Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Transformação genética e patogenicidade de *Guignardia citricarpa*

Maria Beatriz Calderan Rodrigues

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2010

Maria Beatriz Calderan Rodrigues
Engenheira Agrônoma

Transformação genética e patogenicidade de *Guignardia citricarpa*

Orientador:
Profa. Dra. **ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Rodrigues, Maria Beatriz Calderan
Transformação genética e patogenicidade de *Guignardia citricarpa* / Maria Beatriz Calderan Rodrigues. - - Piracicaba, 2010.
124 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Frutas citrícas 2. Fungos fitopatogênicos - Patogenicidade 3. Genética microbiana 4
Mancha preta 5. Microrganismos endofíticos I. Título

CDD 589.23
R696t

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Ao meu amado marido Gildo

e aos nossos filhinhos ,

que eu já os amo desde sempre…

Ofereço

Aos meus queridos pais

sérgio *e* **mônica**

Por serem a base de tudo

E à minha irmã **juliana**

Pela **família** *que somos*

Dedico

AGRADECIMENTOS

"Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós". Antoine de Saint-Exupéry

Primeiramente quero agradecer a DEUS, pela vida. Pelas oportunidades que me foram dadas e que graças a muita luz e força, eu pude aproveitá-las. Pela proteção, sempre!;

Aos meus pais, Sérgio e Mônica, por tudo. Não cabem palavras para expressar tamanho amor. Obrigada pelo amor, pelo apoio, força, e estímulo, também pelos esforços e renúncias em meu nome. São pessoas exemplos de vida e de amor, que tive a imensa sorte de ter como pais... Pais de verdade!;

À minha querida irmãzinha Juliana, por dividir a vida comigo, não poderia ter sido melhor com outra pessoa, um presente de Deus! Por todo amor, atenção, diversão e ajuda. Enfim, à nossa família que é muito especial e fundamental para o nosso bem-estar e para realizar tudo na vida, incluindo esse trabalho...;

Ao meu amado marido Gildo... Também fico sem palavras para agradecer imenso amor, confiança, espera, alegrias, atenção e ajuda que recebi! E também à oportunidade da nossa nova família que foi formada... Pela paciência durante os horários estranhos dos experimentos, pelas viagens, pelos intermináveis dias redigindo essa tese... Obrigada pelas comidinhas deliciosas que me preparava nesses dias, como em muitos outros...Te amo!;

À Profa. **Aline** Pizzirani-Kleiner, minha querida orientadora, por toda atenção dispensada, ajuda, dicas e por nos tratar praticamente como filhos, cheia de carinho...isso faz bastante diferença!;

Ao Prof. **João Lúcio** Azevedo pelas dicas, orientação e tudo mais que fosse necessário;

Ao Prof. **Welington** Araújo, meu co-orientador, por toda atenção, dicas e ajuda para a realização desse trabalho, sempre com muito carinho;

À amiga Dra. **Léia** Fávaro meus sinceros e profundos agradecimentos. Além da companhia agradável, sempre oferecendo ajuda e dividindo conhecimentos... Sem suas dicas para a transfromação genética de fungos esse trabalho teria sido muitíssimo mais difícil de se concluir, seu auxílio foi de fundamental importância!;

À amiga Dra. Aline **Romã**o que também teve grande participação na realização desse trabalho, de maneira essencial, especialmente no *Southern Blot*! Obrigada por toda atenção e carinho...;

Ao amigo **Anderson** Ferreira, pela amizade, ajuda na microscopia de epifluorescência e quando fiquei com problemas no joelho;

Ao amigo **Zezo** por toda amizade, ajuda, conversas... o laboratório não seria o mesmo sem você!!;

Ao amigo Dr. **Marcel** Spósito, pela amizade, e em nome do FUNDECITROS, pela disponibilização de material, e por todas as dicas possíveis;

Ao amigo Dr. **Carlos** Aguilar-Vildoso, pela amizade, e ajuda nas minhas mais diversas dúvidas;

Ao Dr. Luiz Hum**ber**to Gomes do Laboratório de Genética de Leveduras/ESALQ, pelo auxílio em especial nas fotos dos infinitos géis;

Ao Prof. Carlos **Labate** e à Dra. **Mônica** Labate, pela ajuda e utilização dos equipamentos do Laboratório "Max Feffer" de Genética de Plantas/ESALQ;

À Profa. **Silvia** Molina pela disposição e ajuda necessária na utilização dos equipamentos do Laboratório de Ecogenética/ESALQ;

À Profa. **Margarida** Perecin e Prof. **Mateus** Mondin do Laboratório de Citogenética/ESALQ, pelo uso do microscópio;

Às secretárias Léia e Neusa, e aos funcionários Fernando e Valdir pela ajuda sempre presente;

À Profa. **Carmen** González-Bosch da Universidad de Valencia por toda atenção e ensinamentos que me deu, pela recepção maravilhosa que tive na Espanha em nome dos companheiros del labo 302 Maria de la O, Ivan Finiti, Ana Izquierdo e Laura Lopez;

A **TOOODOOOS** os amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos "João Lúcio de Azevedo"! Eu completo 10 anos nesse laboratório... Pude dividir os 10 anos mais jovens e divertidos da minha vida com vocês e foi tudo muito bom! Agradeço aos que já se foram, aos que ainda estão e ao novos que vêm chegando... A estes cabe o legado de manter a união, trabalho e alegria, características inerentes ao nosso lab!

Às **amigas** de bancada, sempre conversando e rindo, deixando o clima mais ameno e gostoso para se trabalhar, afinal, somos mulheres e queremos mais é falar e rir! Andréa, Jô, Marise, Pri, Vivi, Carol, Manu, Rê... Má, muito obrigada pelas dicas de Valência, sem você teria sido mais difícil!;

À amiga, futura Dra., *Fernanda* Sebastianes, pela amizade prazeirosa e sincera. Por toda ajuda aqui e em Valência, por todos os momentos que dividimos e jamais iremos esquecer, especialmente os engraçados... Foi muito bom morar com você! ¡Amistad por toda la vida, seguro que sí!;

À amiga, também futura Dra., *Ana Paula* Pallu, pela amizade ao longo desses 11 anos, desde a graduação! Não tenho palavras para expressar o quão bom foram esses anos... Sempre nos apoiando, dividindo alegrias e angústias, vivendo... Ver você ter um bebê é maravilhoso! E saber que ainda vamos compartilhar outras inúmeras conquistas da vida é melhor ainda! Amizade pra toda a vida!;

Crianças e **cachorros**! Aaaamooo! Com certeza daí vem a principal fonte de energia positiva para a gente continuar na vida! Meus queridos sobrinhos **Lucas** e **Luíza**, e a **Ana Clara** que está chegando, obrigada por colorirem meus dias! E meus cachorrinhos *Snoopy* e *Xuxinha*, que me divertem!

E completando a família, **César** e **Rose**; **Andréa** e **Marcelo**; **Luciano** e **Sylvia**, **Gi** e **Cyreo**; **Flá** e **Tércio**, obrigada por toda atenção e auxílio;

Às minhas querida amigas da vida **Camilinha**, **Carol** e **Flávia**! Minhas amigas-irmãs-anjinhas... por tudo que vivemos e todas as alegrias que virão. Pela certeza da nossa amizade! Em especial, em comemoração aos 18 anos de amizade com a Cacá!;

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de estudos;

Às funcionárias da Biblioteca Central **Silvia** e **Eliana**, vocês não imaginam quanto o carinho de vocês é importante nessa hora mais tensa...

A *todos* que me ajudaram direta ou indiretamente nesse trabalho ous meus mais sinceros: muito obrigada!

"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, mas não vai sozinha e nem nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouco de nós. Há os que levam muito e deixam pouco, há os que levam pouco e deixam muito. Esta é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que não nos encontramos por acaso"

Charles Chaplin

"Antes de tudo, eu quero ser uma pessoa boa.
Assim o sendo, eu posso ser boa em tudo!"
MBCRB

Deficiente é aquele que não consegue modificar sua vida, aceitando as imposições de outras pessoas ou da sociedade em que vive, sem ter consciência de que é dono do seu destino.

Louco é quem não procura ser feliz com o que possui.

Cego é aquele que não vê seu próximo morrer de frio, de fome, de miséria, e só tem olhos para seus míseros problemas e pequenas dores.

Surdo é aquele que não tem tempo de ouvir um desabafo de um amigo, ou o apelo de um irmão. Pois está sempre apressado para o trabalho e quer garantir seus tostões no fim do mês.

Mudo é aquele que não consegue falar o que sente e se esconde por trás da máscara da hipocrisia.

Paralítico é quem não consegue andar na direção daqueles que precisam de sua ajuda.

Diabético é quem não consegue ser doce.

Anão é quem não sabe deixar o amor crescer.

E, finalmente, a pior das deficiências é ser miserável, pois:

Miseráveis são todos que não conseguem falar com **Deus**.

"A amizade é um amor que nunca morre."

Mário Quintana

SUMÁRIO

RESUMO.....15
ABSTRACT.....17
1 INTRODUÇÃO.....19
2 DESENVOLVIMENTO.....23
2.1 Revisão Bibliográfica.....23
2.1.1 Citricultura brasileira e a MPC 23
2.1.2 O gênero *Guignardia* (Anamorpho: *Phyllosticta*).....26
2.1.3 A espécie patogênica *Guignardia citricarpa*.....27
2.1.4 A espécie endofítica *Guignardia mangiferae*.....29
2.1.5 Fungos associados às plantas.....31
2.1.6 Identificação de genes relacionados à patogenicidade.....33
2.1.7 A enzima endopoligalacturonase.....35
2.1.8 Transformação genética de fungos via *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) como ferramenta para estudos de interação com a planta.....36
2.2 Materiais e Métodos.....46
2.2.1 Isolados fúngicos.....46
2.2.2 Construção de *primers*.....46
2.2.3 Secreção de enzimas hidrolíticas em meio sólido.....47
2.2.4 Quantificação de quitinase e endopoligalacturonase.....48
2.2.5 Extração de DNA.....48
2.2.6 Teste de sensibilidade à higromicina B.....49
2.2.7 Teste de crescimento sobre diferentes tipos de membranas e meio de indução (IM).....49
2.2.8 Linhagens, vetor de transformação e condições de cultivo.....50
2.2.9 Transformação genética de *G. citricarpa* mediada por *A. tumefaciens*.....51
2.2.10 Purificação e estocagem dos fungos 53
2.2.11 Estabilidade mitótica dos transformantes.....53
2.2.12 Análise dos transformantes por PCR (*Polymerase Chain Reaction*).....54
2.2.13 Análise dos transformantes por *Southern Blot*.....54
2.2.14 Extração do plasmídeo pFAT-gfp e preparo da sonda de hibridação.....56

