

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
CAMILA DA COSTA SENKIV

Avaliação de lesões produzidas por transformantes de *Phyllosticta citricarpa* em  
frutos de citros destacados

Trabalho de monografia apresentado ao  
Curso de Ciências Biológicas pelo  
Departamento de Genética da Universidade  
Federal do Paraná.

Orientadora: Profª Dra. Chirlei Glienke

CURITIBA  
2011

**CAMILA DA COSTA SENKIV**



**Avaliação de lesões produzidas por transformantes de *Phyllosticta citricarpa*  
em frutos de citros destacados**

Monografia apresenta à disciplina BG016 - Estágio em Genética como requisito parcial para a conclusão do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Chirlei Glienke

**CURITIBA**

**2011**

## **DEDICO**

Aos meus pais, Carlos e Cinthya.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial aos meus pais, Carlos e Cinthya, e minha irmã Joana, pelo amor inestimável, pelo incentivo, pelo exemplo de vida, por me ensinarem de que nenhum sonho é grande demais. Obrigada por me ajudar a ser quem eu sou, por formarem a melhor família que alguém poderia querer. Amo vocês!

Agradeço a toda a minha linda família, meus avós, tios e primos, pelo companheirismo, pelas risadas, pelos bons momentos. Sem vocês, eu não estaria onde estou hoje.

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

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos por todo o apoio, em especial à Msc. Juliana Marta Muehlmann Fischer, que tanto me ajudou no início do meu trabalho, ao Alan Antonio Torques, pela amizade tanto dentro quanto fora do laboratório, e ao Eduardo Goulin, amigo e profissional que me inspira grande admiração, por toda a ajuda prestada.

Ao Antônio E. M. L. Marques, pelo amor, pelo carinho, pela compreensão, por todas as risadas, por todos os momentos, por ser mais do que meu namorado, por ser também meu melhor amigo.

Ao Fábio “Japa” Yamasaki, Vinicius Richardi, Diego Venantte, Joyce Kurosawa, Karin Arruda, Tiago Malucelli, Samuel Schwaida e demais amigos da turma de 2007/1 de Ciências Biológicas UFPR, pela amizade, pelos inesquecíveis momentos que passamos juntos e pelos momentos que ainda estão por vir. Em especial à minha querida amiga Thalita Tuleski, irmã de coração e um exemplo de grande pessoa e profissional.

À Jéssica Dal Col, minha melhor amiga desde os 10 anos, que me ensinou que, quando é para ser, a amizade supera qualquer coisa.

À Lisa Welch, por todo o apoio e amizade, apesar dos 10.000 km que nos separam.

Ao CNPq e ao FUNDECITRUS pelo apoio financeiro

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

### Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1</b>	<b>MANCHA PRETA DOS CITROS E SEU AGENTE ETIOLÓGICO: <i>Phyllosticta citricarpa</i>.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2</b>	<b>TRANSFORMAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3</b>	<b>MARCADORES FLUORESCENTES .....</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAS E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
<b>5.1</b>	<b>INDUÇÃO E DESENVOLVIMENTOS DAS LESÕES .....</b>	<b>22</b>
<b>5.2</b>	<b>ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS TRANSFORMANTES .....</b>	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>33</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1 - DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES;</b> .....	<b>23</b>
<b>FIGURA 2 - AVALIAÇÃO DOS TRANSFORMADOS QUANTO A CAPACIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE LESÕES DE MPC;</b> .....	<b>244</b>
<b>FIGURA 3 - AVALIAÇÃO DOS TRANSFORMADOS QUANTO A CAPACIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE LESÕES DE MPC EM LIMA ÁCIDA TAHITI.;</b> .....	<b>25</b>
<b>FIGURA 4 - AVALIAÇÃO DOS TRANSFORMADOS QUANTO A CAPACIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE LESÕES DE MPC;</b> .....	<b>26</b>
<b>FIGURA 5 – FOTOMICROGRAFIA DOS TRANSFORMANTES EM MICROSCOPIA DE CONFOCAL EMITINDO FLUORESCÊNCIA;</b> .....	<b>27</b>
<b>FIGURA 6 - FOTOMICROGRAFIA DA LINHAGEM TRANSFORMADA 228_</b> .....	<b>28</b>
<b>FIGURA 7 - FOTOMICROGRAFIA DA LINHAGEM TRANSFORMADA 16</b> .....	<b>28</b>
<b>FIGURA 8 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5% DO PRODUTO DE PCR EVIDENCIANDO A AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE 600 PB DO GENE BAR NO TRANSFORMANTE LINHAGEM 5.....</b>	<b>29</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – MÉDIAS (EM MILÍMETROS) HORIZONTAL E VERTICAL DAS LESÕES DE MPC E INJÚRIAS (CONTROLES NEGATIVOS) APÓS 53 DIAS DA INOCULAÇÃO, COMPARANDO 4 LINHAGENS TRANSFORMADAS EM FRUTOS DE LARANJA EM 3 ESTÁDIOS FENOLÓGICOS E EM LIMA ÁCIDA TAHITI.....26

## RESUMO

A citricultura destaca-se no Brasil, como uma das atividades mais representativas do agronegócio brasileiro. O país é responsável por um terço da produção mundial e por 85% da produção internacional do suco de laranja. Assim, a citricultura é de grande importância agroeconômica para o país, de forma que sua produção não pode estar suscetível a grandes perdas. Entretanto, a citricultura é afetada por vários problemas de ordem fitossanitária, dentre eles o fungo *Phyllosticta citricarpa*, responsável pela doença conhecida como Mancha Preta dos Citros (MPC), afetando praticamente todas as espécies de citros com importância econômica. Os frutos com sintomas apresentam pontuações escuras, descoloração, lesões deprimidas e manchas pretas, são impedidos de serem exportados devido às barreiras fitossanitárias e tem seu valor comercial depreciado, pois não são atrativos ao consumidor. Apesar da importância da doença, ainda há falta de informação sobre ela. Entre as dificuldades que impedem a investigação está a ausência de um método de inoculação específico, prático, confiável e eficaz. Sendo descrito pelo grupo um sistema de agrotransformação para o fungo *P. citricarpa*, sendo os transformantes capazes de expressar a proteína fluorescente verde GFP (Green Fluorescent Protein), para este trabalho, quatro linhagens transformadas foram selecionadas para teste de metodologia e estudo de infecção e colonização. As linhagens foram inoculadas em frutos destacados e comparadas com a linhagem selvagem, juntamente com seu desenvolvimento em lima ácida Tahiti, que não é suscetível à MPC. A metodologia testada foi eficiente, sendo todas as linhagens testadas capazes de causar lesões nos frutos, embora não foi observar diferenças entre as linhagens transformadas em relação à linhagem selvagem quanto à produção de lesões. A lima ácida Tahiti não foi suscetível às linhagens transformadas.

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

## ABSTRACT

The citrus plantation stands out in Brasil, as one of the most representative activity of the country's agribusiness. Brasil is responsible for one third of the world production and 85% of international production of orange juice. Therefore, citrus is very important for the country's agribusiness and cannot be susceptible to big losses. However, this culture is affected by many problems of phytopathology, among them, the fungi *Phyllosticta citricarpa*, responsible for the disease known as Citrus Black Spot, affecting practically all species of citrus with economic importance. Fruits with symptoms show black spots, discoloration and depressed lesions, and are prevented for exportation due to the phytosanitary barriers. Among the difficulties that prevent the disease investigation is the absence of a specific, practical, effective method of inoculation. As our research group described an agrotransformation to the fungi *P. citricarpa*, and the transformants capable of express the Green Fluorescent Protein (GFP), for this research work, four transformed strains were selected for the methodology test. The strains were inoculated on detached fruits and compared with the wild strain, along with its development in Tahiti lime, which is not susceptible to MPC. This methodology was efficient, being all the tested transformed strains capable of causing lesions on the fruits, although no statistical differences were observed between the wild strain and the transformed strain when it comes of causing lesions. As it happens with the wild strain, the Tahiti lime was not susceptible to the wild strains as well.

Key words: Citrus Black Spots, *Phyllosticta citricarpa*, agrotransformation, Green Fluorescent Protein (*gfp*).

## 1 INTRODUÇÃO

A citricultura destaca-se no Brasil, como uma das atividades mais representativas do agronegócio brasileiro. O país é responsável por um terço da produção mundial e por 85% da produção internacional do suco de laranja (AGRIANUAL, 2009). A laranja é o sexto produto agrícola brasileiro mais exportado, conferindo a citricultura destacável importância sócio-econômica (FAO, 2005), sendo a União Europeia o maior mercado comprador (NEVES *et al.*, 2004).

