleomorfo: *Guignardia citricarpa*). Piracicaba, 2003. 125p. (Tese Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- Carrol, G.C. , 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*. 69, 2–9.
- Celeghini, R. M. S., Vilegas J. H. Y., Lanças, F. M. , 2001. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hidroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Sprengel (guaco). *Journal Brazilian Chemical Society*. 12, 706-709.
- Chen, X., Stone, M., Schlagnhauser, C., Romaine E, C. P. , 2000. A fruiting body tissue method for efficient Agrobacterium-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 4510-4513.
- Clarke, B. B., White, J.F.J., Hurley, R.H., Torres, M.S., Sun, S., Huff, D. R. , 2006. Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. *Plant Disease*. 90, 994 – 998.
- Corrado, M. and K.F. Rodrigues. 2004. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. *J. Basic Microbiol.*, 44: 157-160.
- Davis, E. C., Franklin, J. B. , Shaw, A. J. , Vilgalys, R. , 2003. Endophytic xylaria (xylariaceae) among Liverworts and angiosperms: phylogenetics, distribution, and symbiosis. *American Journal of Botany*. 90, 1661-1667.
- De Hoog, G.S., Gerrits Van Den Ende, A.H.G., 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes. *Mycoses*, 41, 183-189.
- Esposito, E, Azevedo, J. L. , 2004. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Edusc, 510p.
- Figueiredo, J. G., Goulin, E. H., Tanaka, F., kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L., Staats, C., Scharank, A., Glienke, C. , 2010. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*. *Journal of Microbiology Methods*. 80(2), 143-7.
- Feichtenberger, E. Mancha preta ou pinta preta dos citros. *Laranja & Cia, Matão*, v.43, p.10-11, 1996
- Figueiredo, J.G., Pimentel, I.C., Vicente, V.A., Pie, M.R., Cordeiro, V.K., Terasawa, L.G., Pereira, J.O., Souza, A.Q.L.D., Glienke, C. , 2007. Bioprospecting highly diverse endophytic *Pestalotiopsis* spp. With antibacterial properties from *Maytenus ilicifolia*, a medicinal plant from Brazil. *Canadian Journal Microbiology*. 53, 1123-1132.
- Glienke-Blanco, C., Aguilar-Vildoso, C. I, Vieira, M. L. C., Barroso, P. A. V., Azevedo, J. L., 2002. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from *citrus*. *Genetic and Molecular Biology*. 25. 251-255.
- Hata, K., Sone, K. , 2008. Isolation of endophytes from leaves of *Neolitsea sericea* in broadleaf and conifer stands. *Mycoscience*. 49, 229–232.

- Hu, Z.-Y., Li, Y.-Y., Huang, Y. J., Su, W.-J., Shen, Y.-M. , 2008. Three New Sesquiterpenoids from *Xylaria* sp. NCY2. *Helvetica Chimica Acta*. 91, 46–52
- Hu, Z.-Y., Li, Y.-Y., Huang, Y. J., Su, W.-J., Shen, Y.-M. , 2010. Seven Novel Linear Polyketides from *Xylaria* sp. NCY2. *Helvetica Chimica Acta*. 93, 925-933.
- Jiménez-Romero, C., Ortega-Barria, E., Arnold, A. E. , Cubilla-Rios, L. , 2008. Activity against *Plasmodium falciparum* of lactones isolated from the endophytic fungus *Xylaria* sp. *Pharmaceutical Biology*. 46, 1–4.
- Kotzé, J. M. Epidemiology and control of citrus black spot in South África. *Plant Disease*, v. 65, p. 945-950, 1981.
- Li, E. W., Jiang, L. H., GuoL, D, Zhang, H. , Che, Y. S. , 2008. Pestalachlorides A C, antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16, 7894 – 9.
- Li, Y.-Y., Hu, Z.-Y., Lu, C.-H., Shen, Y.-M. , 2010. Four New Terpenoids from *Xylaria* sp. 101. *Helvetica Chimica Acta*. 93, 796–802.
- Liu, K., Ding, X. , Deng, B. , Chen, W. , 2010. 10-Hydroxycamptothecin produced by a new endophytic *Xylaria* sp., M20, from *Camptotheca acuminata*,” *Biotechnology Letters*. 32, 689–693.
- Liu, X., Dong M., Chen, X., Jiang, M., Lv, X., Zhou, J. , 2008. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 78, 241–247
- Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M. Lv X., Yan, G. , 2007. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*,” *Food Chemistry*, 105, 548–554.
- Mariano, R. L. R. 1993. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 1, 369-409,
- Michielse, C. B., Hooykaas, P. J., van den Hondel, C. A., Ram, A. F., 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetic*. 48, 1–17.
- Ordóñez, V.P., Veja, E.M., Melagón, A. O. , 2006. Phytochemical study of native plant species used in traditional medicine in Loja Province. *Lyonia*. 10, 65-71.
- Park, J. H. , Choi, G. J. , Lee, H. B. , Kim, K. M., Jung, H. S., Lee, S.-W., Jang, K. S., Cho, K. Y., Kim, J.-C. , 2005. Griseofulvin from *Xylaria* sp. strain F0010, an endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 15, 112–117.
- Petrini, O. , 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews JH, Hirano SS (eds), *Microbial Ecology of Leaves*. Springer-Verlag, New York, p 179–197.
- Petrini, O., Stone, J. , Carroll, F.E. , 1992. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. *Canadian Journal of Botany*. 60, 789-796.
- Pongcharoen, W., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Kühn, T., Pelzing, M., Sakayaroj, J., Taylor, W.C. , 2008. Metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-D14. *Phytochemistry*. 69, 1900–1902.
- Quiroga, E. N., Sampietro, A. R., Vattuone, M. , 2001. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 74, 89-96.
- Raeder, U., Broda, P. , 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, 1, 17-20.
- Reis, M. C., Fungaro, M. H. P., Duarte, R. T. D., Furlaneto, L., Furnaleto, M. C. , 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the

- entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal Microbiology Methods*. 58, 197–202.
- Robbs, C.F.; Pimentel, J.P.; Ribeiro, R.L. A mancha preta dos citros: identificação da forma perfeita *Guignardia citricarpa* no Estado do Rio de Janeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.10, p.248, 1985. Resumo / Suplemento / Apresentado ao 18. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Fortaleza, 1985.
- Rodrigues, I. M. C., Souza Filho, A. P. S., Ferreira, F. A. , 2009. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. *Planta Daninha*.27, 507-513.
- Rodrigues, K. F., Hesse, M., Werner, C., 2000. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *Journal of Basic Microbiology*. 40, 261-267.
- Rodriguez, R. J., White, J.F. Jr, Arnold A. E., Redman, R. S., 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*. 182, 314–330.
- Rodríguez-Tovar A. V., Ruiz-Medrano, R., Herrera-Martínez, A., Barrera-Figueroa, B.E., Hidalgo-Lara, M.E., Reyes-Márquez, B.E., Cabrera-Ponce, J. L., Valdés, M., Xoconostle-Cázares, B., 2005. Stable genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Journal Microbiology Methods*. 63, 45–54
- Schardl, C. L., Leuchtman, A., Spiering, M.J. , 2004. Symbioses of grasses with seed borne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology*. 55, 315–340.
- Schulz, B. J. E. Mutualistic interactions with fungal root endophytes. In: SCHULZ B. J. E. , BOYLE, C.J.C., SIEBER, T.N., eds. , 2006. *Microbial root endophytes*. Berlin, Germany: Springer-Verlag. 261–280.
- Shibuya, H., Kitamura, C., Maehara, S. , Nagahata, M., Winarno, H., Simanjuntak, P., Kim, H. S., Wataya, Y., Ohashi, K. , 2003. Transformation of Cinchona alkaloids into 1-N-oxide derivatives by endophytic *Xylaria* sp. isolated from *Cinchona pubescens*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 51, 71–74.
- Shoeb, M., Begum S., Nahar. N. , 2010. Study of an endophytic fungus from *Aquilaria malaccensis* Lamk. *Bangladesh Journal of Pharmacology* , 5, 21-24.
- Sikora, R.A., Schafer, K., Dababat, A. A. , 2007. Modes of action associated with microbially induced in planta suppression of plant parasitic nematodes. *Australasian Plant Pathology*. 36, 124–134.
- Silva, F. de A. S. Azevedo, C. A. V. de. , 2002. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande. 4, 71-78.
- Silva, G.H. , Oliveira C.M., Teles H.L., Pauletti, M.P., Castro-Gamboa, I., Silva, D.H.S., Bolzani, V.S. , Young M.C., Costa-Neto, C.M. , Pfenning, L.H., Berlinck R.G.S. , Araujo, A.R. , 2010. Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae), *Phytochemistry Letters*. 3 164–167.
- Stringari, D. Sistemática e Diversidade Genética de Isolados de *Guignardia* spp. E nos Estados do Paraná e São Paulo. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, da Universidade Federal do Paraná. 2009.
- Swofford, D. L., 1998. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4.00. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Teles, H.L., Sordi, R., Silva, G.H., Castro-Gamboa, I., Bolzani, V.d.S., Pfenning, L.H., Magalhães de Abreu, L., (...), Araújo, A.R. , 2006. Aromatic compounds produced by *Periconia atropurpurea*, an endophytic fungus associated with *Xylopiia aromatic*. *Phytochemistry*. 67, 2686-2690.

- Urairuj, C., Kanongnuch, C., Lumyong, S. , 2003. Lignolytic enzymes from tropical endophytic *Xylariaceae*. *Fungal Diversity*.13, 209–219.
- Vu, T., Hauschild, R., Sikora, R. A. , 2006. *Fusarium oxysporum* endophytes induced systemic resistance against *Radopholus similis* on banana. *Nematology*. 8, 847–85.
- Xu, J., Kjer, J., Sendker, J., Wray, V., Guan, H., Edrada, R.A., Müller W. E. G. , Bayer, M., Lin, W. H., Wu, J., Proksch, P. , 2009. Cytosporones, coumarins, and an alkaloid from the endophytic fungus *Pestalotiopsis sp.* isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 17, 7362–7367.
- Wagner, H.; Bladt. S. *Plant drug analysis*. 1996. 2.ed. New York: Springer Verlag.
- White Jr., J. F., Morrow, A.C., Morgan-Jones, G. , 1990. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. *Mycologia*, Lawrence. 82, 218-226.
- Yu, H. Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Sun, P., Qin L. , 2010. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*. 165, 437– 449.

6. CAPÍTULO III: Compatibilidade vegetativa e caracterização molecular de *Guignardia citricarpa*, *Phyllosticta capitalensis* e *P. citribraziliensis*

Figueiredo, J.G., Goulin E.H., Waculicz-Andrade C. E., Bini A.P., Adamoski, D., V Kava-Cordeiro., Galli-Terasawa L.V., Glienke C.