2.2.15 Análise dos transformantes por microscopia óptica de fluorescência (MOF).....56
2.2.16 Amplificação, clonagem e sequenciamento das regiões que flanqueiam o T-DNA.....57
2.2.17 Caracterização dos transformantes.....58
2.2.18 Interação entre *Guignardia citricarpa* e Citros.....58
2.2.19 Produção de esporos.....59
2.2.20 Inoculação dos esporos em frutos – Bioensaio de patogenicidade.....59
2.2.21 Delineamento Experimental.....60
2.3 Resultados e Discussões.....61
2.3.1 Secreção de enzimas hidrolíticas por isolados endofíticos e patogênicos de *Guignardia* sp.....61
2.3.2 Identificação do gene de endopoligalacturonase em *Guignardia* sp…..……66
2.3.3 Transformação genética de *G. citricarpa* via *A. tumefaciens*.....73
2.3.3.1 Teste de sensibilidade à higromicina B.....73
2.3.3.2 Teste de crescimento sobre diferentes tipos de membranas e meio de indução (IM).....74
2.3.3.3 Agrotransformação de *Guignardia citricarpa*.....74
2.3.3.4 Estabilidade mitótica dos transformantes.....79
2.3.3.5 Confirmação da transformação por PCR e análise de *Southern Blot*.....81
2.3.3.6 Análise das regiões que flanqueiam a inserção do T-DNA.....82
2.3.3.7 Caracterização dos transformantes.....85
2.3.4 Interação entre *G. citricarpa* e *Citrus* sp.....87
2.3.4.1 Capacidade de formar sintomas – Bioensaio de patogenicidade.....88
2.3.4.2 Sintomas do bioensaio analisados sob MOF.....89
3 Considerações Finais.....93
REFERÊNCIAS.....95
ANEXOS.....115

RESUMO
Transformação genética e patogenicidade de *Guignardia citricarpa*

O Brasil é líder absoluto no comércio internacional de suco de laranja concentrado congelado participando com 82% do volume comercializado no mundo. *Guignardia citricarpa* é um fungo Ascomiceto agente causal da Mancha Preta dos Citros (MPC), uma doença importante no contexto da Citricultura, causando lesões negras em frutos tornando-os impróprios para a exportação, já que não são aceitos na União Européia pois o patógeno é classificado como quarentenário. O presente trabalho teve como objetivo principal estabeler a metodologia de transformação genética de *G. citricarpa* para futuramente auxiliar no entendimento dos mecanismos de patogenicidade desta espécie, visando diminuir perdas na citricultura brasileira devido à MPC. Além disso, foi realizada uma análise do gene da enzima endopoligalacturonase, a qual está associada à capacidade de patógenos em colonizar plantas. Para elucidar esse fenômeno, foi realizada a busca de genes relacionados à patogenicidade em outros fungos fitopatogênicos previamente descritos e confirmados participarem no processo de doenças em diversas plantas. Considerando que esses genes possuem uma região conservada para esse fim, após o alinhamento dessas sequências foram construídos *primers* e o gene de endopoligalacturonase foi identificado no gênero *Guignardia* sp. Outra espécie pertencente a esse gênero é *G. mangiferae*, conhecida como endófito de citros, ou seja, coloniza os tecidos internos da planta hospedeira sem causar dano. Em análises enzimáticas foi observado que a quantidade de endopoligalacturonase produzida pela espécie patogênica é superior à da espécie endofítica, mostrando que essa enzima pode participar do processo de patogenicidade de *G. citricarpa.* Estudos para comprovar a participação de genes nos mecanismos de patogenicidade em diversas espécies utilizando reconhecimento de genes e genômica funcional, expressão e *knockout* de genes estão sendo realizados, permitindo uma visão geral da organização genômica do sistema patogênico. Pensando nisso, esse trabalho descreve pela primeira vez a metodologia de transformação genética de *G. citricarpa* via micélio e a obtenção de transformantes expressando a proteína verde fluorescente (GFP). Micélios do fungo foram transformados pelo sistema via *Agrobacterium tumefaciens* com o plasmídeo pFAT-gfp, contendo os genes de resistência à higromicina B (*hgr*) e da GFP. A otimização do protocolo de agrotransformação foi realizada a partir do teste de diferentes condições como: tipo de membrana, concentração de agente indutor e tempo de co-cultivo. A melhor condição incluiu a utilização de membrana de éster de celulose; 200 µM de AS e 96 horas de co-cultivo. Os transformantes apresentaram alta estabilidade mitótica (82%) e tiveram a inserção do gene *hgr* confirmada por PCR e do *gfp* observada em microscopia óptica de epifluorescência. Além disso, foi acompanhado o desenvolvimento do fungo inoculado em frutos, mostrando a interação planta-patógeno. O estabelecimento do sistema de transformação por *Agrobacterium* para *G. citricarpa* possibilita o uso dessa ferramenta para estudos de mutagênese insercional e interrupção gênica visando a identificação de genes importantes, como os envolvidos com os mecanismos de patogenicidade utilizados por esse fungo.

Palavras-chave: *Guignardia citricarpa;* Transformação genética; Interação fungo-planta; Citros; Microscopia

ABSTRACT

Genetic transformation and pathogenicity of *Guignardia citricarpa*

Brazil is the world leader in the international trade of frozen orange juice concentrate, taking part with around 82% of the traded volume. *Guignardia citricarpa* (anamorph *Phyllosticta citricarpa*) is a fungal pathogen of citrus plants, being described as the causal agent of citrus black spot (CBS), one of the most important fungal diseases of citrus worldwide. Its symptoms are black lesions on fruit, making them unsuitable for the international fresh market, since they are included in the quarantine list of the European Plant Protection Organization (EPPO). Moreover, when the disease is severe it may cause extensive premature fruit drop that reduces yields of fruit for processing. Taking this into consideration, the current work aimed to improve the understanding on the pathogenic mechanisms of this fungus. Firstly, in an attempt to elucidate this phenomenon, it was performed a search for pathogenicity genes previously reported to some pathogenic fungi and confirmed to participate in the process of infection in many plants , especially endopolygalacturonase. Primers were designed using the conserved regions of the genes and allowed the identification of the *Guignardia* spp. endopolygalacturonase gene for the first time. This enzyme has been described as playing important role in the process of fungal diseases in plants. In the present work, enzymatic analysis showed that the pathogen *G. citricarpa* produced significantly greater amounts of endopolygalacturonase when compared to *G. mangiferae*, a closely related fungus described as a citrus endophyte. This result suggests that this enzyme may participate in the process of pathogenicity, characteristic of the pathogenic species. Genetic transformation methods have been used to prove the involvement of genes in pathogenic mechanisms, however, a suitable methodology for *G. citricarpa* has not been described yet. In this way, this study describes for the first time a methodology for genetic transformation of *G. citricarpa* via mycelia and the successful generation of transformants expressing the green fluorescent protein (GFP) and resistant to the hygromycin B antibiotic. Mycelia of the fungus were genetically transformed via *Agrobacterium tumefaciens* hosting the plasmid pFAT-gfp, which carries the genes for resistance to hygromycin B (*hph*) and for GFP (*gfp*). The protocol was optimized through different test conditions (type of membrane, concentration of the inducing agent acetosyringone and duration of the co-cultivation period). The higher transformation efficiencies were observed using cellulose ester membrane, 200 µM of acetosyringone and 96 hours of co-cultivation. The transformants showed high mitotic stability (82%) and the insertion of the T-DNA was confirmed by PCR and GFP expression through epifluorescence microscopy observation. Moreover, it was observed the development of the fungus in inoculated oranges, showing the plant-pathogen interaction observed by epifluorescense microscopy. The establishment of the *Agrobacterium*-mediated transformation system for *G. citricarpa* represents an important step on the search for unveiling important genes of this fungus, such as those involved in the pathogenic mechanisms.

Keywords: *Guignardia citricarpa;* Genetic transformation; Pathogenicity; Fungus-plant interaction; Citrus; Microscopy

1 INTRODUÇÃO

O Brasil lidera a produção mundial de laranjas, não havendo a curto e médio prazos perspectivas de mudanças em tal panorama (ABECITRUS, 2009). Nos últimos anos, a Citricultura tem sido afetada por várias doenças, dentre elas a Mancha Preta dos Citros (MPC ou Citrus Black Spot - CBS), causada pelo fungo ascomiceto *Guignardia citricarpa* Kiely (*Phyllosticta ciricarpa)*. A doença causa lesões negras em frutos que se tornam impróprios para a comercialização, principalmente para a exportação, já que não são aceitos na União Européia, sendo o fungo causador classificado como patógeno quarentenário. Também nos EUA, a MPC é incluída na lista de doenças ameaçadoras e exóticas de citros, temida tanto pela capacidade de atacar os pomares e reduzir a produção, como por poder encontrar na Flórida condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento (CHUNG et al., 2009; TIMER, 1999).

Economicamente, a Citricultura possui um grande impacto no país. Apenas em termos de suco concentrado, o estado de São Paulo exportou cerca de US$ 1.910 bilhões no ano de 2008 (http://www.apta.sp.gov.br). Assim, tem-se prejuízos enormes com as perdas de produção e exportação devido às doenças, fazendo-se essencial o controle dos patógenos e o conhecimento dos seus mecanismos de patogenicidade que, na maioria das vezes, são pouco elucidados.

Por sua vez, uma outra espécie pertencente ao gênero *Guignardia* foi observada durante isolamentos de citros, mas sem causar danos às plantas, sendo identificada molecularmente como o endófito *G. mangiferae (Phylosticta capitalensis)* (BAAYEN et al.; 2002). Os microrganismos endofíticos são aqueles que colonizam o interior dos tecidos de plantas, sem apresentar efeito patogênico no hospedeiro (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Essa espécie é filogeneticamente relacionada à *G. citricarpa*, tanto morfologicamente como geneticamente, no entanto, até o presente, ainda faltam estudos que elucidem os mecanismos do desenvolvimento da patogenicidade deste fungo em particular.

As diferentes etapas envolvidas na diferenciação e desenvolvimento de patógenos no ambiente da planta ainda são pouco conhecidas, mostrando serem necessários mais estudos para avaliar a interação fungo-planta. A metodologia de

transformação genética de fungos tem sido utilizada para melhor entender essa interação. A técnica é também de grande valia para o melhoramento de espécies de importância biotecnológica. Além disso, o uso de diferentes estratégias de mutagênese insercional aleatória ou sítio-específica e silenciamento gênico pós-transcricional é bastante interessante para investigar a função gênica de fungos filamentosos (LORENZ, 2002; WELD et al., 2006; NAKAYASHIKI; NGUYEN, 2008).

Dentre os sistemas de transformação genética desenvolvidos até o momento para fungos filamentosos podemos citar aqueles que fazem uso de protoplastos (PEG, eletroporação e REMI), biobalística e via o vetor *Agrobacterium tumefaciens*. O último, em particular, tradicionalmente utilizado para transformar células vegetais (EADY et al., 1996), também foi empregado para leveduras (BUNDOCK et al., 1995), fungos filamentosos (DE GROOT et al.,1998) e até células humanas (KUNIK et al., 2001). Inúmeras espécies de fungos e oomicetos já foram geneticamente transformadas por esse método (MICHIELSE et al., 2005; LACROIX et al., 2006). Comparando-se com os outros, uma das vantagens de se utilizar o método baseado em *Agrobacterium* é que ele permite a obtenção de um maior número de transformantes (AMEY et al., 2002; CAMPOY et al., 2003; FITZGERALD et al., 2003; RODRÍGUEZ-TOVAR et al., 2005). Além disso, consiste num procedimento simples e reproduzível, permitindo que os genes interrompidos sejam posteriormente identificados (MULLINS et al., 2001; AMEY et al., 2002; FITZGERALD et al., 2003; MICHIELSE et al., 2005; RODRÍGUES-TOVAR et al., 2005).