No Brasil, o cultivo de citros está presente em vários municípios, principalmente nos estados de São Paulo, Sergipe, Bahia, Goiás, Minas Gerais, Pará e Paraná (CULTIVAR, 2009). A produção para o mercado nacional refere-se principalmente a comercialização da fruta *in natura* (IBGE, 2007),

Assim, a citricultura é de grande importância agroeconômica para o país, de forma que sua produção não pode estar suscetível a grandes perdas. Entretanto, a citricultura é afetada por vários problemas de ordem fitossanitária.

Dentre os patógenos causadores de doenças, encontra-se o fungo *Guignardia citricarpa* Kiely (forma anamórfica *Phyllosticta citricarpa* VAN DER AA), responsável pela doença conhecida como Mancha Preta dos Citros (MPC). Ela afeta praticamente todas as espécies de citros com importância econômica, especialmente as laranja doces (*Citrus sinensis*). A laranjeira azeda (*Citrus aurantium*. L.) e a limeira ácida Tahiti (*Citrus latifolia* Osbeck) são resistentes a esse fungo (Kotzé, 1981).

Os frutos com sintomas apresentam pontuações escuras, descoloração, lesões deprimidas e manchas pretas. O tipo de lesão depende da fase fenológica do fruto, do tipo de esporo e das condições climáticas em que os pomares se encontram. Trata-se de um patógeno quarentenário A1 na União Europeia, assim, seus países possuem rigorosas barreiras sanitárias para limitar a entrada de frutos com sintomas de MPC (BONANTS *et al.*, 2003; BALDASSARI; WICKERT; GÓES, 2008; ROSSMAN, 2009).

Já em relação ao mercado interno, este também sofre com a presença da MPC, pois apesar da qualidade interna do fruto não ser comprometida pela doença, ele tem seu valor comercial depreciado, devido aos sintomas na casca, estes frutos são menos atrativos ao consumidor.

Hoje, o controle da MPC se dá, principalmente, pelo emprego de fungicidas, que devem ser pulverizados várias vezes, devido ao longo período de suscetibilidade dos frutos, de no mínimo 24 semanas (BALDASSARI *et al.*, 2006), o que eleva o custo do controle para o produtor e acaba encarecendo o produto. Além disto, a queda prematura dos frutos causada pelos fungicidas também acaba comprometendo a produção.

Por isso, a busca de alternativas eficientes de controle, que sejam mais baratas e menos prejudiciais a produção, bem como mais sustentáveis, são necessárias e imprescindíveis, o que torna evidente a relevância de seu estudo. Apesar da importância da doença, ainda existem diversos aspectos há serem estudados. Entre as dificuldades que impedem a investigação está a ausência de um método de inoculação específico, prático, confiável e eficaz (BALDASSARI *et al.*, 2009).

O estudo genético do patógeno era dificultado devido à falta de sistema de transformação genética padronizada para fungos deste gênero. Entretanto, em 2010, Figueiredo *et al.* descreveram um sistema de agrotransformação para o fungo *P. citricarpa*, possibilitando a utilização de linhagens de transformantes em diferentes estratégias.

A agrotransformação, inicialmente desenvolvida para plantas, foi usada por Groot *et al.* (1998) e Covert *et al.* (2001), que descreveram o uso da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* e construíram vetores eficientes para transformação de fungos filamentosos.

Esse processo permite a inserção de DNA exógeno em fungos filamentosos, fitopatógenos ou endofíticos, podendo servir para estudar as interações existentes entre fungo e planta, de modo que seja possível acompanhar, por exemplo, a localização ou a trajetória do fungo a partir da inoculação até a colonização, usando marcadores apropriados. Eckert *et al.* (2005), demonstraram a possibilidade do estudo *in planta* da interação entre fungos agrotransformados com diferentes marcadores fluorescentes, *GFP* e *DsRed*.

Treze linhagens transformantes obtidas por Figueiredo *et al.* (2010) foram previamente submetidas a avaliação que selecionou aqueles que melhor expressavam o gene *gfp in vitro* observando microscópio de epifluorescência,

elevadar taxa de crescimento micelial e maior produção de estruturas de reprodução assexuada em discos foliares de citros, segundo Torques (2011).

As quatro linhagens transformadas que apresentaram melhores resultados (Torques, 2011) foram utilizadas no presente trabalho, e comparadas para teste de metodologia e estudo de desenvolvimento de sintomas, através da comparação do seu desenvolvimento em lima ácida Tahiti, que não é afetado pela doença, bem com a infecção realizada em laranja pela linhagem selvagem de *P. citricarpa*.

## 2 OBJETIVOS

- Testar metodologia de inoculação de linhagens transformadas de *Phyllosticta citricarpa* por injúria em fruto destacado;
- Avaliar a capacidade das linhagens transformadas em produzir lesões de MPC em frutos de laranja comparando com a linhagem selvagem;
- Avaliar se a os transformantes são capazes de produzir lesão em lima ácida Tahiti.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 MANCHA PRETA DOS CITROS E SEU AGENTE ETIOLÓGICO: *Phyllosticta citricarpa*

Entre os principais causadores de consideráveis perdas para citricultura brasileira destaca-se a Mancha Preta dos Citros, descrita pela primeira vez em 1895 por Kiely, na Austrália (KIELY, 1948), como sendo responsável por perdas de frutos de laranjeira da variedade Valência.

Em 1925, foi detectado na África do Sul (DOIDGE, 1929), como consequência da importação de mudas provenientes da Austrália, o que tornou impróprio para a exportação mais de 90% dos pomares desprotegidos (ROBBS, 1990). Posteriormente, foi detectada em diversos continentes, entre eles a América do Sul (FEICHTENBERGER, 1996). Atualmente a MPC encontra-se relatada em países da África, Ásia, Oceania, América do Sul, América do Norte e Caribe (ROBBS, BITTENCOURT, 1995).

No Brasil, o primeiro relato da doença foi feito em Piracicaba, interior de São Paulo, em 1940 (AVENA-SACCÁ, 1940). Em 1980, a doença surgiu no Rio de Janeiro, nos municípios de São Gonçalo e Itaboraí, afetando a produção de pomares de 'Tangerina' (GOES, 1990). Em 1992, foi relatada a presença da MPC em frutos de limão verdadeiro e laranja doce, nos municípios de Mogi Guaçu, Mogi Mirim e Conchal (GÓES e FEICHTENBERGER, 1993), espalhando-se de forma endêmica pela região produtora de citros do interior de São Paulo (FEICHTENBERGER, 1996; GÓES, 1998). A facilidade de disseminação pelo vento ou por material propagativo fez com que a doença se espalhasse muito rapidamente. Atualmente a doença está presente praticamente em todos os municípios produtores do Estado de São Paulo, e também em todos os Estados das regiões Sul e Sudeste (COSTA *et al.*, 2003; ANDRADE *et al.*, 2004; BALDASSARI *et al.*, 2004; GASPAROTTO *et al.*, 2004; THEODORO *et al.*, 2004 e CAIXETA *et al.*, 2005). O primeiro registro no Paraná ocorreu em 2006, em tangerinas 'Montenegrina' (*Citrus deliciosa* Tenora), na região do Vale do Ribeira (NUNES, 2006).

O fungo *Phyllosticta citricarpa*, agente etiológico da MPC pertencente à ordem Botryosphaerales, família Botryosphaeriaceae. É um fungo cujo gênero foi descrito

em 1892 por Viala e Ravaz. Apresenta uma fase anamórfica (assexuada) descrita como *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) VAN DER AA.

O ciclo da MPC ocorre pela disseminação dos picnidiósporos (esporos assexuais) e dos ascósporos (esporos sexuais). Em folhas caídas e infectadas, em decomposição, se formam os ascósporos, que podem ser levados pelo vento e disseminar a doença em frutos, folhas ou ramos, a curta ou longa distância. Quando presente no fruto, o fungo causa lesões onde são produzidos os picnidiósporos, que, através da água da chuva, do orvalho ou de irrigação, podem infectar frutos, ramos e folhas.

As lesões causadas pela doença na casca dos frutos é característica por apresentar bordos salientes marrom-escuros e um halo amarelo ao redor, sendo no centro da lesão onde se encontram os picnídios, pontos de coloração preta. A doença pode permanecer em fase latente, sem que apareçam sintomas, sendo o seu aparecimento favorecido por altas temperaturas combinadas com luminosidade (McONIE, 1964, BRODRICK e RABIE, 1970).

### 3.2 TRANSFORMAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

A transformação é um processo onde a célula absorve fragmentos de DNA, exterior a ela, e o incorpora em seu genoma de maneira estável (PIZZIRANI-KLEINER, 1998). Os únicos organismos conhecidos capazes de realizar esse processo naturalmente são bactérias e leveduras, sendo as células de organismos superiores capazes de sofrer transformação em condições artificiais.

A transformação em fungos foi desenvolvida em 1973, onde se empregou o gene para inositol em *Neurospora crassa* (MISHRA e TATUM, 1973). Desde então, novos processos foram criados e atualmente existem diversas metodologias para a realização da transformação em uma grande variedade de fungos.