Universidade Federal do Paraná

Abstract

Citrus Black Spot (CBS), caused by *Guignardia citricarpa*, is a serious fruit spot disease and is widely distributed in South America, Africa and Australia. Recently was described in Cuba and United States of America. Previous studies have demonstrated the existence of endophytic species (*Phyllosticta capitalensis* and *P. citribraziliensis*) in citrus plants with high morphological similarity to the causal agent of CBS. *P. capitalensis* is cosmopolitan with a widehost range and can colonize citrus fruit and leaves. *P. citribraziliensis* is a new species recently described in citrus plants. To understand the genetic variability of *G. citricarpa* is necessary establish the study of hyphal anastomosis, heterokaryon formation and the establishment of vegetative compatibility groups. This study aimed to check the occurrence of sexual and vegetative compatibility reactions between and within 8 isolates of *G. citricarpa*, 9 of *P. capitalensis* and 4 of *P. citribraziliensis*. Vegetative compatibility systems usually restrict the transfer of nuclear and cytoplasmic elements during the growth of the fungus and can be used in studies of genetic variability of various species. Of the 231 combinations, 15 crosses between *G. citricarpa* showed incompatible. It was not been established vegetative compatibility groups among strains of *G. citricarpa*, allowing the exchange of genetic material between them, corroborating the results described in the literature reporting low diversity among isolates of this fungus. According to phylogenetic analysis based on Bayesian Inference and Maximum Parsimony sequences of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 and elongation factor $\alpha 1$ of the strains of *G. citricarpa*, *P. capitalensis* and *P. citribraziliensis* these isolates formed genetically distinct groups and therefore there must be genetic mechanisms that restrict heterokaryon formation between genetically different individuals.

Keywords: *G. citricarpa*, *P. capitalensis*, *P. citribraziliensis*, Citrus Black Spot, vegetative compatibility

6.1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se na citricultura, sendo detentor de um terço da produção mundial e 85% da produção internacional do suco de laranja, representando uma das principais atividades do agronegócio brasileiro (Agrianual, 2009; Associtrus, 2010). Entretanto, em que pese à importância do setor, o mesmo é afetado por vários problemas de ordem fitossanitária, notadamente as doenças. E, dentre estas, destaca-se a Mancha Preta dos Citros (MPC), ou Pinta Preta, como também é designada. Os sintomas de MPC restringem-se quase que exclusivamente à casca dos frutos de onde advém os prejuízos dados pela sua depreciação, principalmente no mercado externo, de tal forma que muitas pesquisas fazem-se prioritárias e urgentes com vistas minimizem os prejuízos.

A MPC é causada por *Guignardia citricarpa*, uma doença quarentenária A1 para os países da União Européia (Wulandari et al. 2009). Ela afeta praticamente todas as espécies de citros com importância econômica, especialmente as laranja doces (*Citrus sinensis*). Atualmente a MPC encontra-se relatada em países da África, Ásia, Oceania, América do Sul e Caribe. Recentemente também foi relatada sua presença nos campos da Flórida (Schubert et al. 2010). A MPC é um problema na produção da América do Sul, África, Austrália e mais recentemente em Cuba (Vázquez, 2007) e Estados Unidos (NAPPO, 2010).

Três espécies morfológicamente similares dos gêneros *Guignardia* e *Phyllosticta* estão associadas às plantas cítricas: *G. citricarpa* (anamorfo: *Phyllosticta citricarpa*), *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis* (Gliénke et al. 2011). Entretanto, somente a *G. citricarpa* causa a MPC (Baldassari et al. 2008) mas as três espécies podem ser isoladas de plantas cítricas.

A anastomose possibilita a troca do conteúdo celular entre indivíduos diferentes, sendo este evento requerido nas reações de compatibilidade, início da reprodução sexual, formação de heterocário, ciclo parassexual e a distribuição de nutrientes no micélio/colônia (Glass et al. 2000; Hickey et al. 2002).

Em fungos filamentosos existe o reconhecimento sexual, que é controlado por locus *mat* (“mating types”) e o reconhecimento vegetativo, que é controlado por um locus específico denominado *het* (incompatibilidade de heterocário ou também pode ser chamado de *vic*, de incompatibilidade vegetativa) (Leslie, 1993; Saupe, 2000). Quando dois indivíduos se encontram, eles podem sofrer a fusão celular ou

anastomose. Se os dois indivíduos tiverem o mesmo genótipo *vic*, ocorre a heterocariose, porém, se eles diferirem geneticamente para o loco *vic*, apesar da fusão de hifas, as células heterocarióticas são rapidamente destruídas ou têm o seu crescimento severamente inibido (Saupe, 2000). Os sistemas de compatibilidade vegetativa geralmente restringem a transferência de material nuclear e elementos citoplasmáticos durante o crescimento do fungo. São denominadas compatíveis vegetativamente as linhagens que apresentam identidade alélica para um conjunto particular de *loci* denominados *het* ou *vic*. A presença de tais *loci* possibilita aos seus portadores a formação de heterocários estáveis. Por outro lado, linhagens que diferem em qualquer um destes *loci* são incapazes de formar heterocários estáveis e são classificadas como vegetativamente incompatíveis (Puhalla, 1985; Leslie, 1993). A heterocariose consiste no primeiro estágio do ciclo parassexual podendo resultar em haplóides recombinantes através dos processos de recombinação e haploidização, responsáveis pela variabilidade genética de patógenos. Está relacionada com o surgimento de isolados resistentes a fungicidas e de linhagens capazes de quebrar a resistência de plantas (Azevedo, 1998). Estudos de compatibilidade vegetativa também podem ser utilizados para análise da diversidade genética e na estrutura de populações naturais (Leslie, 1993).

Para compreensão sobre a variabilidade genética de *G. citricarpa* torna-se necessário averiguar a ocorrência de anastomose de hifas e formação de heterocários, bem como evidenciar ou não a existência de grupos de compatibilidade vegetativa. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a ocorrência de reações de compatibilidade vegetativa entre e dentre as espécies de *G. citricarpa*, *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis*.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Isolados e condições de crescimento

Foram avaliadas 22 linhagens de *G. citricarpa*, *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis* (Tabela 1), escolhidas ao acaso, que fazem parte da coleção de cultura do laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. Tanto para o estudo de compatibilidade vegetativa quanto para

a manutenção dos estoques as mesmas permaneceram em Meio Citros Fabris-Nishimura (CFN) (28 g l⁻¹ de folhas de citros lavadas, 20 g l⁻¹ glicose, 15 g l⁻¹ ágar, pH 5.8).

6.2.2 Avaliação da compatibilidade vegetativa

Foram realizados pareamentos entre todas as colônias de *G. citricarpa*, *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis*. Em placas de Petri com Meio CFN foi colocado papel celofane autoclavado. Sobre o celofane foram inoculados dois discos (Ø 6 mm) da cultura de cada uma das linhagens, em lados opostos e equidistantes entre si, ambos a 2,0 cm da borda. As placas de Petri foram mantidas durante 7 dias em estufa B.O.D., com fotoperíodo de 12 h, a 28°C. Após este período as observações foram fotodocumentadas. Na região de encontro das colônias o celofane foi cortado e disposto sobre uma lâmina para realização de microscopia óptica. As observações foram analisadas com teste cego, no qual as placas receberam apenas a identificação numérica e somente após a análise dos resultados, foi apresentada a identificação das linhagens.

Cada unidade amostral foi representada por uma placa de Petri em delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento. O controle recebeu apenas uma das linhagens, com três repetições. A avaliação foi realizada mediante duas abordagens: a) Observação macromorfológica do encontro de hifas entre as colônias, de acordo com os critérios estabelecidos por Burgess et al. (2001), sendo considerados incompatíveis os cruzamentos em que as linhagens não se encontraram ou que apresentaram uma barreira na zona de encontro das hifas. Como cruzamentos compatíveis foram considerados aqueles em que as colônias não apresentavam barreira de crescimento; b) Observação microscópica da formação de zona de encontro. Quando as hifas das linhagens não se encontraram, estas foram consideradas como cruzamentos incompatíveis e quando houve o encontro de hifas, estas foram consideradas como possíveis linhagens compatíveis vegetativamente.

Tabela 1 - LINHAGENS DE *Guignardia citricarpa*, *Phyllosticta capitalensis* e *P. citribraziliensis* UTILIZADAS NO ESTUDO DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA

Nº	Código	RNA dupla fita	Espécie / Hospedeiro	Tecido	Origem	Responsavel pelo Isolamento
3	FTMO23	-	<i>C. reticulata</i> Blanco	Fruto	Cerro Azul/ PR	Juliana Fabris
5	PC28/05	-	<i>Citrus latifolia</i>	-	-	Antonio de Goes
8	PC 13/96	+	<i>Citrus</i> sp.	-	Cordeirópolis/ SP	-
11	PC 33/05	-	<i>Citrus sinensis</i>	-	-	Antonio de Goes
15	ECAF 75	-	-	-	-	-
17	PC 7LD6	+	<i>Citrus</i> sp.	-	Mogi-Guaçu/ SP-	-
19	PCIAC19/02	+	<i>Citrus</i> sp.	-	Cordeirópolis/ SP	-
21	PC 7LB8	+	<i>Citrus</i> sp.	-	Mogi-Guaçu/ SP	-
4	ECMi05	-	-	-	-	-
6	Ecol 23	-	<i>Citrus sinensis</i>	NI	-	-
9	ECMi01	-	-	-	-	-
10	ECMi06	-	-	-	-	-
12	403	-	-	-	-	-
16	EC21C	+	<i>Camellia japonica</i>	Folha	EUA	Carroll
18	ECMi07	-	-	-	-	-
20	PC 45	-	-	-	-	-
22	EC 16/96	-	<i>Citrus limon</i>	-	Cordeirópolis/ SP	-
7	ECPR3	+	<i>Citrus</i> sp	Folha	Rio Negro/ PR	Chirlei Glienke
14	ECPR5	+	<i>Citrus</i> sp.	Folha	Rio Negro/ PR	Chirlei Glienke
1	ECPR06	+	<i>Citrus</i> sp	Folha	Rio Negro - PR	Chirlei Glienke
13	203	-	-	-	-	-

NOTA: (+) Presença; (-) Ausência; -. Sem Informações.

6.2.3 Caracterização Molecular

O DNA genômico dos isolados de *G. citricarpa*, *P.capitalensis* e *P. citribraziliensis* foi obtido de acordo com a metodologia descrita por Raeder e Broda (1985), modificada por Glienke-Blanco et al. 2002. Para identificação molecular dos isolados foi realizado o sequenciamento da região ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA e parte do gene $\alpha 1$ do fator de alongação da tradução (TEF1-a). A amplificação foi realizada com os *primers* V9G (5'TTACGTCCTGCCCTTTGTA3') (De Hoog et al. 2003) e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White et al. 1990), que são universais para fungos e permitem amplificar a região ITS1 - 5,8S - ITS2 do DNA ribossomal. As condições da reação seguiram o protocolo de White et al. (1990), modificado por Stringari (2009). A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C; seguida de extensão final de 3 minutos a 72°C . A purificação do produto de PCR foi realizada com acetato de amônio e etanol PA e o *pellet* resultante foi ressuspenso em 15 μ L de água ultra-pura esterilizada. Para reação de sequenciamento foi utilizado o Kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare®), seguindo as instruções do fabricante. A amplificação de TEF1 foi realizada com os *primers* EF1-728F(5'CATCGAGAAGTTCGAGAAGG3') e EF2(5'GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT3') (Carbone e Kohn 1999), com as mesmas condições descritas anteriormente. A qualidade dos produtos de PCR foi verificada em gel de agarose. O produto final da amplificação foi purificado com Sephadex (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) e submetida à eletroforese capilar semi-automática utilizando a plataforma MegaBACE (GE Healthcare®).