A interação fungo-planta ainda pode ser estudada por diferentes abordagens como por meio de microscopia com o auxílio da utilização dos genes repórteres, como o gene da proteína verde fluorescente (*gfp*) da água viva *Aequorea victoria* e outras versões de proteínas autofluorescentes, como a proteína vermelha fluorescente (*Ds*Red) do coral *Discosoma striata* (LORANG et al., 2001; MIKKELSEN et al., 2003).

Nesse contexto, esse trabalho teve por objetivo principal estabelecer e otimizar um sistema de transferência gênica mediado por *A. tumefaciens* para *G. citricarpa,* bem como obter transformantes estáveis quanto à expressão da proteína verde fluorescente (GFP) a fim de avaliar a interação de *G. citricarpa* em frutos de laranja pela abordagem microscópica. O estudo é de especial importância já que se obteve um melhor

entendimento dos mecanismos de patogenicidade de *Guignardia citricarpa*, na tentativa de auxiliar futuramente o controle de MPC. Os tranformantes obtidos permitem o estudo da interação planta-patógeno monitorando seu comportamento durante a fase de infecção de frutos, buscando uma melhor compreensão desse patossistema.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Citricultura brasileira e a MPC

A citricultura brasileira pode ser caracterizada como uma das mais típicas atividades agroindustriais do país, apoiada na demanda de produtos *in natura*, ou seja, frutas frescas, e produtos processados representados por suco concentrado, pectina e óleos essenciais (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, 1997). Levantamentos apontaram uma produção de 19.080.755 toneladas de laranjas em território nacional em fevereiro de 2010 (IBGE, 2010). Dessa forma, o Brasil é líder absoluto no comércio internacional de suco de laranja concentrado congelado (SLCC), participando com aproximadamente 82% do volume comercializado no mundo (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2003).

O agronegócio da citricultura é um dos setores brasileiros mais competitivos. Ocupa uma área de 843.266 mil hectares, concentrada no Estado de São Paulo, que participa com 78,42% da produção nacional de frutos (IBGE, 2010), sendo que a cadeia produtiva de citros preenche aproximadamente 20 mil propriedades agrícolas, agregando em torno de 140 mil famílias (60 mil apanhadores e 80 mil empregados e pequenos plantadores) (GAMA et al., 2000), o que mostra também o importante aspecto social dessa cultura. De acordo com previsão do Instituto de Economia Agrícola (IEA/Apta/SAA) e da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral da Secretaria (CATI), a produção na safra agrícola 2008/09 foi estimada em 352,57 milhões de caixas de laranja (http://www.iea.sp.gov). Em termos financeiros, a laranja para a indústria ocupa a terceira posição do Estado, com valor da produção de R$ 2,5 bilhões, atrás apenas da cana-de-açúcar e da carne bovina. Dentro do contexto do mercado internacional, em 2008, o estado de São Paulo exportou US$1.996 bilhões em laranja (suco concentrado, frutas frescas, entre produtos derivados), sendo US$ 1.910 bilhões apenas em suco concentrado (http://www.apta.sp.gov.br).

Apesar disso, a citricultura brasileira vem enfrentando prejuízos causados pela ocorrência de pragas e doenças, como a clorose variegada dos citros (CVC), tristeza

dos citros (CTV), leprose dos citros, cancro cítrico, morte súbita dos citros, mancha preta dos citros (MPC), verrugose, melanose, rubelose, podridão floral, mancha de alternaria, e o *greening* (FEICHTENBERGER; SPÓSITO, 2004). A MPC vem provocando perdas desde a produção até a comercialização das frutas. Os tipos de lesões que ocorrem restringem-se praticamente à casca do fruto afetando sua estética, mas podem causar graves prejuízos pela queda dos frutos prematuramente, reduzindo a produtividade das plantas. Em ataques severos, perdas de até 80% já foram observadas.

Essa doença dificulta a comercialização entre os Estados da Federação e impõe restrições fitossanitárias dos países importadores de frutas frescas (AGUILAR-VILDOSO et al., 2002), o que implica em prejuízos econômicos importantes para o país. Frutos com sintomas da doença são muito depreciados no mercado nacional e restringem as exportações de frutas cítricas brasileiras, principalmente quando destinadas ao mercado europeu. A doença é considerada quarentenária A1 na União Européia (UE), por ainda não estar presente em seus países membros. A detecção da doença em um único fruto acarreta no impedimento do desembarque da mercadoria.

Em março de 2010, foi identificada pela primeira vez a doença em campos da Flórida (SCHUBERT; SUTTON; JEYAPRAKASH, 2010). Esse relato foi inclusive investigado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos e confirmado o que eles tanto temiam (ADASKAVEG et. al., 2010). Essa doença não havia sido descrita na América do Norte até então, marcando uma grande disseminação desse patógeno num contexto geográfico. Até essa descoberta, os locais mais próximos em que já havia sido identificada a presença do patógeno eram em países como o Brasil e a Argentina, embora frutos infectados tenham sido interceptados em viagens vindas de Cuba para Miami (SMITH, 2006).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e os órgãos estaduais de Defesa Agropecuária estabeleceram um programa de manejo de risco da doença para atender às exigências dos países importadores europeus. Entre as medidas, está a exigência de cadastramento dos produtores, das unidades de produção (UP) e das casas de embalagem (FEICHTENBERGER; SPOSITO, 2004).

As UPs (pomares cadastrados para a exportação) devem estar sob acompanhamento oficial para assegurar que não apresentam a doença. Inspeções de campo são feitas nas UPs durante todo o ciclo de produção. Quando a doença é detectada, a UP contaminada é excluída do processo de exportação. Caso não seja detectada nas inspeções de campo, frutos são amostrados na pré-colheita, em 1% das plantas (1 fruto/planta), e as amostras são encaminhadas a laboratórios oficiais para realização do teste de indução de sintomas da doença. O teste visa detectar a presença do fungo causador da doença em frutos que, embora infectados, ainda não apresentam os sintomas, pois o período de incubação da mancha preta pode ser muito elevado. Se o resultado do teste for positivo, a UP correspondente é também excluída do processo de exportação (FEICHTENBERGER; SPOSITO, 2004).

As perdas são maiores em limoeiros verdadeiros, tangoreiros 'Murcott', mexiriqueira 'Rio' e 'Montenegrina', algumas tangerineiras e laranjeiras doces, principalmente as de maturação tardia, como 'Valência', 'Natal', e 'Folha Murcha'. No entanto, a doença nunca foi encontrada em lima ácida Tahiti.

A mancha preta já foi relatada no Brasil nos estados do Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Espírito Santo, Santa Catarina, Amazonas e Paraná, além de países como Argentina, Peru, Uruguai, África do Sul, Moçambique, Quênia, Zambia, Zimbabue, Japão, China, Hong Kong, Indonésia, Filipinas, Taiwan, Austrália, Nova Zelândia, (EPPO, 2006) e muito recentemente, Estados Unidos (SCHUBERT; SUTTON; JEYAPRAKASH, 2010; ADASKAVEG et. al., 2010).

Dentro desse contexto, estudos sobre a MPC e seu agente causal, o fungo *Guignardia citricarpa*, são de extrema importância na área agrícola, representando um avanço no entendimento desse sistema patogênico e auxiliando no seu controle, visando a diminuição das perdas na Citricultura do país devido à essa e outras doenças.

2.1.2 O gênero *Guignardia* (Anamorfo: *Phyllosticta*)

O gênero *Guignardia* pertence ao filo Ascomycota, ao subfilo Pezizomycotina, à classe Dothideomycetes e à ordem Botryophaeriales (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy e http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp). O gênero *Guignardia* foi descrito em 1892 por Viala e Ravaz e compreende as formas teleomorfas de espécies de *Phyllosticta* e de alguns outros gêneros relacionados de fungos imperfeitos, geralmente saprófitas ou semiparasitas de folhas.

O gênero *Phyllosticta* foi descrito por Van Der Aa (1973) para fungos crescendo em folhas e formando pequenos picnídios com conídios hialinos e unicelulares no tecido hospedeiro, e possui mais de 2000 espécies que podem ser separadas principalmente pelo seu hospedeiro ou nas diferenças características de sintomas e morfologia, picnídios, conídios e micélio (VAN DER AA, 1973), embora apenas uma pequena fração de fitopatógenos é realmente hospedeiro-específica. Apesar disso, experimentos com espécies de *Guignardia* e seus anamorfos, mostraram a especificidade para uma espécie ou espécies de um gênero de planta hospedeira (BISSET; PALM, 1989; LEUCHTMANN et al., 1992). Entretanto, há relatos da presença de espécies *Phyllosticta* semelhantes morfologicamente em plantas não aparentadas, crescendo perto de pomares de citros, onde avaliaram a doença Mancha Preta dos Citros por *G. citricarpa* (KIELY, 1948; SCHUEPP, 1961). A maioria dos trabalhos de isolamento de fungos desse gênero os classifica como fitopatogênicos, tendo sido descritos em abacate e tomate (BAKER, 1938), arroz (SUGHA et al., 1986), citros (McONIE, 1964), eucalipto (CROUS et al., 1993) e cana-de-açúcar (PONS, 90). Entretanto, alguns autores isolaram espécies de *Phyllosticta* de material aparentemente sadio, descrevendo-os como endófitos (CARROLL, 1986; PETRINI, 1991; LEUCHTMANN et al., 1992, GLIENKE, 1995).

2.1.3 A espécie patogênica *Guignardia citricarpa*

O agente causal da doença Mancha Preta dos Citros (MPC) é um Ascomiceto, Loculoascomiceto, da ordem Dothideales e família Dothideacea (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy e http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp). Inicialmente, a fase anamórfica ou imperfeita do fungo foi considerada como *Phoma citricarpa* (McALp.) Petrak (FAWCETT, 1936). Atualmente, essa fase é referida como *Phyllosticta citricarpa* Van der Aa. A fase teleomórfica ou sexual corresponde a *G. citricarpa* Kiely (KIELY, 1948).

A MPC foi descrita na Austrália tanto em pomares como em frutos em pós-colheita, no ano de 1895, causando grandes perdas na produção de citros (SUTTON; WATERSON, 1966). Essa doença foi responsável por prejuízos de milhões de dólares em várias regiões produtoras de citros no mundo (CALAVAN, 1960) . Sua ocorrência também foi relatada em Moçambique, China, Taiwan, Filipinas, Indonésia, Japão, Argentina, Peru, Uruguai entre outros (SUTTON; WATERSON, 1966), sugerindo a ocorrência cosmopolita desse patógeno, que se desenvolve na ocorrência de condições ambientais favoráveis, principalmente umidade, em regiões tropicais (PAUL et al., 2005). Embora essa doença não danifique a qualidade interna dos frutos (FAGAN; GÓES, 2000), apresentando sintomas restritos ao flavedo (CARDOSO FILHO, 2003), ela inutiliza os frutos para o comércio *in natura*, limitando-os apenas para o processamento da indústria de suco cítrico concentrado (TIMMER et al., 2000; AGUILAR-VILDOSO et al., 2002).