Os mecanismos utilizados 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). A transformação também pode ser realizada utilizando células intactas, através da biobalística (ARMALEO *et al.*, 1990), onde ocorre o bombardeamento de

células com microprojéteis contendo DNA transformante). O processo de transferência gênica mediada por *A. tumefaciens*, conhecido como agrotransformação (BUNDOCK *et al.*, 1995), desenvolvido mais recentemente, é empregado principalmente para casos em que a utilização de outros sistemas não são viáveis.

O método de agrotransformação baseado na utilização de *A. tumefaciens* foi inicialmente desenvolvido em plantas. *A. tumefaciens* é uma bactéria de solo gram negativa, responsável pelo aparecimento de tumores em células vegetais (KADO, 1991), e tem a habilidade natural de transferir um segmento de DNA (T-DNA) de seu plasmídeo Ti, para o interior de células vegetais ou fúngicas, que se integra ao genoma hospedeiro de forma aleatória (BUNDOCK *et al.*, 1995).

A *A. tumefaciens* é a causadora de uma doença bem conhecida e estudada, caracterizada pelo crescimento de galhas na raiz ou na coroa da planta, chamada galha-da-coroa. Essas galhas, quando isoladas, são capazes de crescer indefinidamente em meio de cultura *in vitro*, sem reguladores de crescimento. Estudos realizados demonstraram que a formação de galhas induzidas por *A. tumefaciens* estava diretamente associada à presença de um 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 conhecimento adquirido sobre a transferência de informação genética da bactéria para uma planta estimulou pesquisas visando utilização deste sistema para a transferência de genes nos mais diversos organismos. Nenhum gene presente no T-DNA, exceto os 25 pb de suas extremidades, é necessário ao processo de transferência e integração do T-DNA, o que garantiu o sucesso na construção de vetores derivados do plasmídeo Ti para introduzir genes exógenos em outros organismos, assim, foi possível eliminar partes ou todo o T-DNA, incluindo os oncogenes, sem afetar o processo de transferência. A região *vir* é essencial para a transferência do T-DNA, pois, contém genes cujos produtos vão promover a excisão e o transporte do T-DNA, o que requer a presença das extremidades direita e esquerda do T-DNA conservadas, mantendo intacta a região *vir*, mas que os oncogenes sejam removidos. Dessa maneira, qualquer outra nova sequência de

DNA, inserida entre as extremidades do T-DNA, pode ser transferida e integrada ao genoma do organismo.

A agrotransformação para fungos é uma técnica que apresenta vantagens em comparação com outras, como por exemplo, não necessita de equipamentos de alto custo, como o eletroporador ou acelerador de microprojéteis, a possibilidade de inserção de qualquer segmento de DNA entre as bordas esquerda e direita (LB e RB) do T-DNA a ser integrado no genoma hospedeiro, a ocorrência de integração do T-DNA em cópias simples em sítios aleatórios no genoma. Além disso, a agrotransformação em fungos alcança uma eficiência de transformação 600 vezes superior àquela obtida com outros métodos.

### 3.3 MARCADORES FLUORESCENTES

As proteínas repórter são uma excelente ferramenta para o estudo da interação entre plantas e microrganismos. Ao utilizar dessa técnica, é possível monitorar o comportamento dos microrganismos transformados nos tecidos da planta, além de não compreender as interações entre os microrganismos que convivem endofiticamente ou patogenicamente com essas plantas (NAHALKOVA e FATEHI, 2003).

Em estudos de interação de dois organismos, a utilização de genes que codificam as proteínas repórter GFP e DsRed, uma para cada organismo, são as mais indicadas, pela facilidade para a microscopia confocal e de epifluorescência, já que o espectro de excitação máxima e emissão de fluorescência são próximos (CLAYTON *et al.*, 2002).

A proteína fluorescente DsRed é responsável pela coloração vermelha em torno do disco oral de um coral do gênero *Discosoma*. Tem sido usado como marcador de expressão gênica, complementar a proteína GFP, homóloga em *Aequorea*. Possui excelente resistência a pH extremos e fotodegradação, porém, como desvantagens apresenta oligomerização forte e maturação lenta, isso pode causar a formação de grandes quantidades de agregados insolúveis que podem transformar o organismo (BAIRD *et al.*, 2000).

O gene *gfp*, clonado da água viva *Aquoria victoria* (CHALFIE *et al.*, 1994) codifica a proteína fluorescente verde (Green Fluorescent Protein), e tem sido um

importante gene repórter utilizado principalmente na visualização da expressão gênica e localização subcelular de proteínas em uma variedade de organismos (TOMBOLINI *et al.*, 1997; BLOEMBERG *et al.*, 2000; MILLER *et al.*, 2000;).

Variantes modificadas em termos de propriedades espectrais (incluindo elevada emissão), solubilidade, preferência de códon e cores da fluorescência (verde, vermelho, azul e amarelo), facilitam e aumentam a gama de aplicações do gene *gfp* como marcador ou gene repórter (BLOEMBERG *et al.*, 2000), além de manter o tecido preservado durante o tempo de análises.

## 4 MATERIAS E MÉTODOS

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

### 4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

A linhagem controle é o LGMF06, as linhagens transformantes utilizadas (linhagem 1, 2, 5 e 16) possuem o gene *bar* (que confere resistência ao glifosinato de amônio) e o gene *gfp* para expressão da proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*).

### 4.2. MEIO ÁGAR-CITROS

Folhas cítricas	28g
Glicose	20g
Água destilada	1000mL
Agar	15g
Glifosinato de amônio	650µL
Ácido Nalidíxico	500µL

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

### 4.3. METODOLOGIAS

#### 4.3.1. Indução de lesões de MPC em frutos destacados

Em cada laranja da variedade Pera, fornecidas pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), sem assepsia, foram inoculados um dos quatro

transformantes (linhagens 1, 2, 5 e 16), bem como linhagem controle LGMF06. Os frutos estavam em três estágios de maturação diferentes, segundo avaliação visual, e foram denominados verdes, amarelos e maduros. Dez injúrias foram feitas na casca da laranja, com haste de madeira perfurocortante, sendo inoculado em cinco deles micélio do fungo de uma das linhagens estudadas, enquanto que, nos outros cinco nada foi inoculado, para que seja acompanhada a reação normal do fruto para com a lesão. Para cada linhagem estudada, foram feitas inoculações em frutos dos três estágios de maturação, em triplicata, além da inoculação em Limão Tahiti, que não desenvolve a doença pela linhagem selvagem.

Depois de feita a inoculação, cada fruto foi colocado em um pote de plástico de 500 ml contendo algodão umedecido, devidamente isolado, em câmara úmida. Os potes contendo os frutos foram mantidos em BOD a 25°C, sob iluminação constante. O desenvolvimento de lesões nos frutos foi acompanhado diariamente e fotodocumentados. As lesões foram também documentadas através de fotografias em lupa Zeiss e software Automontage.

#### 4.3.2. Isolamento e caracterização dos transformados

Após o desenvolvimento das lesões de MPC foi realizado o isolamento dos fungos, a partir de fragmentos de uma das lesões de cada fruto, colocados em placas de Petri contendo meio ágar-citros, acrescido de glifosinato de amônio e ácido nalidíxico (100 µg/ml) e mantidos em câmara BOD em temperatura constante de 25°C. As linhagens que cresceram então foram submetidas à análise de microscopia de epifluorescência em microscópio Olympus UV, com filtros Fit C para comprimento de onda de 488 nm de excitação e emissão de 515 nm, correção de luminosidade automática para fotos óticas convencionais, ISO 200 e exposição de 5 segundos para fotos sob raio UV.

Além disso, para confirmar que as linhagens isoladas das lesões eram os transformantes inoculados, cada isolado recuperado foi avaliado por PCR para a presença do gene *bar*.