O alinhamento das seqüências obtidas foi realizado com auxílio do programa CLUSTAL-W versão 1.7 (Thompson et al.1994). Foi realizada posterior inspeção visual através do programa BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999). As seqüências obtidas foram também comparadas com outras seqüências existentes no banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), pelo programa BLAST (Altschul et al.1997). Para análise das seqüências obtidas no presente trabalho, foi utilizado o programa Megablast, comparando seqüências de nucleotídeos altamente similares do banco de dados de seqüências de nucleotídeos do GeneBank. A análise filogenética foi realizada com auxílio do programa PAUP* 4.0 b10 (Swofford, 1998) e a análise de inferência Bayesiana foi conduzida utilizando o programa *MrBayes* (Huelsenbeck e

Ronquist, 2001). As árvores geradas foram visualizadas utilizando programa TREEVIEW (Page, 1996).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Avaliação da compatibilidade vegetativa

Os isolados de *G. citricarpa*, *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis* (APÊNDICE 1) apresentaram colônias de coloração negra, com aspecto granuloso e micélio ralo. Nota-se, entretanto que *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis* apresentam as bordas mais arredondadas em relação à espécie *G. citricarpa*, bem como crescimento mais uniforme e rápido. McOnie (1964) relatou que as linhagens patogênicas apresentam crescimento lento, quando comparadas com linhagens endofíticas deste gênero. Baayen et al. (2002), relataram que a forma patogênica e a endofítica isoladas de várias espécies vegetais na África, América, Ásia e Austrália comparando-as através de parâmetros morfológicos e moleculares, apresentam padrões distintos quanto à taxa de desenvolvimento vegetativo em diferentes meios de cultura, à coloração de colônias e à morfologia dos conídios.

Após 7 dias de crescimento, analisando a macromorfologia das colônias das linhagens de *G. citricarpa*, *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis* foi possível observar a formação de uma barreira na zona de encontro das colônias, bem como a inibição do crescimento. Na figura 1 estão representados os pareamentos entre as linhagens de *G. citricarpa*, com o pareamento da linhagem controle FTMO2.3 e contra as linhagens 28/05; PC 13/96; PC 33/05; ECAF 75; PC 7LD6; PC IAC 19/02; PC 7LB8, respectivamente. Em relação ao controle (Figura 1A), os demais pareamentos não são caracterizados pela formação de uma barreira de crescimento de hifas, mas sim pela alteração na zona de contato. Tal inibição foi observada nos pareamentos entre as linhagens 28/05, PC13/96 e ECAF75 (Figura 2B, C e E). Nestes pareamentos, a linhagem FTMO2.3 apresentou inibição de crescimento na região de frente à linhagem oposta. Também foi possível observar que apesar do pouco crescimento da linhagem PC33/05, ela foi capaz de inibir o crescimento da linhagem FTMO2.3 (Figura 1D).

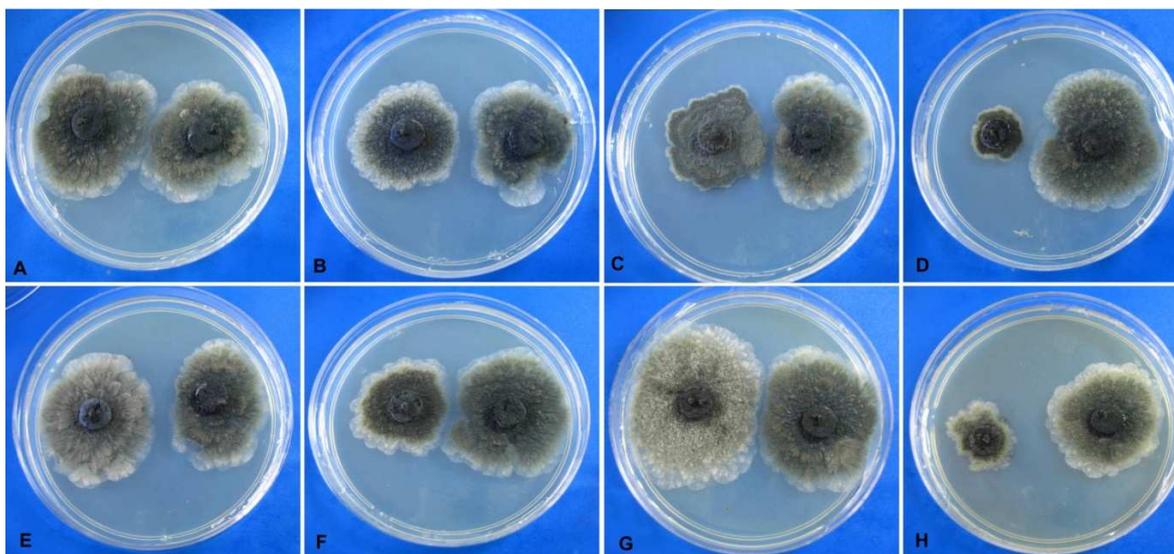


FIGURA 1 – PAREAMENTO DAS LINHAGENS DE *G. citricarpa* EM MEIO DE CULTURA CFN APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C

Na direita a linhagem FTMO2.3 e a esquerda as demais linhagens: A: FTMO2.3 (controle) – B: 28/05; C: PC 13/96; D: PC 33/05; E: ECAF 75; F: PC 7LD6; G: PC IAC 19/02; H: PC 7LB8

Em relação aos pareamentos entre *G. citricarpa* FTMO2.3 com *P. capitalensis* (Ecol 23; 403 e EC 16/96) e *P. citribraziliensis* (ECPR3; 203 e ECPR5) demonstrados na figura 2, apenas o pareamento entre FTMO2.3 e Ecol 23 apresentaram halo de inibição com crescimento reduzido de micélio (Figura 2A). Nos demais pareamentos, houve inibição do crescimento da colônia FTMO2.3 na região de contato com formação de uma barreira. As regiões de encontro podem ser caracterizadas com mudança na coloração do micélio (Figura 2B e 2F).

Os pareamentos entre *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis* também apresentaram uma barreira no encontro das colônias (Figura 2G-I). No pareamento entre *P. capitalensis* Ecol 23 com ECMi06 e do pareamento entre *P. citribraziliensis* ECPR06 e ECPR07, nota-se uma barreira entre as colônias na região de encontro (FIGURA 2G e 2I). Diferente do que pode ser visto na região de encontro do cruzamento entre *P. capitalensis* Ecol 23 com *P. citribraziliensis* ECPR5, na qual ocorre uma inibição do crescimento (Figura 2H).

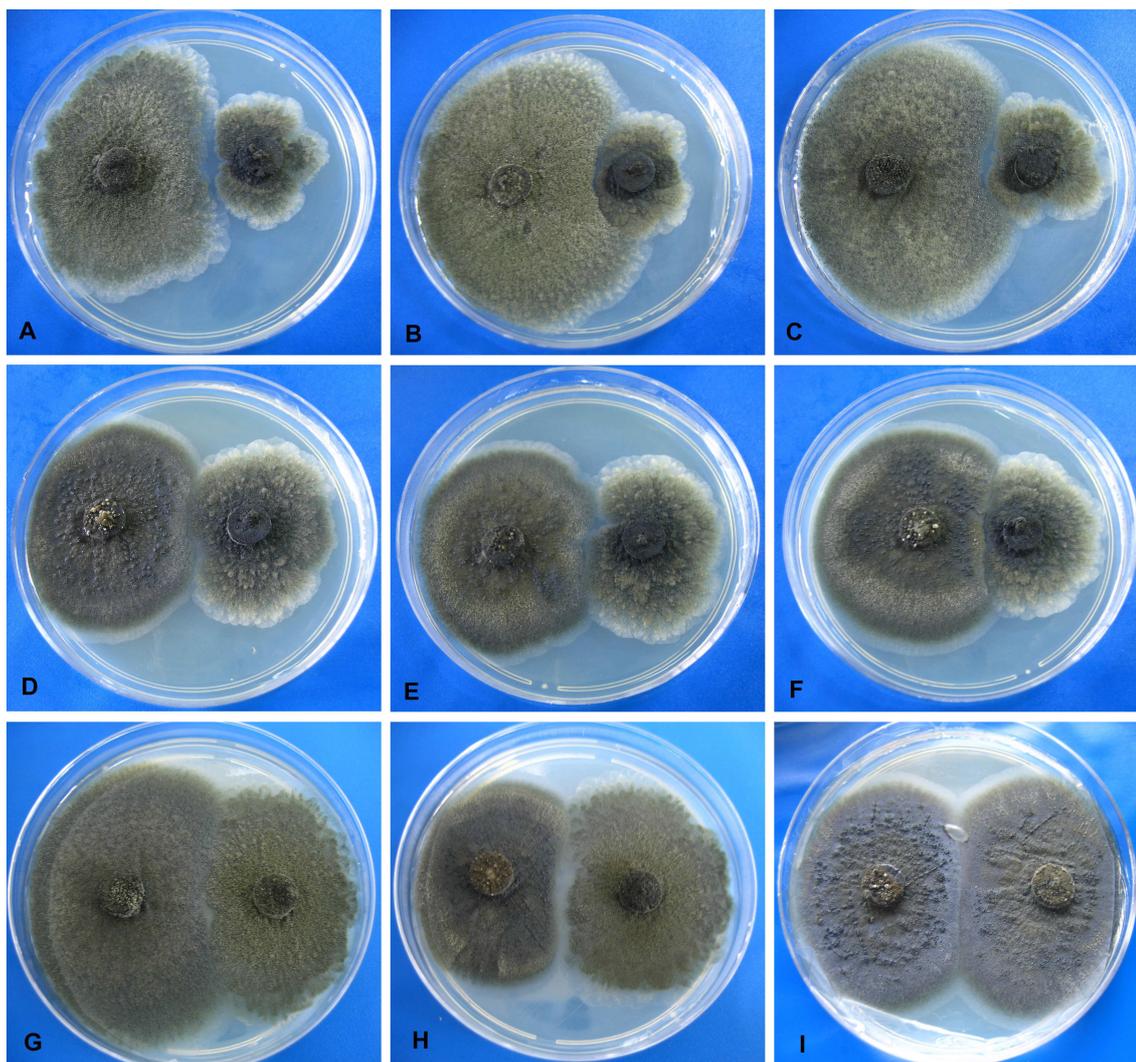


FIGURA 2 – PAREAMENTO DAS LINHAGENS DE *G. citricarpa* FTMO2.3 COM AS LINHAGENS DE *P. capitalensis* (A:Ecol 23; B:403 e C:EC 16/96) E *P. citribraziliensis* (D:ECPR3; E:203 e F: ECPR5), *P. capitalensis* Ecol 23 com ECMi06 (G), *P. capitalensis* Ecol 23 com *P. citribraziliensis* ECPR5 (H) e *P. citribraziliensis* ECPR06 e ECPR07 (I) A – F: FTMO2.3 na esquerda e as demais à direita;

A macromorfologia das colônias de *P. capitalensis* e *P. citribrazilienses* indica crescimento maior que os de *G. citricarpa*. Em geral, foi observado que as linhagens de *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis* continuaram apresentando crescimento micelial rápido e uniforme, tanto sozinha (controle), quanto nos pareamentos.