As primeiras descrições desse fungo no Brasil aconteceram no município de Piracicaba, no estado de São Paulo, no ano de 1940 em frutas cítricas expostas em uma feira livre (AVERNA-SACCÁ, 1940). Entretanto, não foi mencionada sua importância em termos de perdas. A doença permaneceu esquecida durante vários anos, possivelmente devido a uma temporária redução do inóculo resultante da epidemia da tristeza dos citros, que redundou na eliminação de aproximadamente onze milhões de árvores nas décadas dos 30 a 40 (GÓES, 1998). A partir da década de 80, a MPC passou a afetar outras regiões, como o estado do Rio de Janeiro (ROBBS et al., 1980); Vale do Caí, no Rio Grande do Sul (ROBBS; BITTENCOURT, 1995), e no estado

de Minas Gerais e Espírito Santo (COSTA et al., 2003). Atualmente, as perdas estimadas na produção de frutos devido à essa doença são de 11%, na região citrícola do Vale do Caí-RS (PANZENHAGEN et al., 2008).

O patógeno *G. citricarpa* é específico de citros (PAUL et al., 2005), podendo atingir folhas e frutos pelos seus esporos assexuais (picnidiósporos), que se desenvolvem nas lesões, principalmente em frutos e menos freqüentemente nas folhas, no pedúnculo e também em folhas mortas; ou pelos seus esporos sexuais (ascósporos) que se desenvolvem nas folhas em decomposição no solo (FEICHTENBERGER, 1996). Os esporos, quando em contato com a superfície dos tecidos suscetíveis e em condições ambientais apropriadas, podem germinar dando origem a um apressório, seguindo-se de uma hifa infectiva que penetra na cutícula e se transforma em uma pequena massa de micélio que permanece quiescente ou em estado latente (McONIE, 1964; McONIE, 1967). Os ascocarpos ou peritécios são produzidos somente em folhas em decomposição no solo. Quando as folhas estão quase secas, não quebradiças e com uma consistência igual a de papel, é a fase de decomposição intermediária onde os peritécios se encontram completos e maduros. Já nas etapas iniciais de decomposição e no final desse processo, em que a folha quebra-se ao tato, encontra-se apenas estruturas reprodutivas vazias (ALCOBA et al., 2000). Os ascocarpos não são encontrados em lesões de frutos e folhas, ficam isolados ou agregados, globosos, imersos, de coloração castanho-escuro a preta com 95-125 µm de diâmetro, ostíolo não papilado, circular, com 10-17,5 µm de diâmetro e pseudoparáfises ausentes. Os ascos são cilíndricos clavados (40-64 X 12-15 µm), de parede bitunicada contendo oito ascósporos unicelulares, hialinos, multigutulados, cilíndricos com o centro dilatado (12,5-16 X 4,5-6,5 µm) e apêndices hialinos nas duas extremidades obtusas (FEICHTENBERGER et al., 1997; BALDASSARI et al., 2001). O desenvolvimento dos peritécios nas folhas em decomposição depende de infecções que tenham ocorrido durante o período de susceptibilidade. A disponibilidade de ascósporos depende, dentre outros fatores, do momento da desfolha e do tempo de decomposição das folhas, estando diretamente relacionada com a temperatura e as precipitações (ALCOBA et al., 2000). Rodrigues et al. (2007) observaram a formação destas estruturas nos restos culturais em decomposição no solo, em experimentos com folhas destacadas de

laranjeiras de pomares do Estado de São Paulo. Mais tarde, constatou-se a resistência de isolados ao fungicida carbendazim, mostrando um indício de que está ocorrendo resistência do fungo ao fungicida nos pomares brasileiros, provavelmente gerado pelo uso intensivo desses agroquímicos e à pressão de seleção por ele exercida.

A fase anamórfica *P. citricarpa* produz picnídios em lesões de frutos e folhas e, ocasionalmente, no pedúnculo de frutos. Eles também são produzidos em grande número em folhas mortas. Os picnídios são de coloração marrom-escuro ou preta, solitários ou agregados, globosos (115-190 µm de diâmetro), apresentando um ostíolo levemente papilado e circular, de 12-14,5 µm de diâmetro (FEICHTENBERGER et al., 1997). Os conídios apresentam forma ovóide a elíptica (8-10,5 X 5,5-7 µm) ou subglobosos, são hialinos, unicelulares, multigutulados, com um apêndice (5-10 µm) hialino numa das extremidades (FEICHTENBERGER et al., 1997; BALDASSARI et al., 2001). Normalmente os picnidiósporos ficam agregados devido à substância mucilaginosa que os recobre. Essa mucilagem serve de proteção contra o ressecamento das estruturas do fungo quando expostas a ambientes adversos (PUNITHALINGAM; WOODHAMS, 1982).

2.1.4 A espécie endofítica *Guignardia mangiferae*

A espécie endofítica *G. mangiferae* é classificada como um fungo Ascomiceto, Loculoascomiceto, da ordem Dothideales e família Dothideacea (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy e http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp).

Carroll (1986) utilizou o termo endófito para organismos que causam colonização assintomática em folhas e ramos de plantas sadias, sendo encontrados frequentemente no interior das plantas. Petrini (1991) propôs uma maior abrangência para o termo endófito, a fim de incluir todos os microrganismos que habitam a parte aérea das plantas, sendo capazes de colonizar, em alguma fase de seu ciclo de vida, os tecidos internos dos vegetais sem causar dano aparente.

Recentemente uma nova definição de endofíticos foi relatada por Azevedo e Araújo (2007) que os definem como microrganismos que podem ou não crescer em

meios de cultura, ou seja, cultivados ou não, e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas visíveis; e Mendes e Azevedo (2007) acrescentaram à essa definição a divisão em dois tipos: Tipo I - os que não produzem estruturas externas à planta; e Tipo II - os que produzem estruturas externas à planta.

Com relação à doença, inicialmente, acreditava-se que uma das principais características do patógeno seria o fato de tanto folhas como frutos poderem estar contaminados sem apresentarem os sintomas típicos da doença, pois, isolados morfologicamente similares a *G. citricarpa* representam um grupo dominante de fungos encontrados em tecidos saudáveis de diferentes espécies de tangerina (GLIENKE, 1995), sendo isolados endofiticamente, como um patógeno facultativo, em plantas de citros (ARAÚJO et al., 2001). Assim, consider-se uma espécie avirulenta, hipovirulenta ou virulenta em fase latente (GLIENKE-BLANCO et al., 2002). Porém, Baayen et al. (2002) por meio de estudos moleculares e cultivo *in vitro* mostraram que o isolado classificado como avirulento é na verdade outra espécie conhecida como *Guignardia mangiferae* (*Phylosticta capitalensis*), geralmente encontrada endofiticamente em árvores. Os mesmos resultados também foram encontrados por Rodrigues (2006) e Rodrigues et al. (2004), que isolaram e caracterizaram *Guignardia mangiferae* (syn. *G. endophyllicola*) de laranjas.

Diversos testes para identificação do agente causador da doença (*Guignardia citricarpa*) têm sido elaborados nos últimos anos a fim de discriminar as espécies patogênica e endofítica (*G. mangiferae*), em especial devido à regulamentação fitossanitária da União Européia que restringe a importação de citros, com o objetivo de prevenir a introdução de patógenos (BONANTS et al., 2003). Com isso passou a existir um interesse muito grande no desenvolvimento de métodos rápidos de detecção do fungo nos frutos importados.

Dessa forma, Bonants et al. (2003) desenvolveram *primers* específicos baseado na região ITS do DNA ribossomal para distinguirem isolados de *G. citricarpa* e *G. mangiferae*, com grande utilidade na inspeção de produtos de importação na União Européia, mas com pouco sucesso na amplificação de isolados endofíticos. Com o

mesmo intuito, Meyer et al. (2006) desenvolveram *primers* espécie-específicos baseados na região ITS para detectar e distinguir essas espécies de *Guignardia*.

Outros trabalhos comparando os vários *primers* de detecção têm sido realizados para avaliar a precisão destes e obtiveram resultados eficientes (PERES et al., 2007). Alguns visam, ainda, o desenvolvimento de outros *primers* mais rápidos, baratos e sensíveis como o TaqMan PCR, combinando métodos de PCRq para diagnose (van GENT-PELZER et al., 2007).

A partir da descrição da espécie endofítica, houve uma reclasssificação de diversos isolados do fungo, em especial na Nova Zelândia, onde isolados que eram considerados *G. citricarpa* foram identificados como *G. magiferae* por meio de análise de seqüência ITS (EVERETT; REES-GEORGE, 2006), mostrando a importância de estudos que diferenciem essas espécies, principalmente os mecanismos de colonização e estabelecimento na planta hospedeira.

2.1.5 Fungos associados às plantas

Grande esforço tem sido realizado ultimamente na busca pela estimativa do número de espécies de fungos existentes no planeta. Acredita-se que existam entre 1,5 (HAWKSWORTH, 2004), e 8,25 milhões de espécies fúngicas (FRÖHLICH; HYDE, 1999). Cerca de 100.000 delas já foram descritas (HAWKSWORTH, 2004), o que representa menos de 7% da diversidade total estimada, considerando a estimativa de 1,5 milhões de espécies, e menos de 1,2%, considerando a estimativa de 8,25 milhões de espécies. Grande parte dessas espécies fúngicas vive associada às plantas, seja na superfície, no interior dos tecidos ou na rizosfera, estabelecendo interações que podem variar do mutualismo ao parasitismo. Aliás, acredita-se que todas as espécies de plantas que vivem em ecossistemas naturais estabelecem algum tipo de associação simbiótica com fungos (RODRIGUEZ et al., 2009).

Dentre essas relações, apenas cerca de 10% de todas as espécies conhecidas de fungos podem causar doenças em plantas, sendo alguns desses fungos considerados como parasitas obrigatórios, estando associados ao hospedeiro durante todo seu ciclo de vida (KAHMANN; BASSE, 2001). Os fungos saprofíticos podem

proliferar tanto em tecido vivo como em restos de material vegetal morto, já os parasitas não obrigatórios dependem da planta somente em alguns estágios de seu ciclo de vida. Essas diferenças no estilo de vida requerem adaptações específicas ao hospedeiro. Considerando que fungos saprofíticos necessitam apenas dominar o sistema de defesa do hospedeiro, e podem fazer isso pela morte de células por meio da produção de toxinas específicas e/ou por secreção de enzimas líticas, a interação entre fungos biotróficos e plantas tem, necessariamente, um ajuste fino por meio de sinais das duas partes (KAHMANN; BASSE, 2001). Fungos patogênicos biotróficos obrigatórios, como ferrugens e míldios, vivem em íntimo contato com seu hospedeiro sem induzir morte de células e respostas de defesa, enquanto que patógenos necrotróficos podem causar necroses em penetração avançada. Patógenos biotróficos facultativos podem ser cultivados em condições axênicas mas, alguns como *Ustilago maydis*, necessitam íntimo contato com a planta hospedeira para concluir seu ciclo de vida sexual (KAHMANN; BASSE, 2001). Fungos hemibiotróficos como *Phytophthora infestans*, *Cladosporium fulvum*, *Magnaporthe grisea* e *Colletotrichum* spp. podem completar seu ciclo de vida fora da planta, mas desenvolvem estruturas especializadas durante a infecção que não são observadas durante crescimento axênico (KAHMANN; BASSE, 2001).