O DNA foi extraído a partir de fragmentos liofilizados e macerados das cascas de laranja inoculados com os fungos, com o uso do kit de extração UltraClean® microbial DNA Isolation Kit (MO BIO®). Dois centímetros quadrados da casca da

laranja liofilizada foram retirados, macerados e colocados em Microbead Tubes (MO BIO®) com 300 µL de solução Microbead (MO BIO®) e 50 µL de solução MD1 (MO BIO®). Os tubos foram colocados em banho-maria e, após 10 minutos, foram agitados horizontalmente em um agitador de tubos em velocidade máxima por 10 minutos. Em seguida, 2mL do sobrenadante foi transferido para Collection Tubes (MO BIO®) e acrescentado de 100 µl de solução MD2 (MO BIO®). Após agitação em vórtex por 5 segundos, os tubos foram incubados 10 minutos a 4°C. Então, foram centrifugados a 9.700 rpm por 1 minuto em temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e colocado em novos 2ml Collection Tubes (MO BIO®), onde se adicionou 900 µL de solução MD3 (MO BIO®). Em seguida, os tubos foram agitados por 5 segundos e aproximadamente 700 µL de seu conteúdo foi transferido para Spin Filters Tubes (MO BIO®), e centrifugados por 30 segundos a 9.700 rpm. A solução do fundo do tubo foi descartada e a última etapa foi repetida adicionando-se o restante do volume que se encontrava nos 2ml Collection Tubes (MO BIO®) acrescidos de MD3 (MO BIO®). Os filtros foram lavado com 300 µL de solução MD4 (MO BIO®) e centrifugado a 9.700 rpm por 30 segundos. O filtrado foi descartado e os tubos foram centrifugados novamente por 30 segundos a 9.700 rpm. Os filtros foram colocados em 2 mL Collection Tubes (MO BIO®) limpos e neles foram adicionados 50 µL de água ultrapura, seguindo uma nova centrifugação por 30 segundos a 9.700 rpm. Descartou-se o filtro e o DNA estava no tubo, pronto para uso.

A reação de PCR dos isolados foi realizada em termociclador (Mastercycler, Eppendorf) usando os oligonucleotídeos barR (TCAGATCTCGACGGG) e barF (ATGAGCGAACGACGC). Para reação foi utilizado 10 ng de DNA total do fungo, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 reação de PCR foram: 94°C, 30s; 63°C, 30s and 72°C, 45s, por 30 ciclos. O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5%, GelRed® e visualizado sob luz UV (Ultraviolet Benchtop transilluminators) e fotografado (Digi doc it software).

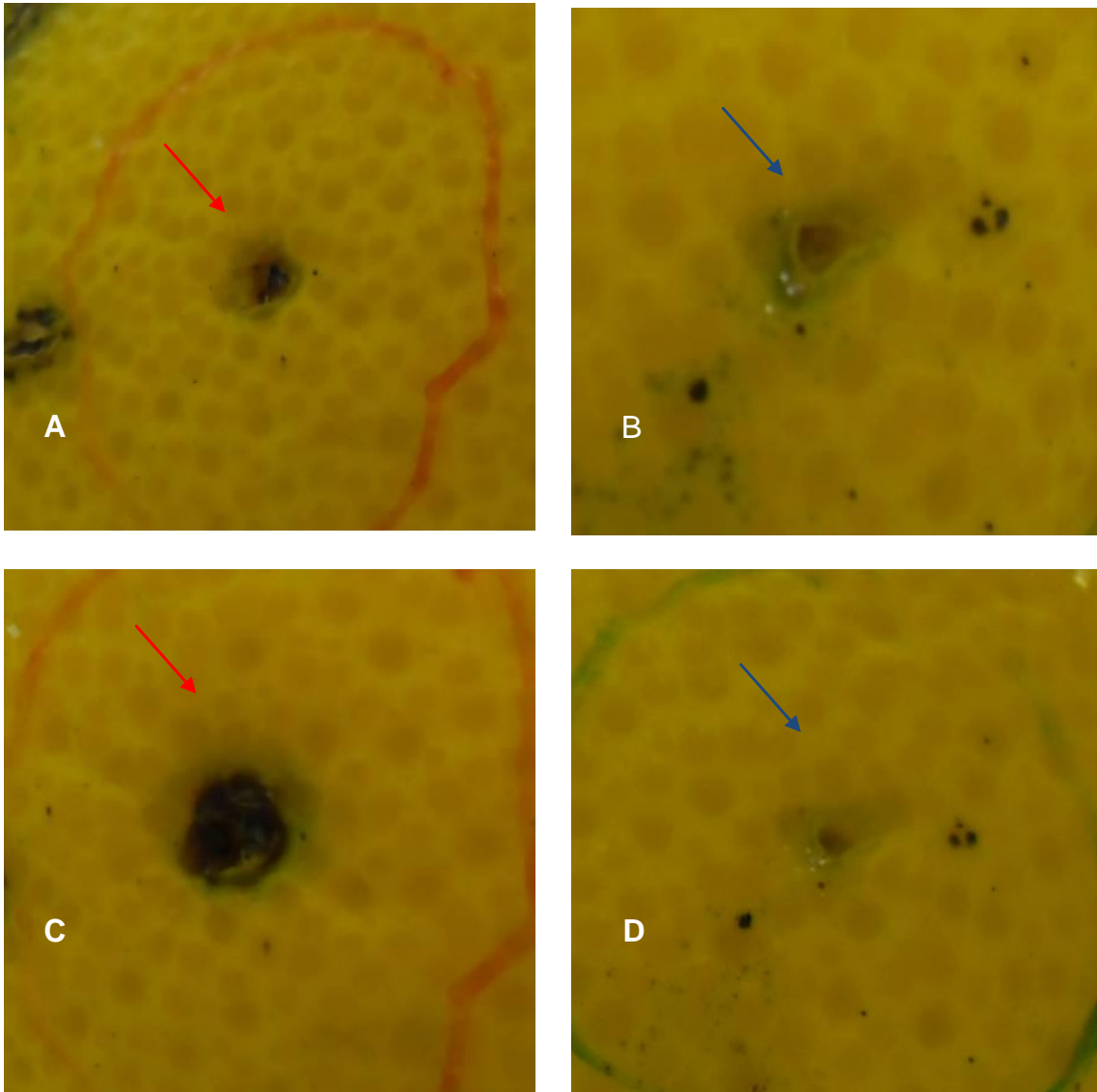
## 5 RESULTADOS

### 5.1 INDUÇÃO E DESENVOLVIMENTOS DAS LESÕES

Houve desenvolvimento de lesões de MPC em aproximadamente 70% das lesões, nos três estágios fenológicos, 13 dias após a inoculação. Após 24 dias, cerca de 100% das lesões já estavam desenvolvidas nos tratamentos. Não houve desenvolvimento de lesão típica de MPC nos controles negativos, onde apenas houve a injúria.

O acompanhamento através de registro fotográfico ocorreu até o 33º dia após a inoculação das linhagens (FIGURAS 1, 2 e 3), e após 53 dias foram registradas fotos em lupa (FIGURA 4), além da medição de uma lesão e de uma injúria (controle negativo) em cada fruto.

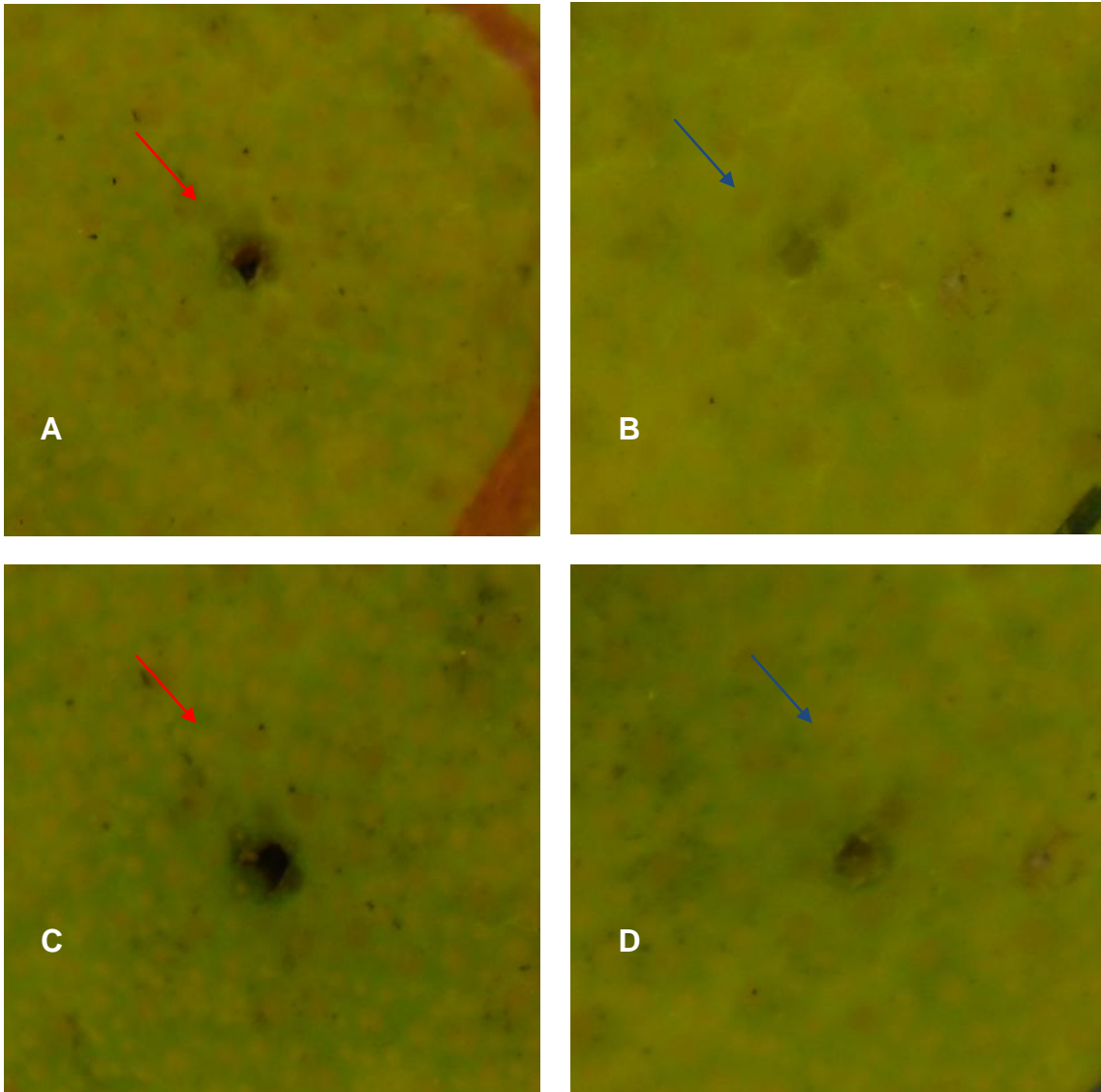
A partir das medidas das lesões, foi possível avaliar a capacidade das linhagens em desenvolver lesões de MPC em frutos destacados. Os dados (TABELA 1) que apresentaram distribuição normal (medidas das linhagens transformada 1 e Selvagem LGMF06) foram analisados pelo teste ANOVA, e, quando apresentavam assimetria nos dados, foram então avaliados por testes de variância de Kruskal-Wallis (Linhagens 2, 5 e 16). Para todas as linhagens, as diferenças entre as medidas das lesões e as medidas das injúrias (controle negativos), localizadas no mesmo fruto apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ), demonstrando o efeito da presença do fungo na lesão. Não foram encontradas diferenças significativas entre as lesões das diferentes linhagens, sugerindo que elas atuem de forma semelhante. Não houve diferença também entre os estágios fenológicos quando comparados com os outros estágios tratados com a mesma linhagem, nem quando comparados com o mesmo estágio fenológico que recebeu diferente tratamento.