Conforme os resultados na análise de compatibilidade utilizando o critério de macromorfologia das colônias nos pareamentos, conclui-se que todas as linhagens utilizadas neste estudo apresentam uma barreira na região de encontro das colônias. Entretanto, algumas das linhagens de *G. citricarpa* apresentam total

inibição de crescimento formando um halo entre as colônias, sendo considerados, estes cruzamentos como incompatíveis vegetativamente (Tabela 3).

Assim como nos resultados de observação macromorfológica, não foi possível estabelecer grupos de incompatibilidade vegetativa entre as linhagens de *G. citricarpa*, entretanto, foi possível identificar pareamentos de linhagens incompatíveis. Sendo a linhagens FTMO2.3 a linhagem que apresentou maior número de pareamentos incompatíveis.

Na análise microscópica do encontro de hifas entre as linhagens, percebe-se que 100% das linhagens de *P. capitalensis* e de *P. citribraziliensis* estabelecem contato de hifas entre si. Todas as linhagens de *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis* estabelecem contato de hifas com as linhagens de *G. citricarpa* (Tabela 3).

Nos cruzamentos compatíveis entre as linhagens de *G. citricarpa* foi possível observar a fusão das hifas (Figura 3-E). Nas figuras 3C e 3D estão representadas as fusões de hifas entre as linhagens 28/05 com PC7LD6 e PCIAC 19/09, respectivamente. A fusão das hifas ocorreu entre as hifas principais e secundárias, sendo observado também entre hifas paralelas, formando a estrutura do tipo H (Figura 3C). Também ocorreram entre as paredes laterais das hifas e entre as extremidades de uma hifa e a parede lateral de outra (Figuras 3C-E). Foram encontradas regiões de contato entre hifas, tanto entre as linhagens da mesma espécie como entre os cruzamentos de *P. capitalensis* ECMi05 e *P. citribraziliensis* ECPR3 (Figura 3F).

Os pareamentos entre as linhagens de *G. citricarpa* 28/05 com PC7LD6 e PCIAC 19/02 (Figura 3A e 3B, respectivamente) apresentaram um halo que poderia ser caracterizado como um cruzamento incompatível, entretanto, quando analisado em microscopia foi possível observar a fusão de hifas (Figura 3C e 3D).

TABELA 3 – REAÇÕES DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA ENTRE *Guignardia citricarpa*, *Phyllosticta capitalensis* e *Phyllosticta citribraziliensis* APRESENTADAS NAS ANÁLISES MICROSCÓPICAS APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO CFN A 28°C

Nº	Código	<i>G. citricarpa</i>							<i>P. capitalensis</i>								<i>P. citribraziliensis</i>						
		3	5	8	11	15	17	19	21	4	6	9	10	12	16	18	20	22	1	7	13	14	
3	FTMO23	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	28/05		+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	PC 13/96			+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	PC 33/05				+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	ECAF 75					+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	PC 7LD6						+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	PC IAC 19/02							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	PC 7LB8								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	ECMi05									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Ecol 23										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	ECMi01											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	ECMi06												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	403													+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	EC21C														+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	ECMi07															+	+	+	+	+	+	+	+
20	PC 45																+	+	+	+	+	+	+
22	EC 16/96																	+	+	+	+	+	+
1	ECPR06																	+	+	+	+	+	+
7	ECPR3																		+	+	+	+	+
13	203																			+	+	+	+
14	ECPR5																					+	+

NOTA: (-) incompatíveis vegetativamente; (+) apresentam compatibilidade vegetativa;

As linhagens de *G. citricarpa* que apresentaram incompatibilidade vegetativa entre os pareamentos na análise macromorfológica, foram confirmadas com a análise de microscopia (Tabela 3). Entre as linhagens de *G. citricarpa* não foram formados grupos de incompatibilidade, entretanto formam-se pareamentos incompatíveis. A figura 4 permite observar mais claramente que apesar das linhagens fazerem parte de grupos de compatibilidade diferentes, estes grupos se inter-relacionam, favorecendo assim a troca de material genético entre as linhagens desta espécie. Ao mesmo tempo em que são observados pareamentos incompatíveis entre a linhagem FTMO2.3 com as linhagens 28/05, PC 13/96, PC 33/05, ECAF75 e PC7LB8 (Tabela 2), a linhagem PCIAC 19/02 está presente em todos os grupos, sendo compatível, inclusive, com a linhagem FTMO23, permitindo então a troca de material genético desta com linhagens que formaram pareamentos incompatíveis com ela. Da mesma forma, as linhagens PC7LD6 e PC7LB8 são incompatíveis, entretanto ambas fazem parte do grupo II ao qual pertencem as linhagens compatíveis com a linhagem 28/05.

Os grupos de compatibilidade formados entre as linhagens de *G. citricarpa* não estão relacionados com a origem de isolamento e nem com a espécie do hospedeiro. A linhagem FTMO2.3 foi isolada do fruto de lesão de *Citrus reticulata* na localidade de Cerro Azul no estado do Paraná e faz parte do mesmo grupo de compatibilidade das linhagens PC7LD6 e PC7LB8, isoladas de *Citrus* sp. em Mogi-Guaçu, no estado de São Paulo.

Nos casos de cruzamentos compatíveis, consideram-se que exista uma similaridade genética entre os isolados e uma provável origem geográfica comum, além de haver semelhantes atributos biológicos, fisiológicos e patogênicos (Glass et al. 2000). Isto significa dizer que estas linhagens, quando presentes no mesmo hospedeiro e ao mesmo tempo, podem ocorrer a heterocariose e a complementação de alelos.

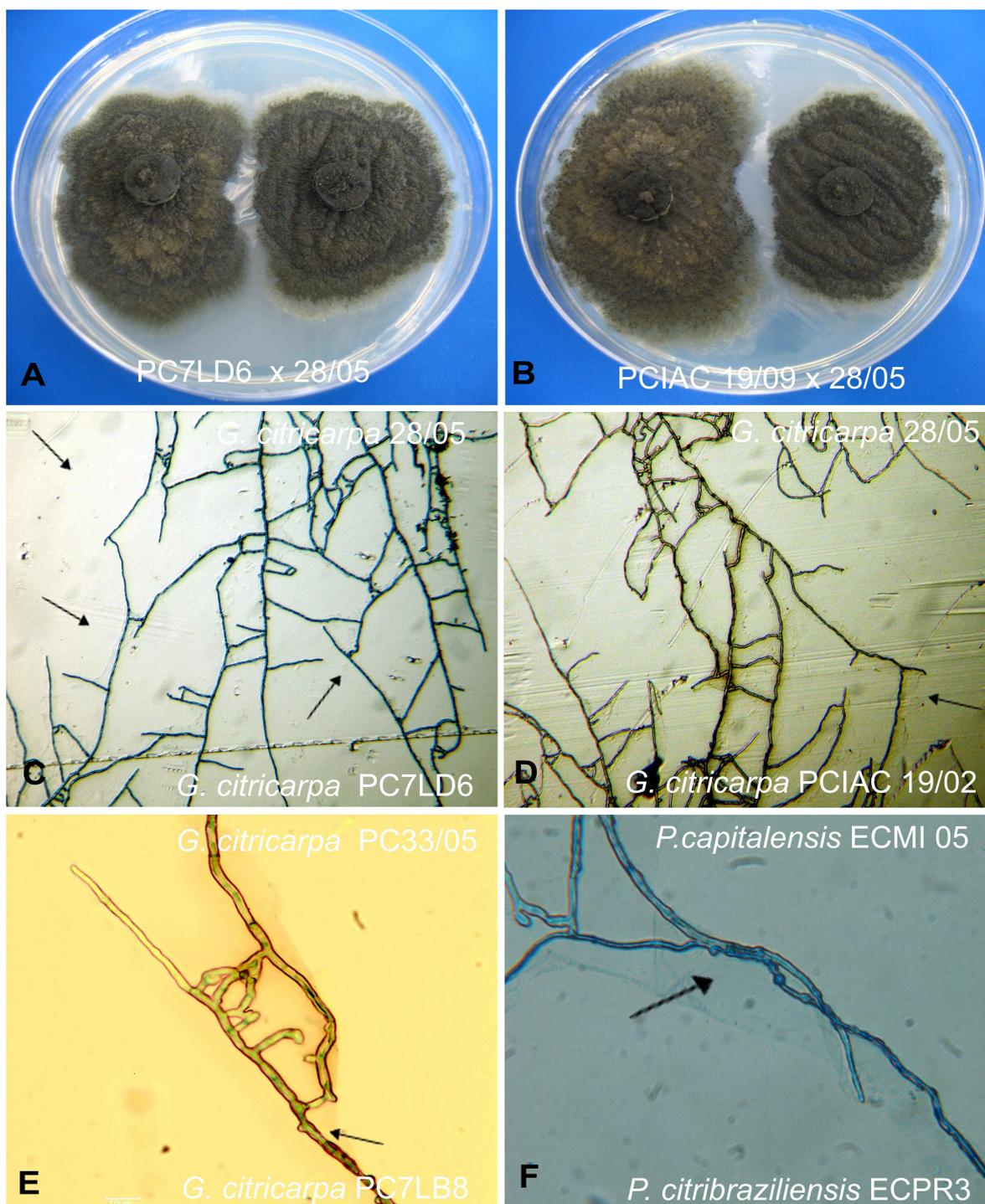


FIGURA 3 – PAREAMENTO E ENCONTRO DE HIFAS ENTRE ISOLADOS DAS LINHAGENS DE *G. citricarpa*, *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis* EM MEIO DE CULTURA CFN APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 28°C

Nota: B-C e E-F: aumento de 200 x e 400 x, respectivamente; coradas com lactofenol azul de algodão

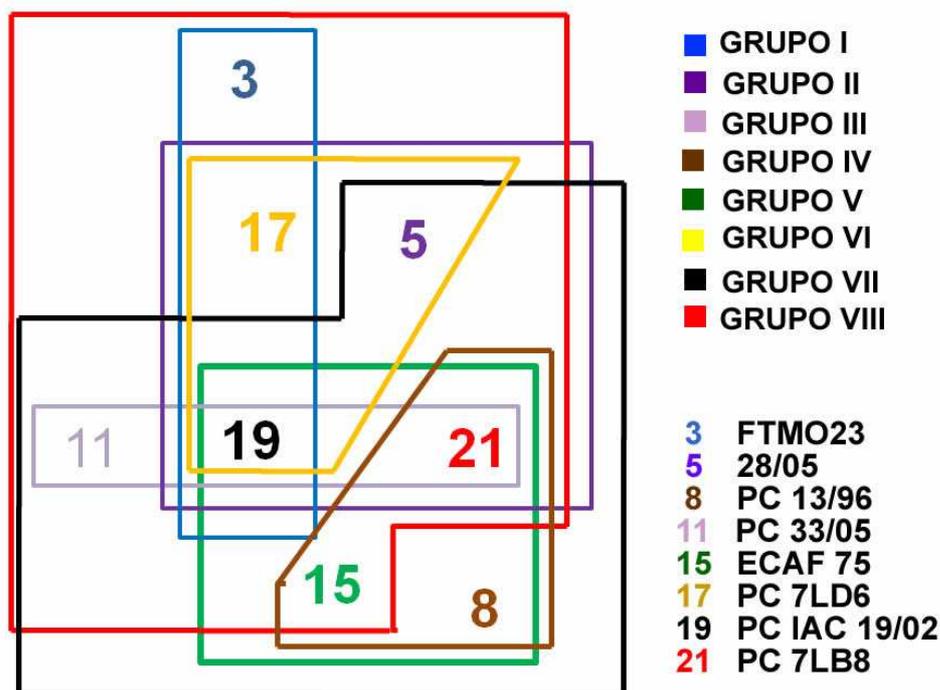


FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS GRUPOS DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA DAS LINHAGENS DE *G. citricarpa*

As fusões de hifas que estão ocorrendo entre as linhagens de *G. citricarpa* permitem a troca do conteúdo celular e a distribuição de nutrientes no micélio/colônia. Se houver compatibilidade quanto ao gene *vic*, pode ocorrer formação de heterocários, que são o primeiro passo para o ciclo parassexual, um dos processos que levam à recombinação genética em fungos. Tal mecanismo permite que fungos haplóides possam desfrutar dos benefícios do diplóide, como complementação ou heterose (Leslie, 1996; Glass et al. 2000; Hickey et al. 2002). Porém, tal modo de reprodução não foi ainda descrito para espécies deste gênero.