O ciclo de vida dos fungos associados às plantas inicia com a germinação do esporo seguida do crescimento da hifa na folha ou superfície de raiz. A penetração de fungos endofíticos na planta pode ocorrer por aberturas naturais do hospedeiro como estômatos (WAGNER; LEWIS, 2000), e também tem sido observado que fungos endofíticos como *Piriformospora indica* podem produzir apressórios que favorecem a penetração nos tecidos da planta hospedeira (VARMA et al., 1999). Entretanto, outros fungos como *Beauveria bassiana* parecem não precisar de apressórios para penetrar na planta hospedeira, pois, foi observado que esporos de *B. bassiana* germinam sobre a planta de milho e crescem de forma aleatória nessa superfície, onde posteriormente podem penetrar via estômatos ou por entre as células da epiderme através da cutícula. Na penetração, deve estar envolvida a ocorrência de ação enzimática a partir das hifas de *B. bassiana* sobre a cutícula dos tecidos do hospedeiro, permitindo assim a sua penetração (WAGNER; LEWIS, 2000).

Fungos patogênicos podem colonizar a planta hospedeira por meio do desenvolvimento de haustórios, os quais penetram na célula vegetal e absorvem os nutrientes da planta. Além disso, a presença dessas estruturas pode direcionar o metabolismo da planta na direção dos requerimentos nutricionais do patógeno (AGRIOS, 1997). Durante o desenvolvimento da patogenicidade na interação entre fungos e plantas são expressos vários genes envolvidos na formação de estruturas de infecção e síntese de enzimas para degradação da parede vegetal do hospedeiro. Esses genes podem se expressar durante as fases de contato inicial com o hospedeiro, em resposta à defesa da planta, ou na fase de necrose (KAHMANN; BASSE, 2001). *Colletotrichum gloeosporioides* em contato com a superfície do hospedeiro expressa os genes *cap20* e *cap22*, os quais atuam na formação do apressório (KOLATTUKUDY et al., 1995), *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* em estágios avançados de infecção expressa o gene *pl1* (pectate lyase) (HUERTAS-GONZÁLEZ et al., 1999) que pode atuar na degradação da parede do hospedeiro, facilitando a sua penetração.

No entanto, as diferentes etapas envolvidas na diferenciação de patógenos no ambiente da planta são pouco conhecidas, em particular, ainda são desconhecidos os compostos vegetais que disparam a proliferação e desenvolvimento de fungos, mostrando serem necessários, ainda, muitos estudos para se avaliar a interação fungo-planta, bem como os fatores que podem ativar a patogenicidade do fungo.

2.1.6 Identificação de genes relacionados à patogenicidade

A presença de determinados genes de um fungo confere patogenicidade, controlando uma seqüência complexa de eventos que ocorrem durante a infecção, incluindo aqueles requeridos para a formação de apressório, que promove penetração direta por meio da cutícula da planta hospedeira. A penetração do patógeno pela parede pode ser decorrente apenas de ação mecânica, ou também da participação de enzimas que degradam a parede celular da planta hospedeira (IDNURM; HOWLETT, 2001; KAHMANN; BASSE, 2001; ARO et al., 2005).

As inúmeras modificações morfológicas e fisiológicas sofridas por ambos, fungo e planta, durante o desenvolvimento da interação, devem ser resultantes de um

complexo e refinado mecanismo de regulação gênica. Considerando-se que dentre os aproximadamente 100.000 genes presentes nos organismos superiores, cerca de apenas 15% são realmente expressos em uma única célula (LIANG; PARDEE, 1992), é bastante provável que os produtos de genes vegetais ou fúngicos modulados durante a interação (induzidos ou suprimidos), tenham papel essencial na sua regulação. Nesse sentido, dados da literatura têm mostrado a existência de genes específicos para cada tipo de interação e também a presença de genes conservados entre interações patogênicas e simbióticas (GÜIMIL et al., 2005; SCHULZ; BOYLE, 2005).

Nos fungos biotróficos, ocorre a formação de uma estrutura especializada, denominada haustório. Durante a infecção o patógeno penetra a parede celular e invagina a membrana plasmática da célula hospedeira onde desenvolve o haustório (CATANZARITI et al., 2007). Consequentemente, por meio dos genes *Avr*, ocorre a liberação de proteínas pelo patógeno, que funcionam como efetores no reconhecimento pelo sistema de defesa da planta (CATANZARITI et al., 2007). As proteínas Avr representam efetores com importante papel durante a infecção. Os genes de avirulência são outra categoria que vem sendo bastante estudada na interação planta-fungo (IDNURM; HOWLETT, 2001).

Dessa forma, a patogenicidade de um fungo é controlada por diversos genes, sendo que alguns deles podem exercer uma função principal, sem o qual o fungo é incapaz de reconhecer, penetrar ou colonizar o hospedeiro. A ausência ou presença do gene funcional pode resultar em isolados não patogênicos ou avirulentos.

A identificação dos genes relacionados à interação fungo-planta tem sido mais facilmente detectados por meio das novas técnicas existentes, como: seqüências expressas (ESTs), análise serial da expressão gênica (SAGE) e técnicas baseada em *arrays* (macroarranjos e microarranjos), transformação genética (MULLINS; KANG, 2001), entre outras (KAHMANN; BASE, 2001; LÉVESQUE, 2001; XU et al., 2006).

2.1.7 A enzima endopoligalacturonase

A parede celular de plantas é constituída principalmente de biopolímeros de celulose, hemicelulose, lignina e pectina (ARO et al., 2005). Para os fitopatógenos, a parede celular das plantas é a maior barreira de infecção, já que é composta desse conjunto de polissacarídeos e proteínas (WALTON, 1994). Enzimas extracelulares de degradação da parede celular da planta hospedeira são produzidas por fungos, bactérias e nematóides, as quais podem ser pectinases, cutinases, celulases, xilanases, proteases, entre outras, mostrando que a parede celular de plantas constitui o fator chave para interação fungo-planta.

Endopoligalacturonase é uma enzima que hidrolisa ligações galacturosídicas de substâncias pécticas. A ação de enzimas pécticas, em particular a endopoligacturonase, parece ser um pré-requisito para a degradação da parede celular (KARR; ALBERSHEIM, 1970; FERREIRA et al., 2006). As poligalacturonases têm papel chave na patogenicidade do fungo por meio da despolimerização da homogalacturona, o principal componente da parede celular e para a subseqüente degradação por outras enzimas.

As enzimas do complexo pectinolítico têm por substrato natural heteropolissacarídeos ramificados de alto peso molecular, as substâncias pécticas, que constituem a lamela média e a parede primária de plantas superiores (WHITAKER, 1984). Essas enzimas são produzidas por plantas, sendo encontradas tanto na seiva quanto nos frutos, e por microrganismos como bactérias, protozoários, leveduras e fungos filamentosos, e são classificadas, segundo seu modo de ação, como enzimas desesterificantes e despolimerizantes (FOGART; KELLY, 1983). Enzimas do tipo despolimerizantes catalisam a quebra das ligações ß(1,4) da cadeia principal do polissacarídeo péctico, quebrando as ligações glicosídicas por hidrólise (hidrolases) ou por ß-eliminação (liases). As hidrolases que rompem as ligações glicosídicas ß(1,4) entre os ácidos galacturônicos, por adição de uma molécula de água, gerando pectatos, são denominadas poligalacturonases (REXOVÁ-BENKOVÁ-MARKOVIS, 1976). Já a pectina liase atua sobre pectinas com elevado grau de esterificação, pelo mecanismo

de trans-eliminação, sendo capaz de romper as ligações sem a ação anterior de outras enzimas.

A produção dessas enzimas pelos fungos é regulada principalmente ao nível transcricional (ARO et al., 2005). Os genes são induzidos na presença do polímero ou molécula derivada desses polímeros e reprimidos sob condições de crescimento, onde a produção dessas enzimas não é mais necessária (ARO et al., 2005).

Vários estudos com esses genes vêm sendo realizados. A regulação de um gene da pectina liase foi avaliada em *Penicillium occitanis*, sendo que as sequências de nucleotídeos e amino ácidos mostraram similaridade com genes de pectina liases de outros fungos. Garcia-Maceira et al. (2001) estudaram o patossistema tomate e *Fusarium oxysporum* para confirmação da participação da endopoligalacturonase (gene *pg5*) na penetração e colonização da planta hospedeira. A enzima endopoligalacturonase pode ser representada por uma única cópia no genoma do fungo, ou estar presente em uma família de multigenes, formando *clusters*.

.

2.1.8 Transformação genética de fungos via *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) como ferramenta para estudos de interação com a planta

Os sistemas de transformação genética têm sido empregados com diversos objetivos, mas principalmente para estudos da interação fungo-planta e interrupção gênica para estudo de diferentes genes, principalmente relacionados à patogenicidade (MULLINS; KANG, 2001).

Agrobacterium tumefaciens é uma bactéria do solo, aeróbica, gram-negativa, não formadora de esporos, capaz de induzir a formação de tumores em plantas (BRASILEIRO, 1998; BRASILEIRO; LACORTE, 1998; STAFFORD, 2000). A metodologia de transformação genética mediada por *Agrobacterium* tem sido utilizada com grande sucesso para transformação de células vegetais (TZFIRA; CITOVSKY, 2006), passando também a ser empregada de forma eficiente como mediadora da transformação primeiramente de leveduras (BUNDOCK et al., 1995), e posteriormente adaptada para fungos filamentosos (De GROOT et al., 1998) e até células humanas (KUNIK et al., 2001). Ao infectar as plantas, *Agrobacterium* têm a capacidade de causar uma doença denominada galha-da-coroa, caracterizada pela proliferação descontrolada

das células próximas à região do colo da planta, resultando na formação de um tumor (SAVKA et al., 1996; AGRIOS, 1997). Nessas bactérias, a presença de um plasmídeo de alto peso molecular (200Kb), denominado plasmídeo Ti ("tumor inducing"), está associada à essa capacidade da infecção. O plasmídeo Ti contém vários genes responsivos pela transferência do T-DNA (DNA de transferência). Os responsáveis por essa transferência estão localizados em uma região do plasmídeo Ti que é denominada "região *vir*". A região *vir* tem cerca de 30kb e contém pelo menos 10 genes (*vir* A – *vir* J), cujos produtos são vitais para o processamento e transferência do T-DNA à planta (WEI et al., 2000), fortemente induzida pelo composto denominado acetoseringona (AS) (KADO, 1991).

O T-DNA é uma região que contém oncogenes e é flanqueada por duas seqüências curtas, de aproximadamente 25 pares de bases, denominadas de borda esquerda (LB) e borda direita (RB). O processo de transferência envolve uma série de etapas tais como quimiotaxia, adesão, indução da expressão dos genes *vir*, processamento do T-DNA, transferência do T-DNA, direcionamento do T-DNA ao núcleo e integração no genoma da célula hospedeira (TZFIRA et al., 2004; CITOVSKY et al., 2007).