**FIGURA 1 – AVALIAÇÃO DOS TRANSFORMADOS QUANTO A CAPACIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE LESÕES DE MPC que fruto. A) INÓCULO COM A LINHAGEM TRANSFORMADA 16, APÓS 12 DIAS DE INCUBAÇÃO; B) INJÚRIA SEM INÓCULO (CONTROLE NEGATIVO) APÓS 12 DIAS; C) INÓCULO COM A LINHAGEM TRANSFORMADA 16 APÓS 33 DIAS DE INCUBAÇÃO; D) INJÚRIA SEM INÓCULO (CONTROLE NEGATIVO) APÓS 33 DIAS;**

NOTA: setas vermelhas indicam lesões características de MPC; setas azuis indicam apenas a injúria sem o desenvolvimento de lesões (controle negativo)

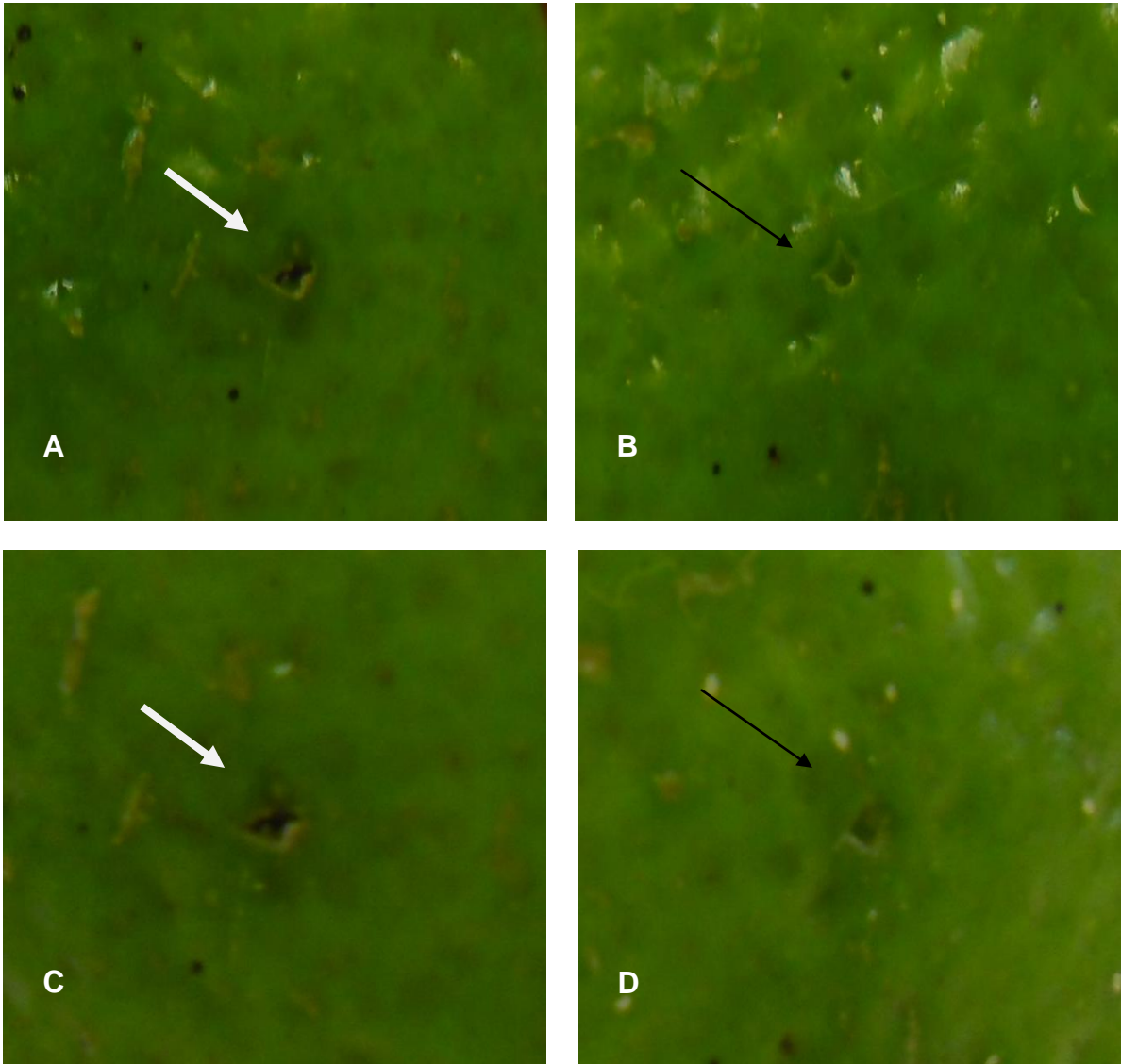
FONTE: O autor (2011)



**FIGURA 2 - AVALIAÇÃO DOS TRANSFORMADOS QUANTO A CAPACIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE LESÕES DE MPC. A) INÓCULO COM A LINHAGEM SELVAGEM, APÓS 12 DIAS DE INCUBAÇÃO; B) INJÚRIA SEM INÓCULO (CONTROLE NEGATIVO) APÓS 12 DIAS; C) INÓCULO COM A LINHAGEM SELVAGEM APÓS 33 DIAS DE INCUBAÇÃO; D) INJÚRIA SEM INÓCULO (CONTROLE NEGATIVO) APÓS 33 DIAS;**

NOTA: setas vermelhas indicam lesões características de MPC; setas azuis indicam apenas a injúria sem o desenvolvimento de lesões (controle negativo)

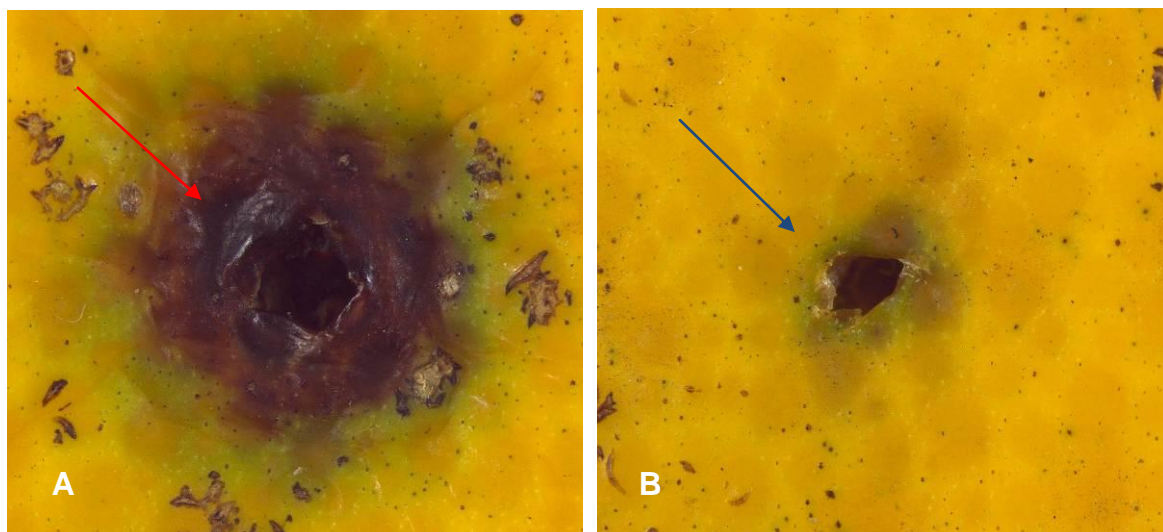
FONTE: O autor (2011).