De acordo com Leslie (1993) a compatibilidade vegetativa entre os fungos reflete a diferença fenotípica (ou similaridade) entre indivíduos que representam a população de uma dada espécie. Neste caso, o fato das linhagens se inter-relacionarem podem indicar a similaridade entre *G. citricarpa*.

A forma como as linhagens se inter-relacionam corroboram com resultados obtidos por Stringari (2009) que sugere a existência de um possível fluxo gênico dentro da espécie *G. citricarpa*. Utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD, a autora propõe que a magnitude da variação observada entre os grupos analisados é

suficiente para sugerir que há estruturação insipiente das populações de *G. citricarpa*. Propõe também que tal estruturação pode estar em andamento e o tempo decorrido após o isolamento das populações não seja suficiente para ser revelado por meio dos marcadores utilizados no estudo.

A incompatibilidade vegetativa ou somática impõe uma barreira nos cruzamentos entre organismos geneticamente semelhantes, entretanto, diferentes para o locus *vic*. Contribuindo para a conservação genética dentro de uma população, além de restringir a disseminação de elementos infecciosos, como micovírus ou organelas debilitadas (Marek, 2003), prevenir a exploração por núcleos mal adaptados e ou como um mecanismo de autodefesa em fungos filamentosos (Glass et al. 2000).

6.3.2 Caracterização molecular

Para análise taxonômica e estudo da variabilidade das linhagens utilizadas neste estudo, foi realizado o sequenciamento das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA e parcial do gene $\alpha 1$ do fator de alongação. Comparando-se as sequências obtidas com as que estão depositadas no banco de dados NCBI, foi confirmada a identificação dos isolados como *G. citricarpa* (identidade igual ou superior a 98%), ou como *P. capitalensis* (identidade superior a 97%). Foram formados 3 grupos distintos entre *G. citricarpa*, *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis* (Figura 5).

Entre *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis* é possível observar diversidade genética. Segundo Baayen et al. (2002) o fungo *P. capitalensis* parece ser um endofítico bem sucedido de um grande número de plantas com distribuição mundial. Ao contrário do observado com *G. citricarpa*, o fungo *P. capitalensis* pode ser isolado como endofítico de plantas da vegetação espontânea próximas de pomares cítricos. Essa diversidade de hospedeiros já foi observada por Wulandari et al. (2009), Rodrigues et al. (2004) e Baayen et al. (2002) entre outros.

Rodrigues et al. (2004) sugerem que algumas espécies de *Guignardia* não co-evoluem regularmente com seus hospedeiros e frequentemente “saltam” para outros hospedeiros. Segundo os autores, *P. capitalensis* pode ser um bom exemplo, pois trata-se de uma espécie que ocorre em muitas espécies de plantas diferentes e que populações de *P. capitalensis* em diferentes hospedeiros e (ou) de diferentes

regiões geográficas podem evoluir para espécies separadas por um isolamento e seleção no futuro.

Stringari (2009) sugere que, devido a elevada variabilidade genética apresentada por *P. capitalensis*, revelada, são necessários mais estudos com o objetivo de distinção de espécies neste complexo.

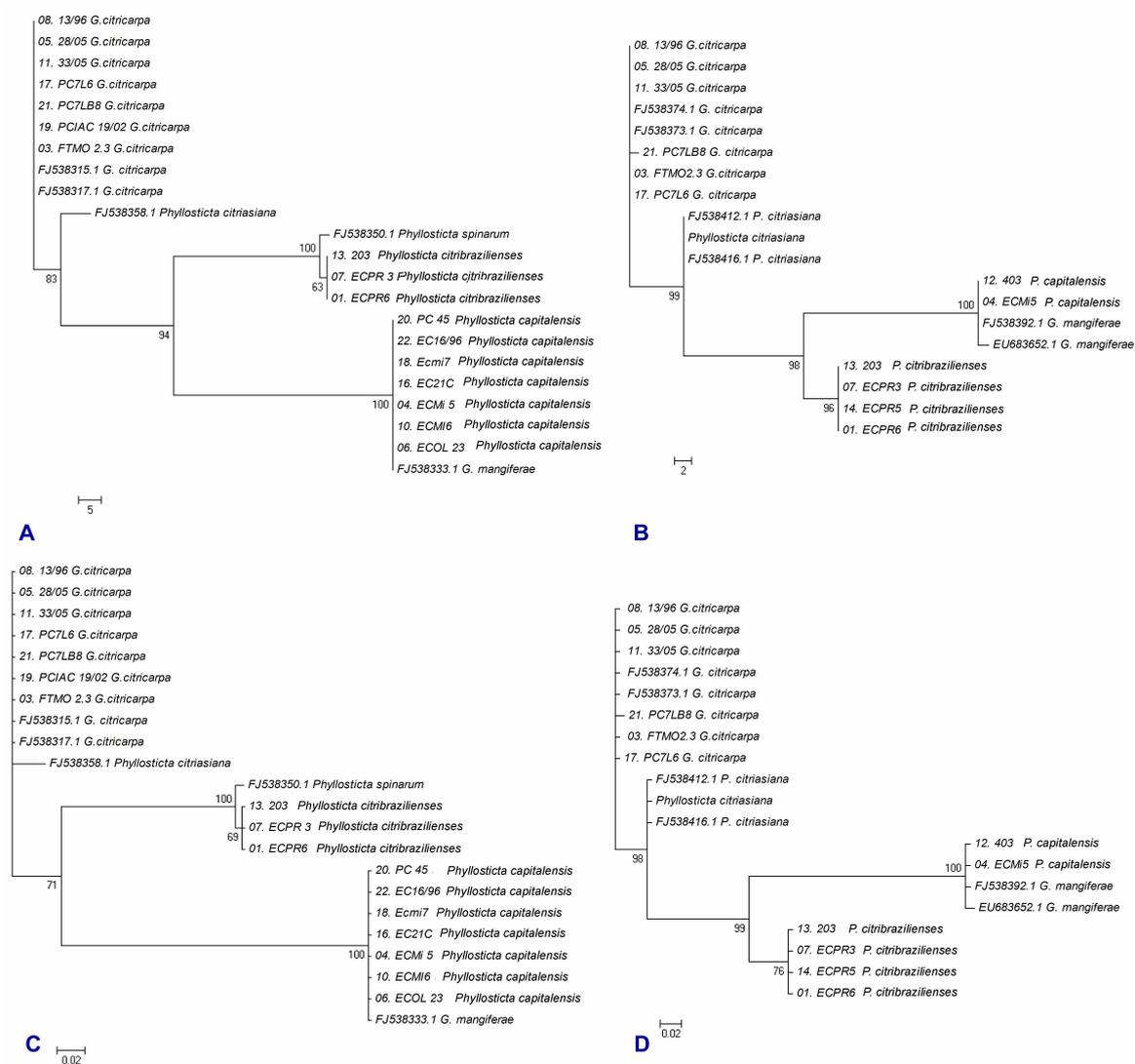


FIGURA 5 – ÁRVORES FILOGENÉTICAS DAS LINHAGENS DE *G. citricarpa*, *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis* BASEADAS NAS SEQUÊNCIAS ITS1-5.8S-ITS2 rDNA e $\alpha 1$ DO FATOR DE ELONGAÇÃO

A. Máxima parcimônia e **B.** Inferência Bayesiana das sequências ITS1-5.8S-ITS2 rDNA; **C.** Máxima parcimônia e **D.** Inferência Bayesiana das sequências $\alpha 1$ DO FATOR DE ELONGAÇÃO. Os valores abaixo dos ramos representam tanto os valores *bootstrap* (*máxima parcimônia*) ou probabilidades posteriores (Inferência Bayesiana)

Conforme relatado por Stringari (2009), a similaridade de sequências entre as linhagens de *G. citricarpa* é surpreendente, uma vez que tais isolados são provenientes de diferentes regiões e variedades cítricas. Os resultados da caracterização molecular corroboram com os apresentados acima na formação dos grupos de compatibilidade vegetativa (Figura 4), no qual, apesar das linhagens de *G. citricarpa* formarem grupos de compatibilidade, elas se inter-relacionam.

Por outro lado, apesar dos resultados apresentados na análise microscópica (Tabela 3 e Figura 4B), sugerirem a possibilidade de pareamentos compatíveis entre *G. citricarpa*, *P. capitalensis* e *Phyllosticta* sp., os grupos formados nas análises filogenéticas revelam que não ocorrem trocas genéticas entre estas linhagens. Visto que, de acordo com as análises apresentadas com base na Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana das sequências de ITS1-5.8S-ITS2 rDNA e $\alpha 1$ do fator de alongação das linhagens de *G. citricarpa*, *P. capitalensis* e *Phyllosticta* sp., estas formam grupos geneticamente distintos (Figura 5). Neste caso, as linhagens utilizadas neste estudo devem possuir os mesmos genótipos para os genes que controlam os eventos de pré-fusão e diferenças alélicas entre os genes que controlam a compatibilidade vegetativa, de forma que possuem capacidade para formar anastomose, mas posteriormente não chegam a formar heterocário (Leslie e Zeller, 1996).

Os resultados aqui apresentados não permitem o estabelecimento de grupos de compatibilidade vegetativa entre as linhagens de *G. citricarpa* e não parecem ser explicados pelo controle do gene *vic*. Por outro lado, Montenegro (2010) descreve a existência de partículas semelhantes a vírus em diversas linhagens das três espécies aqui investigadas. Talvez a existência de tais partículas esteja impedindo o encontro das hifas entre algumas das linhagens aqui estudadas.

Assim, faz-se necessário entender melhor as interações entre as linhagens e espécies investigadas, uma vez que elas convivem endofiticamente e patogenicamente com plantas de citros, contribuindo assim para o controle mais racional e ecologicamente seguro da doença.

Agradecimentos

CNPq, Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/ UFPR – Brazil.