Para a transformação genética *in vitro* via *Agrobacterium tumefaciens*, o plasmídeo Ti das linhagens de *Agrobacterium* não apresenta a região T-DNA nem as bordas LB e RB, e assim a bactéria perde a capacidade de transferir material genético para a célula hospedeira. Dessa forma, o plasmídeo Ti passa a ser denominado de plasmídeo desarmado ou *helper*, pois apesar de não ter a região T-DNA, contém os genes *vir* responsáveis pela maquinaria de transferência. Já a região do T-DNA é modificada pela remoção dos oncogenes substituídos por genes de interesse e inserida em um segundo vetor, denominado vetor binário, que são vetores derivados de plasmídeos capazes de se replicar tanto em *Escherichia coli* quanto em *Agrobacterium*, e se mantêm de forma independente do plasmídeo Ti. Esse vetor binário é reintroduzido em uma linhagem de *A. tumefaciens* contendo o plasmídeo desarmado que readquire a capacidade de transformar células hospedeiras (LACORTE; ROMANO, 1998).

Uma das vantagens de se utilizar o método baseado em *Agrobacterium* para transformar fungos filamentosos está relacionada à eficiência de transformação. Alguns

trabalhos compararam a eficiência de transformação obtida por esse método com aquela obtida por protoplasto PEG e/ou Biobalística, e demonstraram que o sistema *Agrobacterium* permite a obtenção de um maior número de transformantes (AMEY et al., 2002; CAMPOY et al., 2003; FITZGERALD et al., 2003; RODRÍGUEZ-TOVAR et al., 2005). Além disso, podemos citar a facilidade quanto ao material do inóculo inicial do fungo a ser utilizado no processo, apresentando várias opções como micélio, esporos, corpo de frutificação; bem como a geração de um banco de transformantes mitoticamente estáveis podendo ser utilizados para inúmeras pesquisas futuras, desde sua caracterização até seu potencial biotecnológico.

A metodologia de agrotransformação, por apresentar inúmeras vantagens, vem sendo utilizada cada vez mais para fungos filamentosos. É crescente o número de trabalhos que utilizam essa metodologia, sendo que hoje mais de uma centena de fungos já foi transformada por essa ferramenta biotecnológica, incluindo fungos dos filos Ascomicota, Basidiomicota, Zigomicota, Glomeromicota e também Oomicetos (MICHIELSE et al., 2005; LACROIX et al., 2006; FÁVARO, 2009) (Tabela 1).

A integração do DNA exógeno em fungos filamentosos pode ocorrer tanto por recombinação homóloga como por recombinação heteróloga, sendo que esta tem sido bastante utilizada para a obtenção de mutagênese aleatória em substituição aos métodos para obtenção de mutantes via mutagênese química e radioativa (KHANG et al., 2005). A vantagem da mutagênese insercional via T-DNA sobre os métodos clássicos de indução de mutação, é que as sequências que flanqueiam o sítio de inserção podem ser identificadas facilmente. A identificação dessas regiões permite associar a função de um gene a um dado fenótipo mutante. Dentro desse contexto, ou seja, de mutagênese insercional com vistas à obtenção de mutantes aleatórios e subsequente identificação do gene mutado, é extremamente relevante o número de cópias do DNA exógeno integrado ao genoma do fungo transformado por *Agrobacterium*. A obtenção de transformantes com inserções únicas é desejável, pois só assim pode-se assegurar que o fenótipo mutante está associado ao gene interrompido. A maioria dos trabalhos que fizeram uso do sistema *Agrobacterium* para a transformação de fungos demonstra que o T-DNA se insere em sítios aleatórios, e que há uma predominância de inserções únicas no genoma do hospedeiro (de GROOT et

al., 1998; COVERT et al., 2001, MORIOKA et al., 2006). Essas características tornam o método de agrotransformação bastante atraente quando se deseja obter fenótipos mutantes e identificar os genes a estes relacionados via mutagênese insercional aleatória (RHO et al., 2001; COMBIER et al., 2003; ROGERS et al., 2004; LECLERQUE et al., 2004; WALTON et al., 2005; WHITE; CHEN, 2007; ZHONG et al., 2007; TALHINHAS et al., 2008). Outra utilidade atrativa é quando se deseja realizar estudos para mutagênese direcionada ou em experimentos de nocaute gênico (GOUKA et al., 1999; ZWIERS et al., 2001; ZHANG et al., 2003; ZEILINGER, 2004; SUGUI et al., 2005; KHANG et al., 2005; GONG et al., 2007; GODIO; MOON et al., 2008; MARTÍN, 2009).

Vários métodos têm sido descritos para identificar as seqüências de DNA que flanqueiam as bordas direita e esquerda do T-DNA inserido no genoma fúngico (BALZERGUE et al., 2001; COTTAGE et al., 2001). Dentre essas metodologias, a técnica de TAIL-PCR (*Thermal Asymmetric Interlaced*), descrita primeiramente por Liu et al. (1995), vem sendo bastante utilizada na tentativa de identificar genes em organismos eucarióticos. Ela permite rápido e eficiente reconhecimento das seqüências que flanqueiam o T-DNA no genoma transformado (van ATTIKUM et al. 2001; MULLINS et al., 2001; RHO et al., 2001; COMBIER et al., 2003; ROLLAND et al., 2003; FÁVARO, 2009). Essa técnica baseia-se em reações de PCR consecutivas usando *primers* de sequências específicas e *primers* de sequências degeneradas. A especificidade do produto resultante após três *rounds* de amplificação é alta, o que permite seu sequenciamento e identificação.

Muitos trabalhos utilizam essa ferramenta para o estudo e descoberta de genes envolvidos no processo de patogenicidade em plantas ou animais e também para alguns fungos endofíticos como *P. fortinii* (GORFER et al., 2007), *A. implicatum* (ABELLO; KELEMU; GARCÍA, 2008), e *Epicoccum nigrum* (FÁVARO, 2009), visando estudos para o melhor entendimento dessa interação benéfica.

Dessa forma, por essa metodologia apresentar muita eficiência e adaptabilidade, além de não requerer equipamentos caros, sua utilização como ferramenta de estudos para a transformação genética de fungos patogênicos torna-se altamente atrativa. Mesmo que uma espécie fúngica ainda não possua uma metodologia como essa descrita, a consistência e articularidade da técnica permitem que o protocolo seja

especificado para essa espécie em particular, abrindo caminho para novos estudos e permitindo sua otimização. Assim, auxilia nos estudos de interação entre fungos e a planta hospedeira por meio da transferência de genes repórteres, o que permite um monitoramento do desenvolvimento dessa interação durante os estágios de colonização do tecido hospedeiro, revelando detalhes dessa relação entre esses organismos. Pode, ainda, contribuir nos estudos de mutagênese insercional e caracterização de transformantes, auxiliando na descoberta de novos genes envolvidos na patogenicidade e com isso fornecer informações necessárias para um controle mais eficiente de doenças, melhor compreendendo um patossistema.

Tabela 1 - Espécies de fungos e de oomicetos transformadas por *A. tumefaciens*[(a)], incluindo algumas características de cada espécie e marcador de seleção utilizado

(continua)

Espécie [(a)]	Características da espécie	Marcador de seleção; sistema repórter [(b)]	Referência
Basidomicetos			
Agaricus bisporus	Cogumelo comestível	*hph, gfp*	Groot et al. (1998); Chen et al. (2000); Mikosch et al. (2001); Burns et al. (2006); Eastwood et al. (2008)
Antrodia cinnamomea	Cogumelo medicinal	x	Chen et al. (2009)
Cryptococcus gattii	Patógeno humano	*NAT*	McClelland et al. (2005)
C. neoformans	Patógeno humano	*NAT*	Walton et al. (2005); McClelland et al. (2005); Yeh et al. (2009)
Hebeloma cylindrosporum	Ectomicorriza	*hph, Hc Sdh, gfp*	Combier et al. (2003); Müller et al. (2006); Ngari et al. (2009)
Hypholoma sublateritium	Produtor de antitumoral	*hph, gfp*	Godio e Martín (2009)
Laccaria bicolor	Ectomicorriza	*hph*	Kemppainen et al. (2005); Kemppainen et al. (2009)
Laccaria laccata	Ectomicorriza	*hph*	Coelho et al. (2008)
Moniliophthora perniciosa	Fitopatógeno	*hph*	Grassi, Rincones e Pereira (2007)
Omphalotus olearius	X	*hph*	Michielse et al. (2005)
Paxillus involutus	Ectomicorriza	*Sh BLE*	Pardo et al. (2002)
Phaffia rhodozyma	X	*hph*	Michielse et al. (2005)
Phanerochaete chrysosporium	Ligninolítico; degrada poluentes	*hph, gfp*	Li e Zhang (2005); Sharma et al. (2006)
Pisolithus microcarpus	Ectomicorriza	*Sh BLE*	Pardo et al. (2005)
P. tinctorius	Ectomicorriza	*hph, gfp*	Rodríguez-Tovar et al. (2005)
Pseudozyma antarctica	Potencial farmacêutico	*hph, gfp*	Marchand et al. (2007)
Suillus bovinus	Ectomicorriza	*hph, Sh BLE, gfp*	Hanif et al. (2002); Pardo et al. (2002)
S. grevillei	Ectomicorriza	*hph, DsRed*	Murata et al. (2006)
Tricholoma matsutake	Ectomicorriza	*hph*	Murata et al. (2006)
Volvariella volvacea	Cogumelo comestível	afp	Wang et al. (2008)
Ascomicetos			
Acremonium implicatum	Endofítico	*hph, gfp*	Abello, Kelemu e García (2008)
Ascochyta rabiei	Fitopatógeno	*hph*	Mogensen et al. (2006); White e Chen (2006; 2007)
Aspergillus awamori	Importância industrial	*hph, BLE, Aa pyrG,*	Groot et al. (1998); Gouka et al. (1999)
A. carbonarius	Micotoxigênico	*hph*	Lunardi et al. (2006); Morioka et al. (2006)
A. fumigatus	Patógeno humano	*hph*	Sugui et al. (2005)
A. giganteus	Antimicrobianos	*hph*	Meyer et al. (2003)
A. niger	Importância industrial	*hph*	Groot et al. (1998)
A. westerdijkiae	Micotoxigênico	*hph*	Mata et al. (2007)
Beauveria bassiana	Entomopatógeno	*hph, bar*	Reis et al. (2004); Leclerque et al. (2004); Xu et al. (2009)