**FIGURA 3 - AVALIAÇÃO DOS TRANSFORMADOS QUANTO A CAPACIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE LESÕES DE MPC EM LIMA ÁCIDA TAHITI. A) INÓCULO COM A LINHAGEM TRANSFORMADA 16, APÓS 12 DIAS DE INCUBAÇÃO; B) INJÚRIA SEM INÓCULO (CONTROLE NEGATIVO) APÓS 12 DIAS; C) INÓCULO COM A LINHAGEM TRANSFORMADA 16 APÓS 33 DIAS DE INCUBAÇÃO; D) INJÚRIA SEM INÓCULO (CONTROLE NEGATIVO) APÓS 33 DIAS;**

NOTA: setas brancas indicam injúria com o inóculo, mas sem desenvolvimento de lesões características de MPC; setas pretas indicam apenas a injúria sem o desenvolvimento de lesões (controle negativo)

FONTE: O autor (2011)



**FIGURA 4 - AVALIAÇÃO DOS TRANSFORMADOS QUANTO A CAPACIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE LESÕES DE MPC. A) INÓCULO COM A LINHAGEM TRANSFORMADA 5, APÓS 53 DIAS DE INCUBAÇÃO; B) INJÚRIA SEM INÓCULO (CONTROLE NEGATIVO) APÓS 53 DIAS; AUMENTO 20X**

NOTA: setas vermelhas indicam lesões características de MPC; setas azuis indicam apenas a injúria sem o desenvolvimento de lesões (controle negativo)

FONTE: O autor (2011)

TABELA 1 – MÉDIAS (EM MILÍMETROS) HORIZONTAL E VERTICAL DAS LESÕES DE MPC E INJÚRIAS (CONTROLES NEGATIVOS) APÓS 53 DIAS DA INOCULAÇÃO, COMPARANDO 4 LINHAGENS TRANSFORMADAS EM FRUTOS DE LARANJA EM 3 ESTÁDIOS FENOLÓGICOS E EM LIMA ÁCIDA TAHITI.

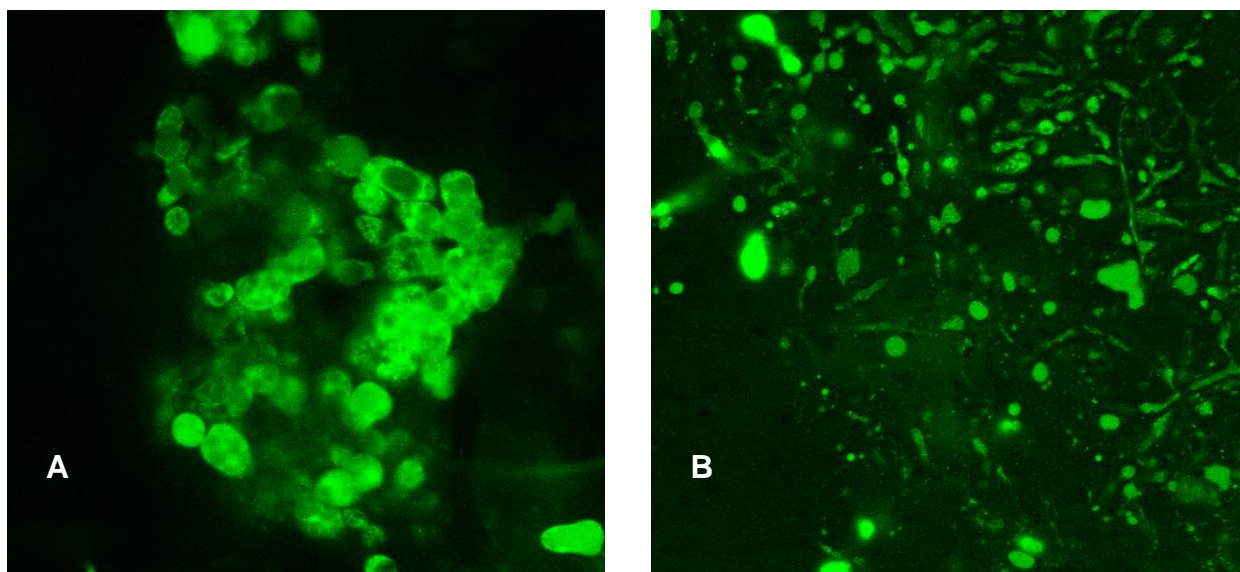
LINHAGENS	1	2	5	16	MÉDIAS	LGMF06
MÉDIA DAS LESÕES	2,835556	3,4475	4,172778	2,9825	3,359583	2,405
MÉDIA DAS INJÚRIAS	1,106111	1,253056	1,9	1,714167	1,493333	1,873056
LIMA ÁCIDA LESÃO	1,7	--	2,33	1,77	1,933333	2,13
LIMA ÁCIDA INJÚRIA	0,765	--	1,91	1,225	1,3	1,54
MÉDIAS VERDES	3,32	3,428333	3,156667	2,248333	3,038333	2,41
MÉDIAS AMARELAS	2,501667	3,2775	3,355	3,231667	3,091458	2,4
MÉDIAS MADURAS	2,685	3,636667	6,006667	3,4675	3,948958	2,405

## 5.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS TRANSFORMANTES

Foram realizados testes de isolamento, onde as lesões foram retiradas dos frutos e cortadas em pequenos fragmentos. Estes foram então colocados em placas de Petri contendo meio Ágar-Citros, acrescido de Glifosinato de Amônio 100µg/ml e Ácido Nalidíxico 100 µg/ml, incubados a 28°C. Quatro isolamentos independentes foram feitos entre Agosto e Novembro de 2011, sendo o primeiro isolamento feito 53 dias após a inoculação, e o último isolamento feito após 140 dias.

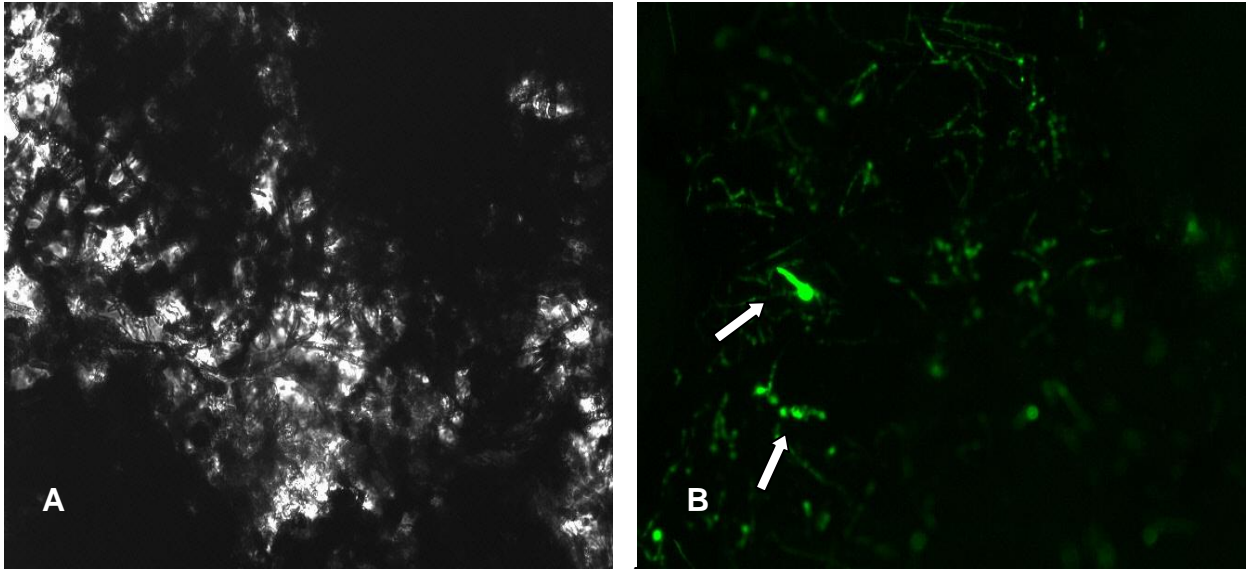
Foram reisoladas as linhagens 2 e 16, no último isolamento realizado. Depois de isoladas, foram mantidas em meio Ágar-Citros, incubados a 28°C. Devido a grande presença de contaminantes, não foi possível obter as demais linhagens nos outros isolamentos.