6.4 REFERÊNCIAS

- Agriannual, 2009. Anuário da Agricultura Brasileira São Paulo, 267-285.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhag, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25, 3389-3402.
- ASSOCITRUS 2010. <http://www.associtrus.com.br/downloads/28> INFORMATIVO ASSOCITRUS JANEIRO FEVEREIRO 2010 .pdf. Acesso em 16/08/2010.
- Azevedo, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. Ecologia Microbiana. Editora EMBRAPA, Jaguariúna-SP. 117-137, 1998.
- Baayen, R. P., Bonants, P. J. M., Verkley, G., Carrol, G. C., Van Der Aa, M., Weerd, M., Brouwershaven, G. C., Schutte, G. C., Maccheroni JR., W., Glienke-Blanco, C, Azevedo, J. L. , 2002. Nonpathogenic Strains of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *Guignardia mangiferae*, (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology*. 92, 464-477,
- Baldassari, R.B., Wickert, E., Goes, A. 2008. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from Citrus spp.. *European Journal of Plant Pathology*. 120: 103-110.
- Burgess, T., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., 2001. Comparison of genotypic diversity in native and introduced populations of *Sphaeropsis sapinea* isolated from *Pinus radiata*. *Mycological Research*. 105, 1331-1339.
- Carbone, I., M. Kohn, M.L., 1999. A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes, *Mycologia*, Lawrence. 91, 553-556.
- Christo, D. Variabilidade Genética e Diferenciação Molecular de Isolados Endofíticos e Patogênicos de *Guignardia* spp. e *Phyllosticta* sp. Curitiba, 2002. 78p. Dissertação (Mestrado em Genética) Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná.
- De Hoog, G.S., Gerrits Van Den Ende, A.H.G., 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes. *Mycoses*. 41, 183-189.
- Glass, N. L., Jacobson, D. J., Patrick, K. T. S., 2000. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annual Review of Genetics*. 34, 165-186.
- Glienke, C. Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD. Curitiba, 1995. 115 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná.
- Glienke, C., Pereira, O.L. , Stringari, D. , Fabris, J. , Kava-Cordeiro, V. Galliterasawa, L., Cunnington, J., Shivas, R.G., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. 2011. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. *Persoonia*, 26, in press
- Glienke-Blanco, C. *Guignardia citricarpa* Kiely: Análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro. Piracicaba, 1999. 200p. Tese (Doutorado – área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- Glienke-Blanco, C., Aguilar-Vildoso, C. I, Vieira, M. L. C., Barroso, P. A. V., Azevedo, J. L., 2002. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from *citrus*. *Genetic and Molecular Biology*. 25, 251-255.
- Hall, T., 1999. vA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

- Hickey, P.C., Jacobson, D.J., Read, N.D. & Glass, N.L., 2002. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 37, 109-119.
- Huelsenbeck, J. P. and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Leslie JF, Zeller KA (1996). Heterokaryon incompatibility in fungi – more than just another way to die. *Journal of Genetics*. 75, 415–424.
- Leslie, J. F. 1996. Fungal Vegetative Compatibility – Promises and Prospects. *Phytoparasitica*. 24, 3-6.
- Leslie, J.F., 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology*. 31, 127-150.
- Marek, S.M., Wu, J., Glass, N.L., Gilchrist, D.G., Bostock, R.M. , 2003. Nuclear DNA degradation during heterokaryon incompatibility in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 40, 126-137.
- McONIE, K.C., 1964. Source of inoculum of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen. *Phytopathology*. 54, 64-67.
- Montenegro, D. H., RNA DUPLA FITA EM *Guignardia citricarpa*: OBTENÇÃO, CURA, TRANSMISSÃO E ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS. Curitiba, 2010, 93 p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- NAPPO: Black Spot *Citrus*, Florida, EE. UU., First report», <http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=421> (consultado em 2010).
- Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Puhalla, J. E., 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany*, 63, 179-183.
- Raeder, U., Broda, P., 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*. 1, 17-20.
- Rodrigues, K.F., Sieber, T.N., Grünig, C.R., Holdenrieder, O., 2004. Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR_PCR amplifications and ITS-5,8S-ITS2 sequences. *Mycological Research, Cambridge*. 108, 45-52.
- Saupe, S.J., 2000. Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64, 489–502.
- Schubert, T., Sutton, B., Ayyamperumal, J. Citrus Black Spot (*Guignardia citricarpa*) discovered in Florida. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry. Pest Alert, Florida, 5, abr, 2010.
- Stringari, D. , Glienke, C. , Christo, D., Maccheroni, W. Jr, Azevedo, J.L., 2009. 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*. 52, 1063-1073.
- Stringari, D. Estudo da variabilidade genética de *Guignardia* spp. por meio de marcadores RAPD e sequências ITS. Curitiba, 2004, 101p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- Stringari, D. Sistemática e Diversidade Genética de Isolados de *Guignardia* spp. E *Phyllosticta* sp. nos Estados do Paraná e São Paulo, 2009. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, da Universidade Federal do Paraná.

- Swofford, D. L., 1998. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4.00. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22, 4673–4680.
- Vázquez, H., 2007. Notificación de plaga: Mancha negra de los cítricos causada por El hongo *Guignardia citricarpa* Kiely (*Phoma citricarpa* Mc Alpine), Centro Nacional de Sanidad Vegetal. Ministerio de la Agricultura, La Habana.
- White, T.M., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J., WHITE, T.J. (Eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990. 315–321.
- Wulandari, N.F., To-Anun, C., Hyde, K.D., Duong, L.M. DE Gruyter, J., Meffert, J.P., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. , 2009. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of Citrus maxima in Asia. *Fungal Diversity*. 34, 23-39.

7. DISCUSSÃO

O Brasil destaca-se na citricultura, sendo detentor de um terço da produção mundial e 85% da produção internacional do suco de laranja, representando uma das principais atividades do agronegócio brasileiro (AGRIANUAL 2009; ASSOCITRUS, 2010). Entretanto, a União Européia considera *G. citricarpa* um sério risco fitossanitário e tem imposto restrições a importação de frutos (BAAYEN et al., 2002). A MPC prejudica a exportação devido à barreira fitossanitária, por ser uma doença quarentenária, onde a tolerância de fruto com sintoma é zero, a exportação de frutos *in natura* é limitada (BALDASSARI et al. 2008). Em ocorrências severas, os frutos podem cair prematuramente, comprometendo a produtividade das plantas e como consequência as exportações do suco.

As medidas de controle da doença atualmente baseiam-se no emprego de tratamentos culturais e principalmente no controle químico, no entanto, o uso de fungicidas protetores e sistêmicos acarreta num aumento significativo do custo na produção, causa contaminações para o meio ambiente e aumenta a pressão de seleção sobre a população de fitopatógenos.

Devido à complexidade da epidemiologia da doença, os resultados de controle muitas vezes têm se mostrado aquém dos desejados. Dada às características biológicas do fungo *G. citricarpa* e à dinâmica da MPC (Spósito, 2003), faz-se necessário a adoção, de forma integrada, de várias medidas com o objetivo da otimização do seu controle.

O presente estudo relata pela primeira vez a transformação pelo sistema ATMT de *G. citricarpa* e de um isolado endofítico do gênero de *Xylaria*, potencialmente capaz de atuar no controle da MPC. A transformação via *A. tumefaciens* em fungos filamentosos apresenta inúmeras vantagens em relação aos métodos convencionais de transformação genética, tratando-se de uma metodologia simples e barata que permite alta eficiência de transformação.

A agrotransformação vem sendo muito empregada para obtenção de fenótipos mutantes e identificação de genes a estes relacionados pela possibilidade da identificação de genes interrompidos (MICHELSE et al., 2005). A constatação de integração de cópia única em sítios aleatórios, no genoma hospedeiro favorece a

obtenção de fenótipos mutantes e a identificação de genes de interesse via mutagênese insercional aleatória, sendo empregados nos estudos de interação fungo-planta para identificação de genes relacionados à patogenicidade (MULLINS e KANG, 2001). Este sistema também pode ser útil para mutação sítio dirigida, mediante recombinação homóloga entre a região do T-DNA e do genoma do hospedeiro (MOON *et al.*, 2008).

Grande parte da sistemática de fungos endofíticos e patogênicos é baseada na especificidade de hospedeiros e no tipo de relação que o fungo tem com a planta. Com o desenvolvimento do protocolo de agrotransformação para *G. citricarpa* com auxílio de gene repórter, como o *gfp*, será possível o estudo de microscopia da interação entre o fungo e as plantas axênicas de citros. GFP não precisa de substrato exógeno e sua expressão não modifica o tecido examinado, tornando-se um marcador ideal em estudos de interação planta-patógenos.

Guidetti-Gonzalez (2009) destaca no seu estudo dos genes diferencialmente expressos identificados na interação *C. sinensis-G. citricarpa*, que a interação entre plantas e micro-organismos patogênicos são específicas, complexas e dinâmicas. O estudo da interação planta-patógeno pode ser eficiente na descoberta do controle mais efetivo à doença, uma vez que será possível o acompanhamento do patógeno em diferentes estágios de colonização. Um exemplo é o estudo de *Cochliobolus heterostrophus*, no qual a expressão da proteína fluorescente GFP foi usada como repórter no estudo da interação deste patógeno com plantas de milho (MAOR *et al.*, 1998).

É crescente o interesse na busca por fungos endofíticos e na descoberta de compostos bioativos que poderão ser utilizados como ferramentas no controle de fitopatógenos, em especial ao controle do fitopatógeno *G. citricarpa*. Fungos endofíticos podem interromper alguma etapa do estágio da doença ou do ciclo de vida do patógeno através de diversos mecanismos, tais como: parasitismo, produção de antibióticos e enzimas hidrolíticas, competição por nutrientes e nichos de colonização (PUNJA e UTKHEDE, 2003).

Os processos de transformação genética em fungos endofíticos são promissores para o estudo das interações e entendimento dos processos de colonização da planta hospedeira. É provável que os diferentes mecanismos atuem

em sinergia durante a interação antagônica e a utilização destes micro-organismos pode proporcionar diferentes níveis de controle, desde a prevenção da infecção, redução da colonização, diminuição da esporulação ou da sobrevivência do patógeno.

As linhagens endofíticas 69JES e 70JES foram identificadas no presente trabalho como *Xylaria* sp. por meio de sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA. O gênero *Xylaria* é uma fonte rica de metabólitos secundários com inúmeras funções biológicas como antioxidantes, antitumorais e antimicrobianos (LIU *et al.* 2007; PONGCHAROEN *et al.*, 2008; JIMÉNEZ-ROMERO *et al.*, 2008; HU, 2008; LI *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2010).

Embora o gênero *Xylaria* tenha grande aplicação biotecnológica e tenha tido seus compostos elucidados exaustivamente para descoberta de novas drogas, não há relatos na literatura de estudos que descrevam a transformação genética para fungos deste gênero pelo sistema ATMT. Além disso, este é o primeiro relato de espécies de *Xylaria* isoladas como endofíticas de espinheira-santa, com ação antimicrobiana contra *G. citricarpa*.

O entendimento de como se dá a ocorrência de reações de compatibilidade sexual e incompatibilidade vegetativa entre e dentro de isolados de *G. citricarpa*, *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis* adquire importância relevante. A identificação de VCGs dentro de uma população morfológicamente homogênea permite identificar subpopulações geneticamente isoladas com respeito aos locos *vic*, as quais podem ser relacionadas as características agrônômicas distintas, como patogenicidade ou localização geográfica dos isolados (LESLIE, 1993).

Os resultados da caracterização molecular corroboram com os encontrados na formação dos grupos de compatibilidade vegetativa (Figura 4), no qual, apesar das linhagens de *G. citricarpa* formarem grupos de compatibilidade, elas se inter-relacionam.