Tabela 1 - Espécies de fungos e de oomicetos transformadas por *A. tumefaciens*[(a)], incluindo algumas características de cada espécie e marcador de seleção utilizado

continuação

Espécie [(a)]	Características da espécie	Marcador de seleção; sistema repórter[(b)]	Referência
Botrytis cinerea	Fitopatógeno	*hph, gfp*	Rolland et al. (2003); Shen et al. (2008)
Cadophora finlandia	Endofítico	*hph, gfp*	Gorfer et al. (2007)
Calonectria morganii	Fitopatógeno	*hph*	Malonek e Meinhardt (2001)
Candida ssp.	Patógeno humano	x	Oliveira et al. (2007)
Candida albicans	Patógeno humano	*hph*	Michielse et al. (2005)
Candida glabrata	Patógeno humano	*hph*	Michielse et al. (2005)
Candida glycerinogenes	Importância industrial	*BLE*	Zhiming et al. (2008)
Candida tropicalis	Patógeno humano	*hph*	Michielse et al. (2005)
Cephalosporium acremonium	Importância industrial	*Sh BLE*	Wei, Zhu e Zhu (2005)
Ceratocystis resinifera	Fitopatógeno	*hph*	Loppnau, Tanguay, Breuil (2004)
Chaetomium globosum	X	*hph*	Xing-Xi e Qiang (2005)
Claviceps purpurea	Fitopatógeno	*BLE*	Michielse et al. (2005)
Clonostachys rosea	Agente de controle biológico	*hph*	Mamarabadi, Jensen e Lübeck (2008)
Coccidioides immitis	Patógeno humano	*hph*	Abuodeh et al. (2000)
C. posadasii	Patógeno humano	*hph, gfp*	Kellner et al. (2005); Li et al. (2007)
Colletotrichum acutatum	Fitopatógeno	*hph, gfp*	Talhinhas et al. (2008); Maruthachalam et al. (2008)
C. destructivum	Fitopatógeno	*hph, gfp*	O'Connell et al. (2004)
C. falcatum	Fitopatógeno	*hph, gfp*	Maruthachalam et al. (2008)
C. gloeosporioides	Fitopatógeno	*hph*	Groot et al. (1998)
C. graminicola	Fitopatógeno	*hph, gfp*	Flowers e Vaillancourt (2005)
C. higginsianum	Fitopatógeno	*hph*	Huser et al. (2009)
C. lagenarium	Fitopatógeno	*hph*	Tsuji et al. (2003)
C. trifolii	Fitopatógeno	*hph*	Takahara et al. (2004)
Coniothyrium minitans	Agente de controle biológico	*hph*	Rogers et al. (2004); Li et al. (2005); Gong et al. (2007)
Cryphonectria parasitica	Fitopatógeno	*hph*	Park e Kim (2004)
Epicoccum nigrum	Endofítico; controle biológico	*hph, gfp*	Fávaro e Araújo (2007)
Fusarium circinatum	Fitopatógeno	*hph*	Covert et al. (2001)
F. culmorum	Fitopatógeno	*hph*	Michielse et al. (2005a)
F. equiseti	Endofítico	*gfp*	Maciá-Vicente et al. (2009)
F. graminearum	X		Frandsen et al. (2006); Lysøe et al. (2006)
F. oxysporum	Fitopatógeno; controle biológico	*hph, BLE, gfp*	Khang et al. (2005); van der Does et al. (2008); Mullins et al. (2001); Pantelides et al. (2009)

Tabela 1 - Espécies de fungos e de oomicetos transformadas por *A. tumefaciens*[(a)], incluindo algumas características de cada espécie e marcador de seleção utilizado

continuação

Espécie [(a)]	Características da espécie	Marcador de seleção; sistema repórter[(b)]	Referência
F. solani	X	*bar*	Liu e Bao (2009)
F. venenatum	Importância industrial	*hph*	Groot et al. (1998)
Glarea lozoyensis	Importância industrial	*hph*	Zhang et al. (2003)
Gliocladium roseum	Agente de controle biológico	*hph*	Utermark e Karlovsky (2007)
Helminthosporium turcicum	Fitopatógeno	*hph, gfp*	Degefu e Hanif (2003)
Heterobasidion annosum	Fitopatógeno	*hph, gfp*	Samils et al. (2006)
Histoplasma capsulatum	Patógeno humano	*hph, Hc ura5*	Sullivan et al. (2002); Marion et al. (2006); Hilty et al. (2008)
Kluyveromyces lactis	Importância industrial	*Sc ura3*	Bundock et al. (1999); Kooistra et al. (2004)
Leptosphaeria maculans	Fitopatógeno	*hph, DsRed, gfp*	Gardiner e Howlett (2004); Gardiner et al. (2005); Eckert et al. (2005); Elliott e Howlett (2006); Blaise et al. (2007); Remy et al. (2008); Fox et al. (2008)
L. biglobosa	Fitopatógeno	*hph, DsRed, gfp*	Eckert et al. (2005)
Magnaporthe grisea	Fitopatógeno	*hph, nptII*	Rho et al. (2001); Khang et al. (2005); Tucker et al. (2007); Li et al. (2007); Hof et al. (2007); Gupta et al. (2007; 2008)
M. oryzae	Fitopatógeno	*hph*	Meng et al. (2007); Jeon et al. (2007); Betts et al. (2007); Chi et al. (2009)
Metarhizium anisopliae	Entomopatógeno	*bar, benA3, gfp*	Fang et al. (2006); Staats et al. (2007); Moon et al. (2008); Fang et al. (2009)
M. anisopliae var. acridum	Entomopatógeno	*bml*	Duarte et al. (2007)
Monascus purpureus	Importância industrial	*hph, gfp*	Campoy et al. (2003)
M. ruber	Importância industrial	*hph, gfp*	Yang e Lee (2008)
Monilinia fructicola	Fitopatógeno	*hph , nptII*	Dai et al. (2003); Lee e Bostock (2006)
Mycosphaerella graminicola	Fitopatógeno	*hph*	Zwiers e De Waard (2001)
M. fijiensis	Fitopatógeno	*hph*	Michielse et al. (2005)
Neurospora crassa	Organismo modelo	*hph*	Groot et al. (1998)
Oidiodendron maius	Endomicorriza ericóide	*hph, gfp*	Martino et al. (2007)
Ophiostoma floccosum	X	x	Tanguay et al. (2006)
O. piceae	Fitopatógeno	*hph*	Tanguay, Tangen, Breuil (2007)
O. piliferum	Fitopatógeno	*hph*	Hoffman e Breuil (2004)
O. acuformis	Fitopatógeno	*hph,DsRed,gfp*	Eckert et al. (2005)

Tabela 1 - Espécies de fungos e de oomicetos transformadas por *A. tumefaciens*[(a)], incluindo algumas características de cada espécie e marcador de seleção utilizado

continuação

Espécie [(a)]	Características da espécie	Marcador de seleção; sistema repórter[(b)]	Referência
Oculimacula yallundae	Fitopatógeno	*hph, DsRed, gfp*	Eckert et al. (2005)
Paecilomyces fumosoroseus	Entomopatógeno	*hph*	Lima et al. (2006)
Paracoccidioides brasiliensis	Patógeno humano	*hph, gfp*	Leal et al. (2004); Almeida et al. (2007)
Penicillium chrysogenum	Importância industrial	*BLE*	Sun, Kong e Xu (2002)
P. digitatum	Fitopatógeno	*hph*	Wang e Li (2008)
P. marneffei	Patógeno humano	*x*	Zhang et al. (2008)
Phialocephala fortinii	Endofítico	*hph, gfp*	Gorfer et al. (2007)
Pochonia chlamydosporia	Endofítico	*gfp*	Maciá-Vicente et al. (2009)
Rosellinia necatrix	Fitopatógeno	*hph*	Aimi et al. (2005)
Saccharomyces cerevisiae	Organismo modelo	*trp1, Sc ura3, aphI*	Bundock et al. (1995); Piers et al. (1996); Rao et al. (2008)
Sclerotinia sclerotiorum	Fitopatógeno	*hph*	Weld, Eady e Ridgway (2006)
Trichoderma asperellum	Agente de controle biológico	*hph, Sh BLE*	Cardoza et al. (2006)
T. atroviride	Agente de controle biológico	*hph, Sh BLE*	Zeilinger (2004); Cardoza et al. (2006)
T. hamatum	Agente de controle biológico	*hph*	Carpenter et al. (2008)
T. harzianum	Agente de controle biológico	*hph, Sh BLE*	Gao et al. (2004); Gao et al. (2005); Cardoza et al. (2006);Yang et al. (2007); Huang et al. (2008)
T. longibrachiatum	Agente de controle biológico	*hph, Sh BLE*	Cardoza et al. (2006)
T. reesei	Importância industrial	*hph*	Groot et al. (1998); Zhong et al. (2007); Zhong et al. (2009)
Trichophyton mentagrophytes	Patógeno humano	*hph*	Yamada et al. (2008)
Tuber borchii	Ectomicorriza	*hph, gfp*	Grimaldi et al. (2005)
Venturia inaequalis	Fitopatógeno	*hph, NAT*	Fitzgerald et al. (2003); Fitzgerald et al. (2004)
Verticillium dahliae	Fitopatógeno	*hph, DsRed*	Rauyaree et al. (2005); Klimes et al. (2006); Pantelides et al. (2009)
V. fungicola	Fitopatógeno	*hph, gfp*	Amey et al. (2002); Amey et al. (2003)
Zigomicetos			
Backusella lamprospora	Importância industrial	*hph, gfp*	Nyilasi et al. (2008)
Blakeslea trispora	Importância industrial	*hph*	Michielse et al. (2005)
Mucor circinelloides	Importância industrial	*hph*	Nyilasi (2004); Nyilasi et al. (2005)
Mucor miehei	Importância industrial	*aphI*	Monfort et al. (2003)
Rhizopus oryzae	Importância industrial	*Rn pyr4*	Michielse et al. (2004)

Tabela 1 - Espécies de fungos e de oomicetos transformadas por *A. tumefaciens*[(a)], incluindo algumas características de cada espécie e marcador de seleção utilizado

(conclusão)

Espécie [(a)]	**Características da espécie**	**Marcador de seleção; sistema repórter**[(b)]	**Referência**
Glomeromicetos			
Glomus intraradices	Micorriza arbuscular	*DsRed*	Helber e Requena (2007)
Oomicetos			
Phytophthora infestans	Fitopatógeno	*nptII*	Vijn e Govers (2003)
P. palmivora	Fitopatógeno	*nptII, hph*	Vijn e Govers (2003)
Pythium ultimum var. *sporangiiferum*	Fitopatógeno	*nptII*	Vijn e Govers (2003)