Foi feita a confirmação das linhagens como sendo as transformantes através da observação em microscópio confocal, como mostra a figura 5, e em microscópio de epifluorescência (FIGURAS 6 e 7).



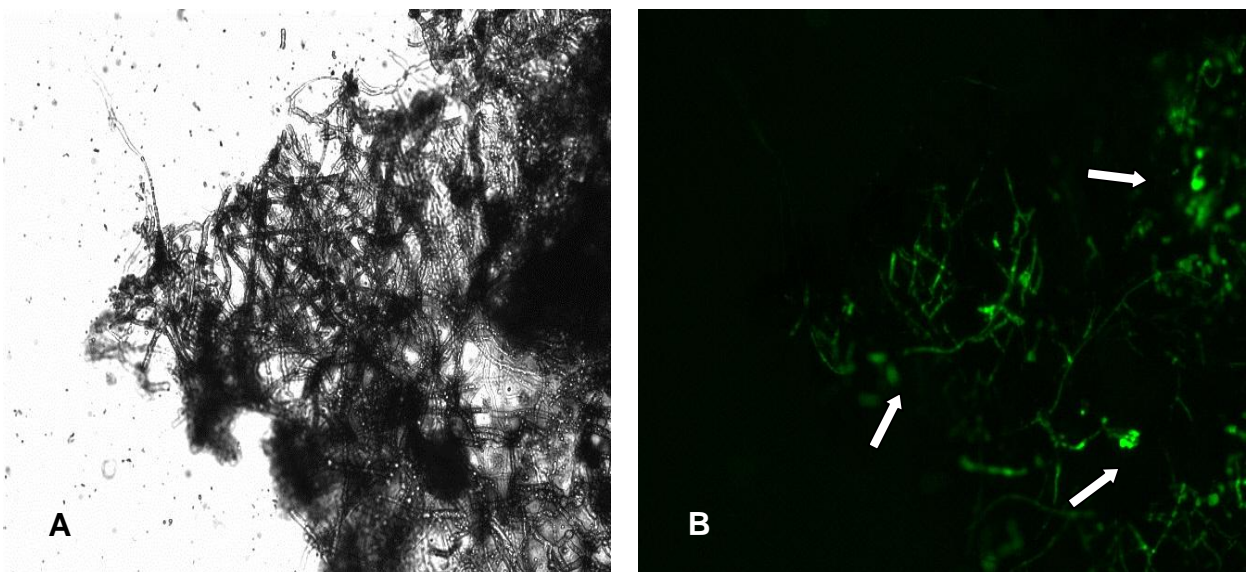
**FIGURA 5 – FOTOMICROGRAFIA DE MICÉLIO DOS TRANSFORMANTES ENCONTRADOS NAS LESÕES, EM MICROSCOPIA DE CONFOCAL EMITINDO FLUORESCÊNCIA. A) LINHAGEM 2; B) LINHAGEM 16**

FONTE: O autor (2011)



**FIGURA 6 - FOTOMICROGRAFIA DO MICÉLIO DA LINHAGEM TRANSFORMADA 2, ISOLADA A PARTIR DE LESÕES DO FRUTO. A) MICROSCOPIA ÓPTICA; B) MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA**

Nota: As setas demonstram emissão de fluorescência. FONTE: O autor, 2011.



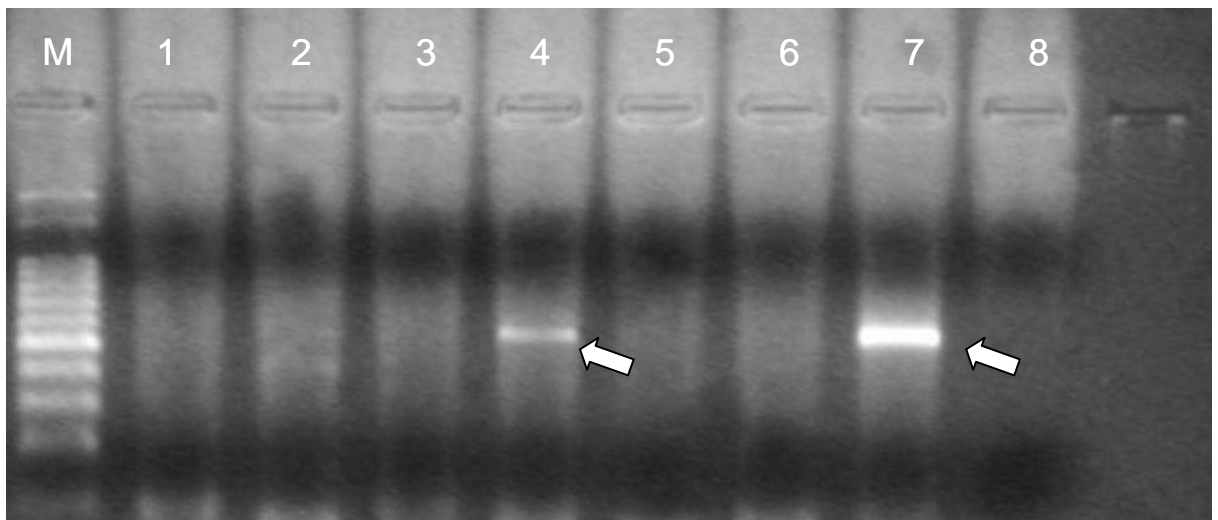
**FIGURA 7 - FOTOMICROGRAFIA DO MICÉLIO DA LINHAGEM TRANSFORMADA 16, ISOLADA A PARTIR DE LESÕES DO FRUTO. A) MICROSCOPIA ÓPTICA DA LINHAGEM 16; B) MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DA LINHAGEM 16;**

Nota: As setas demonstram emissão de fluorescência.

FONTE: O autor, 2011.

Devido à impossibilidade de se obter as outras linhagens através de isolamento, foi realizada a reação de PCR para a confirmação da presença do gene *bar* com DNA extraído das cascas das laranjas inoculadas com as linhagens transformadas, bem como a linhagem selvagem LGMF06. A extração foi realizada com kit comercial (MO BIO®), tendo em vista que outras metodologias, como a extração com uso de fenol, foram testadas e não obtiveram resultados satisfatórios. Foram utilizados os *primers* *barR* e *barF* para a PCR. .

Como os resultados demonstraram a presença de banda, mas não de forma satisfatória, o produto obtido na reação foi submetido a uma nova PCR, com as mesmas características, a fim de ampliar ainda mais a sequência de DNA pretendida. Desta última reação (FIGURA 8), vemos a amplificação de um fragmento de aproximadamente 600pb na amostra da linhagem 5, bem como no controle positivo para o gene *bar*.



**FIGURA 8 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5% DO PRODUTO DE NESTED PCR EVIDENCIANDO A AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE 600 PB DO GENE *bar* NO TRANSFORMANTE LINHAGEM 5**

Nota: Bandas 1 e 2 – linhagem selvagem LGMF06; 3- injúria linhagem 5; 4 – lesão linhagem 5; 5 – injúria linhagem 1; 6- lesão linhagem 1; 7 - plasmídeo com gene *bar*; 8 - branco; M - ladder 100 pb. Seta indica amplificação de aproximadamente 600pb.

FONTE: O autor, 2011.

## 6 DISCUSSÃO

A metodologia testada foi eficiente para causar as lesões de *Phyllosticta citricarpa* na laranja em todos os estágios fenológicos observados. Todas as lesões apresentaram diferença significativa quando comparadas com as injúrias realizadas sem inoculo do fungo, localizadas sempre no mesmo fruto. De mesma forma, as limas ácidas Tahiti, resistentes a MPC causada pela linhagem selvagem, apresentaram também resistência a doença quando inoculadas com as linhagens transformadas.

Entretanto, não foi possível observar diferença significativa estatisticamente entre os transformantes, nem entre as linhagens transformadas e a linhagem selvagem. Sendo este não o quadro esperado, tendo em vista que as linhagens selecionadas para este estudo foram escolhidas por terem, em estudos anteriores, se destacado quanto o seu crescimento *in vitro* e colonização de folhas de laranjeira (Torques, 2011), além de a avaliação visual sugerir uma maior agressividade nas lesões causadas pelas linhagens transformadas, indica-se que novos estudos sejam feitos aumentando-se o número de repetições. No presente trabalho, apesar das cinco lesões feitas em cada fruto, apenas uma foi medida, ficando as outras como material para os isolamentos. Com três repetições por estado fenológico, nove por linhagem no total, os testes estatísticos podem não ter sido sensíveis o bastante para detectar as alterações entre os estágios fenológicos ou entre as linhagens.