Como nem sempre os frutos apresentam sintomas aparentes e outras doenças cítricas por vezes apresentam sintomas semelhantes à MPC, a precisão na identificação e no entendimento da forma de atuação e de colonização das duas espécies justifica sua grande importância econômica.

8. CONCLUSÕES GERAIS

- A agrotransformação de *G. citricarpa* é viável e transformantes expressando a proteína GFP foram obtidos com sucesso, possibilitando estudos de controle biológico;
- Isolados de espinheira-santa tem potencial para o controle biológico de *G. citricarpa*;
- Isolados endofíticos de espinheira-santa do gênero *Xylaria* sp. apresentaram atividade antimicrobiana contra *G. citricarpa*;
- A agrotransformação de *Xylaria* sp. é viável na obtenção de transformantes que expressam a proteína GFP;
- As linhagens de *G. citricarpa*, *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis* apresentam grupos de compatibilidade vegetativa, havendo contato e fusão de hifas entre elas, porém as sequências das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA e parcial do gene $\alpha 1$ do fator de alongação formam grupos geneticamente distintos e portanto, devem existir mecanismos genéticos que restringem a formação de heterocários.
- As linhagens de *G. citricarpa* apresentam incompatibilidade vegetativa, entretanto não houve a formação de grupos consistentes, que não podem ser explicados pela ação do gene *vir*.

9. PERSPECTIVAS

Apesar do esforço e volume de pesquisas, ainda sabe-se pouco sobre a genômica funcional de *G. citricarpa*. Um sistema de transformação eficiente é uma ferramenta importante para a manipulação de genes deste fitopatógeno. Até o presente momento não havia mutantes geneticamente definidos nem um sistema de transformação eficiente, que permitissem a caracterização e análise funcional de genes e de seus produtos, além da distinção entre o processo de infecção de *G. citricarpa* e a colonização do hospedeiro por espécies endofíticas potencialmente capazes de inibir a MPC.

Da mesma forma, a agrotransformação do isolado endofítico 69JES de *Xylaria* sp., que apresentou atividade antagonista contra *G. citricarpa*, será útil para análise de microscopia da interação baseada endofítico-planta-patógeno e endofítico *versus* patógeno. Tal ferramenta pode ser utilizada como mutagênica para o estudo visando à identificação de genes de importância biotecnológica relacionada à síntese de compostos bioativos no controle de MPC.

Uma importante estratégia para o estudo da ação de controladores biológicos *in vivo*, é a utilização de transformantes expressando proteínas fluorescentes, que podem ser visualizadas sob microscopia de epifluorescência. A obtenção de transformantes da linhagem 69JES de *Xylaria* sp. expressando a proteína GFP, contribuirá para elucidar a atuação e a interação deste frente ao fitopatógeno *G. citricarpa* no interior da planta abrindo um horizonte de possibilidades de estratégias para fins de controle biológico.

O sistema de agrotransformação desenvolvido para *G. citricarpa* possibilitará a visualização das fusões de hifas que estão ocorrendo entre as linhagens e as reações de compatibilidade, por meio de microscopia de epifluorescência.

Como o protocolo foi eficaz na transformação de *G. citricarpa*, o mesmo poderá ser realizado com linhagens de *P. capitalensis*, utilizando um gene repórter diferente, possibilitando a visualização das interações que ocorrem e um entendimento melhor das rotas de colonização entre linhagens patogênicas e endofíticas, bem como a formação dos grupos de compatibilidade vegetativa.

10. REFERÊNCIAS

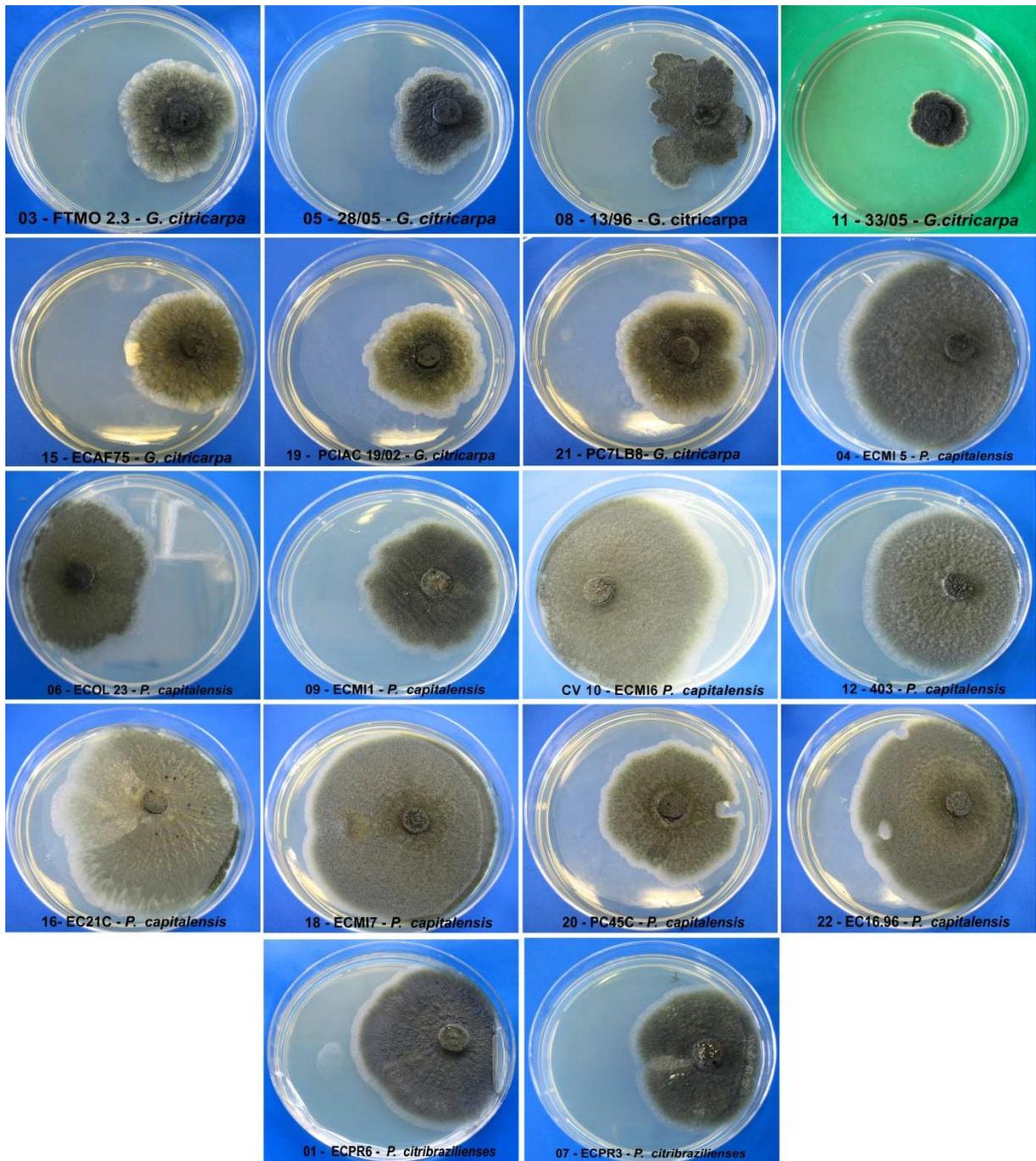
- AGRIBUS, 2009. ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA SÃO PAULO, 267-285.
- ARNOLD, A. E. 2008. Endophytic fungi: hidden components of tropical community ecology., Henk, D. A., Eells, R. L., Lutzoni, F., Vilgalys, R.. 2007. Diversity and phylogenetic affinity of foliar endophytes associated with loblolly pine inferred by culturing and direct PCR. *Mycologia*. 99,185–206.
- ASSOCITRUS 2010. [HTTP://WWW.ASSOCITRUS.COM.BR/DOWNLOADS/28](http://www.associtrus.com.br/downloads/28) INFORMATIVO ASSOCITRUS JANEIRO FEVEREIRO 2010. PDF. ACESSO EM 16/08/2010.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. *Ecologia Microbiana*. Editora EMBRAPA, Jaguariúna-SP. 117-137, 1998.
- AZEVEDO, J. L., MACCHERONI JR., PEREIRA, J. O., ARAÚJO, W. L., 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Microbiology*. 3, 40-65.
- 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. , 2002. NONPATHOGENIC STRAINS OF THE CITRUS BLACK SPOT FUNGUS, *Guignardia citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of 52 Woody Plants, *Guignardia mangiferae*, (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology*. 92, 464-477
- BACKMAN, P.A. , SIKORA, R.A. , 2008. Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control*. 46, 1-3.
- BACON, C.W., WHITE, J.F., JR. (Eds.), 2000. *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker, NY, 487p.
- BALDASSARI, R.B., WICKERT, E., GOES, A. 2008. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* is olated from Citrus spp.. *European Journal of Plant Pathology*. 120: 103-110.
- CABI (2006) *Crop protection compendium edition*. CAB International, Wallingford (GB).
- EPPO Bulletin. 36, 459–460. EPPO (2006) *Documentation and reporting on a diagnosis*. Bulletin
- FIGUEIREDO, J. G., BIOPROSPECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ENDÓFITOS DE *Maytenus ilicifolia*, COM ÊNFASE EM *Pestalotiopsis* spp. Curitiba, 2006, 152p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- GLASS, N. L., JACOBSON, D. J., PATRICK, K. T. S., 2000. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annual Review of Genetics*. 34, 165-186.
- GLIENKE-BLANCO, C., AGUILAR-VILDOSO, C. I, VIEIRA, M. L. C., BARROSO, P. A. V., AZEVEDO, J. L., 2002. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from *citrus*. *Genetic and Molecular Biology*. 25, 251-255.
- GUIDETTI-GONZALEZ, S. Identification of genes involved in defense against pathogens in the CitEST databank and in macroarrays of *Citrus sinensis-Guignardia citricarpa* interaction. Piracicaba, 2009. 200p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