A realização do isolamento das linhagens a partir das lesões, em placa, foi dificultada pela intensa contaminação de bactérias e fungos provenientes da casca da laranja, que impediam o desenvolvimento dos transformantes, conhecidamente de crescimento lento. Foi possível o isolamento das linhagens após 140 dias da inoculação, sugerindo que, em estudos posteriores, seja considerado um maior tempo de incubação dos frutos antes do isolamento, além de alterações com relação à assepsia e aumento de concentração do Glifosinato de amônio e antibióticos.

A metodologia da extração de DNA pela casca da laranja se mostrou eficiente com a utilização do kit de extração comercial (MO BIO®), sendo demonstrada a amplificação de um fragmento de aproximadamente 600pb na amostra da linhagem 5, similar a do controle positivo. Possivelmente devido à baixa concentração de DNA do fungo nas amostras, e ainda por interferência dos compostos fenólicos, a metodologia utilizada não foi capaz de detectar a presença das outras linhagens.

Foi possível detectar as linhagens transformantes pela microscopia de epifluorescência, onde também foi possível observar que a fluorescência ocorre em hifas novas, não sendo detectada em hifas mais velhas, já melanizadas, sugerindo que este pigmento bloqueie a emissão de fluorescência.

## 7 CONCLUSÕES

- A metodologia testada é eficiente para estudo dos transformantes de *Phyllosticta citricarpa* em fruto destacado.
- Todas as linhagens testadas, transformantes e controle, causaram lesões nos frutos.
- A lima ácida Tahiti não é suscetível às linhagens transformadas, assim como com a linhagem selvagem.
- Não foi possível observar diferenças entre as linhagens transformadas em relação à linhagem selvagem quanto à produção de lesões.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL, 2009. Anuário da Agricultura Brasileira São Paulo, 267-285.

ANDRADE, T.; THEODORO, G.F.; GOES, A.; BALDASSARI, R.B. Mancha preta (*G. citricarpa*) dos citros no Estado de Santa Catarina. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, p. 126, 2004.

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

AVENA-SACCÁ, R. Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas por *Phoma citricarpa*. **Revista Agrícola**: v.15, p.468-475, 1940.

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

BALDASSARI, R.B.; REIS, R.F.; GOES, A. de. Susceptibility of Fruits of the 'Valência' and 'Natal' Sweet Orange Varieties to *Guignardia citricarpa* and the Influence of the Coexistence of Healthy and Symptomatic Fruits. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.31, n.4, p.337-341, 2006

BALDASSARI, R.B.; REIS, R.F.; GOES, A. de. Relato de mancha preta do citros em pomares do estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 27. 2004, Campinas. **Anais...**Campinas, p.126, 2004.

BALDASSARI, R. B.; WICKERT, E.; GOES, A. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from *Citrus* spp. **European Journal of Plant Pathology**. Holanda, n. 120, p. 103-110, 2008.

BALDASSARI, R. B.; REIS, R. F.; GOES, A. A new method for inoculation of fruit with *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **European Journal of Plant Pathology**, vol. 123, n°1, pp. 1-4, 2009

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

BONANTS, P. J. M.; CARROLL, G. C.; de WEERDT, M; van BROUWERSHAVEN, I. R.; BAAYEN, R. P. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 503-513, 2003.

BRODRICK, H. T.; RABIE, C. J. Light and temperature effects on *Guignardia citricarpa* (Linn.) Osbeck. **Phytophylactica**, v.2, p. 157-64, 1970.

BUNDOCK, P., DENDULKRAS, A., BEIJERSBERGEN, A., HOOYKAAS, P.J. J. Transkingdon T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Journal**. v.14, p. 3206-3214, 1995.

CAIXETA, M.P.; CORAZA NUNES, M.J.; VIDA, J.B.; NUNES, W N.; TESSMANN, D.J.; ZANUTO, C.A.; MULLER, G.R. Ocorrência da pinta preta dos citros (*Guignardia citricarpa*) no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n. 1, p. 136, 2005.

CASE, M. E.; SCHWEIZER, M.; KUSHNER, S. R. GILES, N. H. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing plasmid DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 5259-5263, 1979.

CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W.W., PRASHER, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science** v.263, p. 802-805, 1994.

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

COSTA, H.; VENTURA, J.A.; ARLEU, R.J.; AGUILAR-VILDOSO, C.I. Ocorrência de pinta Preta (*Guignardia citricarpa*) em citros no Estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 205, 2003. Suplemento

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

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

DOIDGE, E.M. Some diseases of citrus prevalent in South Africa. **South African Journal of Science**.v.26, p.320-325, 1929.

ECKERT, M.; MAGUIRE, K.; URBAN, M.; FOSTER, S.; FITT, B.; LUCAS, J.; HAMMOND-KOSACK, K. ***Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Leptosphaeria* spp. and *Oculimacula* spp. with the reef coral gene *DsRed* and the jellyfish gene *gfp***. Harpenden: Fems Microbiology Letters, p. 253, v. 67-74, 2005.

FAO, 2005. **Food and Agricultural commodities production** Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339-default.aspx> Acesso em: 05 de fevereiro 2011.

FEICHTENBERGER, E. Mancha preta dos citros no Estado de São Paulo. **Laranja & Cia.** v.17, p. 93-108, 1996.

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

GASPAROTTO, L.; GOES, A.; PEREIRA, J.C.R.; BALDASSARI, R.B. Ocorrência da Mancha preta (*G. citricarpa*) dos citros no Estado de Amazonas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, p. 126, 2004.

GÓES, A. de; GRAÇA, J.; BARROS, J. C. S. M; PINHEIRO, J. E. Controle da pinta preta em frutos de tangerina Rio (Citrus deliciosa) ocasionada por *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*). **Fitopatologia Brasileira**, v.15, p.73-5, 1990.

GÓES, A. de; FEICHTENBERGER, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (McAlp) Van der Aa (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.138, 1993. Suplemento. /Apresentado ao 26. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Aracajú, 1993

GÓES, A. de Controle da mancha preta dos frutos cítricos. **Laranja**, v.9, p.293-304, 1998.

GROOT, De M.J.A.; BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P.J.J.; BEIJERSBERGEN, A.G.M. **Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi**. Nature Biotechnology. v: 16, p. 839-842, 1998.

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

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

KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n. sp.: The ascigerous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**. v. 73, p. 249-292, 1948.

KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, v.65, p.945-950, 1981.

McONIE, K.C. Orchard development and discharge of ascospores of *Guignardia citricarpa* and the onset of infection in relation to the control of citrus black spot. **Phytopathology**, v.54, p.1448-1453, 1964a.

MCONIE, K.C. Source of inoculum of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, v.54, p.64-67, 1964b.

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

MILLER, W.C.; LEVEAU, J.H.J.; LINDOW, S.E. Improved gfp and inaZ broad-host-range promoter-probe vectors. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, v.13, p.1243-1250, 2000.  
NAHALKOVA J. & FAHETI, J. Red fluorescent protein (DsRed2) as a novel reporter in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **FEMS Microbiology Letters** 225: 305-309, 2003.

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

NUNES, W. M. C. Ocorrência de pinta preta, causada por *Guignardia citricarpa*, em tangerinas “Montenegrina” no sul do Paraná. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP, v. 32, n.3, p. 295, julho/stembro, 2006.

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

ROBBS, C. F. A mancha preta dos fungos cítricos (*Phyllosticta citricarpa*): ameaça a citricultura paulista. **Laranja**. v.11, p. 75-86, 1990.

ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M. A Mancha preta dos frutos: um dos fatores limitantes à produção citrícola do estado do Rio de Janeiro. **Comunicado Técnico. CTAA-EMBRAPA**, v. 19, p. 1-5, 1995.

ROSSMAN, A. Y. The impact of invasive fungi on agricultural ecosystems in the United States. **Biological Invasions**. Netherlands, v. 11, p. 97-107, jul. 2009.

THEODORO, G. de F.; GOES, A. de; BALDASSARI, R.B; Mancha Preta (*Guignardia citricarpa*) dos citros no Estado de Santa Catarina. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 27. 2004, **Anais**...Campinas: INSTITUTO AGRONÔMICO, p. 126,2004.

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

TORQUES, A. A. Avaliação das linhagens transformadas do fungo *Phyllosticta citricarpa* com o gene repórter *gfp*, para estudo da interação fungo-planta – Trabalho de Monografia do Curso de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná – UFPR. Curitiba, 2011.

WARD, M.; KODAMA, K. H.; WILSON, L. J. The *oliC* gene of *Aspergillus niger* isolation, sequence and use as a selectable marker for transformation. **Current Genetics**, v. 28, p. 37-42, 1988.