- HU, Z.-Y., LI, Y.-Y., HUANG, Y. J., SU, W.-J., SHEN, Y.-M. , 2008. Three New Sesquiterpenoids from *Xylaria* sp. NCY2. *Helvetica Chimica Acta*. 91, 46–52
- JIMÉNEZ-ROMERO, C., ORTEGA-BARRIA, E., ARNOLD, A. E. , CUBILLA-RIOS, L. , 2008. Activity against *Plasmodium falciparum* of lactones isolated from the endophytic fungus *Xylaria* sp. *Pharmaceutical Biology*. 46, 1–4.
- LESLIE, J.F., 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology*. 31, 127-150.
- LI, Y.-Y., HU, Z.-Y., LU, C.-H., SHEN, Y.-M. , 2010. Four New Terpenoids from *Xylaria* sp. 101. *Helvetica Chimica Acta*. 93, 796–802.
- LIU, K., DING, X. , DENG, B. , CHEN, W. , 2010.10- Hydroxycamptothecin produced by a new endophytic *Xylaria* sp., M20, from *Camptotheca acuminata*,” *Biotechnology Letters*. 32, 689–693.
- LIU, X., DONG, M., CHEN, X., JIANG, M. LV X., YAN, G. , 2007. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*,” *Food Chemistry*, 105, 548–554.
- MAOR, R.; PUYESKY, M.; HORWITZ, B.A.; SHARON, A. 1998. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungla-plant interaction on *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycological Research*. v. 102, p. 491-496.
- MICHIELSE, C. B., HOOYKAAS, P. J., VAN DEN HONDEL, C. A., RAM, A. F., 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetic*. 48, 1–17.
- MOON, Y.-S., DONZELLI, B.G.G., KRASNOFF, S.B., MCLANE, H. , GRIGGS, M.H. , COOKE, P., VANDENBERG, J.D. , GIBSON, D.M. , CHURCHILL, A.C.L. 2008. *Agrobacterium* mediated disruption of a nonribosomal peptide synthetase gene in the invertebrate pathogen *Metarhizium anisopliae* reveals a peptide spore factor. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 4366-4380.
- MULLINS, E.D., KANG, S., 2001. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. *Life Sci*. 58, 2043–2052.
- PONGCHAROEN, W., RUKACHAISIRIKUL, V., PHONGPAICHIT, S., KÜHN, T., PELZING, M., SAKAYAROJ, J., TAYLOR, W.C. , 2008. Metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-D14. *Phytochemistry*. 69, 1900–1902.
- PUHALLA, J. E., 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany*, 63, 179-183.
- PUNJA, Z.K.; UTKHEDE, R.S., 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology*, v.21, n. 9, p.400-407.
- RODRIGUES, I. M. C., SOUZA FILHO, A. P. S., FERREIRA, F. A. , 2009. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. *Planta Daninha*. 27, 507-513.
- SCHULZ, B. J. E. Mutualistic interactions with fungal root endophytes. In: SCHULZ B. J. E. , BOYLE, C.J.C., SIEBER, T.N., eds. , 2006. *Microbial root endophytes*. Berlin, Germany: Springer-Verlag. 261–280.
- SILVA, G.H. , OLIVEIRA C.M., TELES H.L., PAULETTI, M.P., CASTRO-GAMBOA, I., SILVA, D.H.S., BOLZANI, V.S. , YOUNG M.C., COSTA-NETO, C.M. , PFENNING, L.H., BERLINCK R.G.S. , ARAUJO, A.R. , 2010. Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae), *Phytochemistry Letters*. 3 164–167.
- SPÓSITO, M. B. Dinâmica temporal e espacial da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Piracicaba, 2003. 112p. Escola Superior de Agricultura ‘Luis de Queiróz’, Universidade de São Paulo.

- STRINGARI, D. , GLIENKE, C. , CHRISTO, D., MACCHERONI, W. JR, AZEVEDO,J.L., 2009. 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*. 52, 1063-1073.
- YU, H. ZHANG, L., LI, L., ZHENG, C., GUO, L., LI, W., SUN, P., QIN L. , 2010. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*. 165, 437– 449.
- WULANDARI, N.F., TO-ANUN, C., HYDE, K.D., DUONG, L.M. DE GRUYTER, J., MEFFERT, J.P., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. , 2009. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of Citrus maxima in Asia. *Fungal Diversity*. 34, 23-39.

APÊNDICES

APÊNDICE 1: LINHAGENS DE *G. citricarpa*, *P. capitalensis* e *P. citribraziliensis* UTILIZADAS NO ESTUDO DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA E ENCONTRO DE HIFAS APÓS 7 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO CFN A 28°C



APÊNDICE 2: TRANSFORMAÇÃO DE *G. citricarpa* MEDIADA POR *A. tumefaciens*

1. Material Biológico

A linhagem selvagem de *G. citricarpa* LGMF06 isolada de lesões de MPC em São Paulo, Brasil, apresenta teste de patogenicidade por Baldassari et al. 2008 e faz parte do banco de material biológico do Laboratório de Microrganismos (LabGeM) da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil estocada em Meio Citrus Fabris-Nishimura (20 g/L de glicose, 15 g/L de ágar, pH 5.8 ajustado com HCl) (CFN). *A. tumefaciens* EHA-105 contendo o vetor binário foi gentilmente cedida por G. Pasquali (Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul) e estocada em meio Luria–Bertani.

Para a agrotransformação foi seguiu a metodologia descrita por Covert et al. (2001), Reis et al. (2004), Staats et al. (2007), com modificações. O vetor contém o gene de resistência a canamicina e os genes de expressão da proteína GFP e da enzima fosfotricina acetiltransferase (gene *bar* que confere resistência ao glifosinato de amônio) para seleção dos transformantes fúngicos.

A amplificação do plasmídeo foi utilizada a linhagem de *E. coli* DH10 com tratamento por cloreto de cálcio e choque térmico.

2 Agrotransformação de *G. citricarpa*

A cepa EHA105 de *A. tumefaciens*, previamente transformada com o plasmídeo pPZP201BK, foi inoculada em 10 mL de Luria e Bertani (LB) (10,0 g de tripton, 5,0 g de extrato de levedura, 0,2 g de cloreto de potássio, 0,6 g de cloreto de cálcio, água destilada q.s.p 1000,0 mL) acrescido de canamicina (100 µg/mL) e mantida em incubação à temperatura de 25°C (180 rpm / 24 a 48 horas). Após este período foi adicionado o volume da cultura necessário para OD₆₆₀ final de 0,15, em dois frascos, um contendo meio IM (10 mM K₂HPO₄, 10mM KH₂PO₄, 2.5 mM NaCl, 2 mM MgSO₄, 0.7 mM CaCl₂, 9 mM FeSO₄, 4mM, NH₄SO₄, 10 mM glicose, 40 mM 2-[N-morpholino] ácido etano sulfônico, pH 5.3, 0.5% glicerol (w/v),) com ou sem 200

$\mu\text{mol l}^{-1}$ AS. Os frascos foram incubados a 28°C a uma rotação de 180 rpm, até atingir OD₆₆₀ entre 0,4 e 0,5. Enquanto isso, placas de Petri foram preparadas contendo membranas de celofane dispostas sobre o meio IM sólido (1% de ágar) e meio IM + AS. Uma suspensão de conídios foi preparada (1×10^6 conídios/ mL, aproximadamente) e misturada a 100 μL da suspensão de células bacterianas cultivadas em IM+AS (líquido) em um *eppendorff*. A mistura foi vertida sobre membrana disposta em placas de Petri contendo IM+AS (IMAS) ou apenas IM Com o auxílio de uma alça de Drygalsky a mistura foi espalhada sobre o meio. Para as placas controle foi utilizada solução salina 0,85% (p/v) ao invés da suspensão de células bacterianas. As co-culturas foram incubadas a 28°C por dois dias (período de co-cultivo).

Posteriormente sobre as membranas de celofane foram vertidos 10 mL de meio seletivo ((mesmo meio IM, com 5 mM ao invés de 10 mM glicose e 0,7% de ágar), acrescido de glifosinato de amônio (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para a seleção de agentes fúngicos transformantes, e cefotaxima (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para inibir o crescimento de *A. tumefaciens*. As placas foram incubadas a 28°C durante um período de 7 a 10 dias. Após este período, os supostos transformantes que emergiram do meio seletivo foram transferidos para placas de Petri previamente preparadas com meio seletivo, acrescido de glifosinato de amônio (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

3 Estabilidade mitótica

Para determinar a estabilidade mitótica dos transformantes, os supostos transformantes foram cultivados em meio seletivo por três gerações na ausência de glifosinato de amônio (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Posteriormente deu-se a inoculação em seletivo contendo glifosinato de amônio (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

4 Análise dos transformantes com microscopia fluorescente

As linhagens de *G. citricarpa* (controle) e as linhagens dos transformantes foram cultivadas por um período de 1 a 4 dias, e submetidas à análise de microscopia fluorescente. As imagens foram capturadas para análise dos resultados

usando um microscópio Leica UV (DMKLB ou MZFL111) com filtros de 488 nm de excitação e emissão de 515 nm. As imagens foram editadas usando Picasa 3.1.0 *software* .

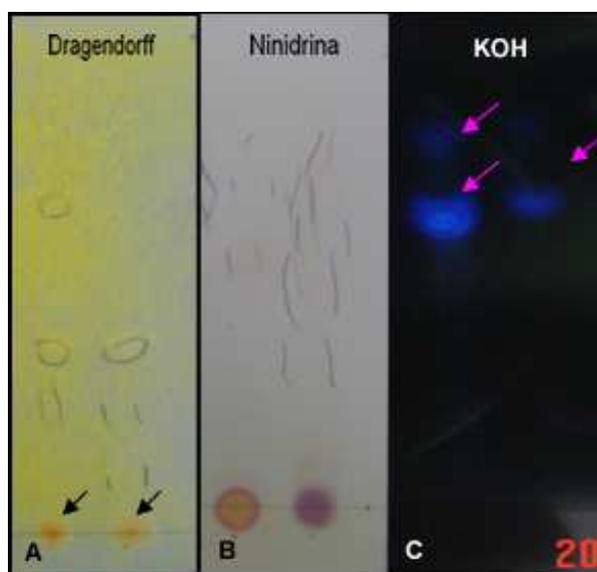
5 PCR

Para detecção dos transgenes em *G. citricarpa* por PCR, o DNA total foi extraído de micélio em crescimento no meio CFN, durante 3 dias. O micélio foi liofilizado e macerado em nitrogênio líquido. DNA genômico foi obtido de acordo com o método descrito por Raeder and Broda (1985), e modificado por Glienke-Blanco et al.(2002). A reação dos 49 possíveis transformantes foi realizada em termociclador (Mastercycler, Eppendorf) usando os oligonucleotídeos barR (5'TCAGATCTCGACGGG3") e barF (5'ATGAGCGAACGACGC3'). Para reação foi utilizado 50 ng de DNA total de *G. citricarpa*, 3 mM MgCl₂, 4 μM de cada oligonucleotídeo, 0.2 mM de cada dNTP (Invitrogen[®]), tampão de PCR 1 X , e 1.5 unidades de *Taq* polymerase (Invitrogen[®]). As condições da PCR foram: 94°C, 30s; 60°C, 30s and 72°C, 45s, por 30 ciclos. O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV (Ultraviolet Benchtop transilluminators) e fotografado (Digi doc it *software*).

6 Análise de Southern blot

DNA genômico purificado (10 μg) dos possíveis transformantes e da linhagem selvagem foram digeridos com *Bam*HI, *Eco*RI and or *Pst*I, analisados em gel de agarose 1%, passando por capilaridade para membrane Amersham Hybond-N+ (Buckinghamshire, UK), usando protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001). A hibridização ocorreu de acordo com altas condições de estringências recomendada pelo fabricante Amersham Genes Images Alkphos Direct Labeling e sistema de detecção Detection System (Buckinghamshire, UK) usando uma sonda de DNA com o gene bar com 600 bp.

APÊNDICE 3: CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS METANÓLICOS DE ISOLADOS DE *Xylaria* sp.



CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA REVELADA COM DRAGENDORFF (A) INDICANDO A PRESENÇA DE COMPOSTO ALCALÓIDE. (B) COM NINIDRINA INDICANDO A PRESENÇA DE AMINAS PRIMÁRIAS E DE AMINAS TERCIÁRIAS. (C) COM HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO EVIDENCIANDO A PRESENÇA DE COMPOSTOS DO TIPO CUMARINAS.

NOTA: Extratos metanólicos dos isolados 70JES e 69JES, respectivamente.