(a) Essa lista de espécies é baseada nas revisões anteriores de Michielse et al. (2005) e Lacroix et al. (2006), no trabalho de Soltani, van Heusden e Hooykaas (2008), bem como no trabalho de Fávaro (2009). **(b)** *hph*: gene de resistência a higromicina de *Escherichia coli*. *NAT*: gene de resistência a nourseothricin de *Streptomyces noursei*. *bar*: gene da fosfinotricina acetiltransferase de *Streptomyces hygroscopicus*, confere resistência ao glufosinato de amônio; *Sh BLE*: gene de resistência a pleomicina de *Streptoalloteicus hindustanus*. *BLE*: gene de resistência pleomicina, confere resistência a zeocina; *benA3*: gene de resistência ao benomyl. *Aa pyrG*: gene da orotidina-5'-fosfato decarboxilase de *Aspergillus awamori*, permite a seleção de prototróficos para uracila. *nptII*: gene da neomicina fosfotransferase, confere resistência a geneticina. *afp*: gene de proteína anticongelante, permite a seleção de transformantes resistentes a baixa temperatura. *Hc Sdh (R)*: gene de resistência a carboxina de *Hebeloma cylindrosporum*. *Hc ura5*: gene da orotato fosforibosiltransferase de *Histoplasma capsulatum*, permite a seleção de prototróficos para uracila. *Sc ura3*: gene *ura3* de *Saccharomyces cerevisiae*, permite a seleção de prototróficos para uracila. *aphI*: transposon Tn903 de *E. coli*, confere resistência ao análogo da canamicina (geneticina). *Rn pyr4*: gene da orotidina-5'-fosfato decarboxilase de *R. niveus*, permite a seleção de prototróficos para uridina. *trp1*: gene da N-C5' fosforibosil-antranilato isomerase de *S. cerevisiae*, permite a seleção de prototróficos para o triptofano. *DsRed*: gene da proteína vermelha fluorescente do coral *Discosoma striata*. *gfp*: gene da proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria*

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Isolados fúngicos

Os isolados de *Guignardia citricarpa* e *G. mangiferae* utilizados foram obtidos em isolamentos anteriores e são pertencentes à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo” – USP/ESALQ. Os mesmos foram checados quanto às características patogênica e endofítica com a utilização de *primers* específicos (GcP1 5’-AAGTGTGAGTGTCGAAGGTGG-3’ e GcP2 5’-GACGACTCGCTTTTCTACGGC-3’). Os isolados foram cultivados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) (200 g de batata cozida, 20g de dextrose e 18g de ágar para 1L de água destilada, autoclavados a 120°C, 1 atm de pressão, durante 20 min) a 28ºC por até 15 dias.

2.2.2 Construção de *primers*

Foram realizadas pesquisas bibliográficas de genes de fungos relacionados à patogenicidade que já possuem suas seqüências depositadas no banco de dados do NCBI - GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e que apresentam na literatura a comprovação da sua participação no processo de patogenicidade de diversas doenças fúngicas vegetais, procurando homologia com outros fitopatógenos, visando, assim, detectar tais genes também em *Guignardia citricarpa* (Blast). Em seguida os genes com maior homologia entre os organismos selecionados foram alinhados pelo programa MEGA 4.0 e, nas regiões com maior similaridade, foram construídos e avaliados *primers*pela ferramenta *SciTools OligoAnalyzer 3.1* (www.idtdna.com). Após a obtenção dos *primers*, esses genes foram amplificados em *Guignardia,* por meio da técnica de PCR e identificados por sequenciamento dos nucleotídeos no Centro de Estudos do Genoma Humano – USP, São Paulo, São Paulo, Brasil. Os fatores considerados na construção dos *primers* foram: sequências de 15 a 25 pb; conteúdo de bases CG mais ou menos igual nos pares; 55 a 65% de GC; preferência por GC na extremidade 3’ e a mesma nunca seja degenerada; ter no máximo 4 bases degeneradas; as temperaturas de *melting* devem ser próximas nos pares e não podem se anelar na região 3’.

2.2.3 Secreção de enzimas hidrolíticas em meio sólido

Testes semi-quantitativos para a detecção de enzimas secretadas por fungos em meio sólido foram realizadas. (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). Foram avaliadas a produção de endoglucanase, protease, esterase, xilanase, lipase, e pectinases pelos isolados de *Guignardia* spp. Para isso, discos de 5 mm de diâmetro de culturas crescidas em BDA a 28°C durante 15 dias, foram transferidos para placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura acrescido de diferentes fontes de carbono. A produção de protease, esterase, lipase, e pectinases (pectina liase e endopoligalacturonase) foi avaliada conforme estabelecido por Hankin e Anagnostakis (1975), onde foram utilizados gelatina, tween 80, tween 20 e pectina cítrica, respectivamente, como fonte de carbono.

A secreção da enzima endoglicanase foi avaliada em Meio Mínimo (PONTECORVO et al., 1953) sem a adição de glicose e suplementado com 1% de carboximetilcelulose (Sigma) como fonte de carbono. A atividade de endoglicanase foi verificada após a adição de 5 mL de uma solução de vermelho congo 0,1% sobre cada colônia e incubação das placas à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, a solução de corante foi descartada e as placas foram descoradas com uma solução de NaCl 4M por alguns minutos. A degradação da carboximetilcelulose ao redor da colônia foi caracterizada pela formação de uma área clara e opaca contra uma coloração vermelha para a carboximetilcelulose não degradada (POINTING, 1999).

Para xilanase, foi utilizado utilizou-se o método semi-quantitativo estabelecido por Hanckin e Anagnostakis, (1975) com modificações. O meio utilizado foi o Meio Mineral (FERREIRA, 1999). Para a visualização do halo de degradação, foi utilizado como corante uma solução de Iodo (1g I_2; 5g KI; 330 mL água destilada), Após o período de incubação, cobriu-se a superfície das placas com cerca de 10 mL de solução de iodo, reveladora do halo de degradação, aguardou-se cerca de 20 minutos para que ocorresse a reação substrato/solução. Os diâmetros das colônias e dos halos foram medidos.

A produção de exoenzimas foi testada em triplicata e avaliada após 7 dias de crescimento. Inicialmente foram medidos os diâmetros perpendiculares tanto da colônia

quanto do halo de degradação e posteriormente o índice enzimático (IE) foi calculado por meio da razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia. Os dados foram analisados utilizando o programa SAS (Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), onde foi aplicado teste de Tukey para as médias de índice enzimático, ao nível de 5% de significância.

2.2.4 Quantificação de quitinase e endopoligalacturonase

As enzimas quitinase e endopoligalacturonase foram avaliadas pela metodologia quantitativa de Somogyi-Nelson (ZAGO et al., 1989). Os isolados foram cultivados em em Meio de cultura Mínimo líquido (PONTECORVO et al., 1953) acrescidos de 10g L^{-1} de quitina insolúvel e 10g L^{-1} de pectina cítrica, respectivamente, durante 5 dias a 28ºC. Após este período foi realizada centrifugação por 5 minutos a 7500 X G. O sobrenadante foi utilizado na quantificação da atividade enzimática da quitinase e da endopoligalacturonase por meio de leitura da absorbância medida em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 520nm. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade (μmoles) de grupos formados de quitina e ácido poligalacturônico, que foram liberados por mL de extrato protéico por minuto. Os dados foram analisados utilizando o programa SAS, onde foi aplicado teste de Tukey para as médias de índice enzimático, ao nível de 5% de significância.

2.2.5 Extração de DNA

Os isolados foram cultivados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) líquido por aproximadamente 10 dias a 28 °C, sendo este micélio filtrado em funil com papel de filtro esterilizado com auxílio de bomba a vácuo. O micélio foi triturado com adição de nitrogênio líquido utilizando cadinho e pistilo de porcelana previamente esterilizados.

Após, a cada grama de micélio foi acrescentado 1 mL de tampão de extração (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1% SDS). A mistura foi incubada por 15 min a 70 °C. A desproteinização foi realizada com fenol e clorofórmio (1:1), cada tratamento foi seguido por centrifugação a 5.000 X G por 15 minutos e coleta da fase aquosa. Os ácidos nucléicos foram precipitados com Etanol absoluto por 15 min. Após

este período, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante desprezado, e o precipitado lavado com Etanol 70%, e finalmente, os tubos invertidos para a secagem do DNA. Este foi ressuspendido com água miliQ autoclavada. O DNA obtido foi quantificado em gel de agarose 1% (RAEDER; BRODA, 1985, com modificações).

2.2.6 Teste de sensibilidade à higromicina B

A seleção dos transformantes se deu por meio da confirmação da inserção do vetor carregando o gene *hgr* que confere resistência ao antibiótico higromicina. Dessa forma, testes para observação da sensibilidade dos isolados de *Guignardia citricarpa* foram realizados antes dos experimentos de agrotransformação, a fim de estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM) para a posterior seleção. Para verificar a inibição de crescimento dos isolados de *G. citricarpa* por higromicna B, o fungo foi inoculado em placas de Petri contendo meio BDA acrescido de diferentes concentrações (25; 50; 75; 100; 150 e 200 $\mu g.ml^{-1}$) de higromicina B (Invitrogen, Brasil). Para cada concentração foram avaliadas 3 placas, incluindo placas controle (sem antibiótico). O crescimento dos isolados foi monitorado por 10 dias, incubadas a 28°C. A concentração de higromicina B que inibiu totalmente o crescimento micelial foi escolhida para os experimentos de transformação.

2.2.7 Teste de crescimento sobre diferentes tipos de membranas e meio de indução (IM)

Outro pré-teste realizado foi o da habilidade de crescimento do fungo *G. citricarpa* em diferentes membranas a serem utilizadas no experimento de adaptação do protocolo de agrotransformação, bem como no meio de indução (IM).

Diferentes tipos de membranas (papel filtro 8 µm, J. Prolab, Brasil; éster de celulose 0,45 µm, Millipore e *nylon* 0,45 µm, Amersham Hybond N^+ ou GE Healthcare) foram recortadas em quadrados de aproximadamente 1,0X1,0 cm e colocadas sobre o meio de co-cultivo IM acrescido de 200 µM ou 400 µM AS, em placas de Petri. Os fungos foram inoculados sobre essas membranas com o uso de um palito de madeira esterilizado. Foram acompanhados a capacidade de desenvolvimento do fungo em

cada membrana e o número de dias no qual o crescimento micelial atingisse cerca de 0,5 cm de diâmetro. Essa determinação foi importante para estabelecer quanto tempo antes se deve inocular o fungo e deixá-lo crescer para posteriormente realizar o co-cultivo com as células bacterianas, aumentando as chances de infecção das hifas em desenvolvimento.

2.2.8 Linhagens, vetor de transformação e condições de cultivo

Linhagens desarmadas de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 foram previamente cedidas pelo Prof. Dr. Carlos Labate (Laboratório "Max Feffer" de Genética de Plantas, Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil) à Dra. Léia Cecília de Lima Fávaro (Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luizde Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil), que as cedeu gentilmente para a realização desse trabalho. A agrobactéria foi armazenada em glicerol 20% em freezer a -80°C e estocada em meio Luria-Bertani (LB) contendo os antibióticos para a manutenção do plasmídio Ti desarmado: rifampicina (100 µg.mL^{-1}) e espectinomicina (200 µg.mL^{-1}).

O vetor binário de transformação de fungos pFAT-gfp (Figura 1) presente na linhagem EHA105 de *A. Tumefaciens* foi gentilmente cedido à Dra. Léia C. de Lima Fávaro pelo Dr. Kim M. Plummer (CSIRO Plant Industry, Austrália). Esse vetor contém na sua região T-DNA o gene de resistência ao antibiótico higromicina B de *E. coli* (*hph*), controlado pelo promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) de *Glomerella cingulata*; e também o gene da proteína verde fluorescente (*gfp*) (pGreen Lantern, Life Technologies) controlado pelo promotor do gene *gpd* de *Aspergillus nidulans* (FITZGERALD et al., 2003). O vetor foi inserido em células de *A. tumefaciens* por eletroporação.

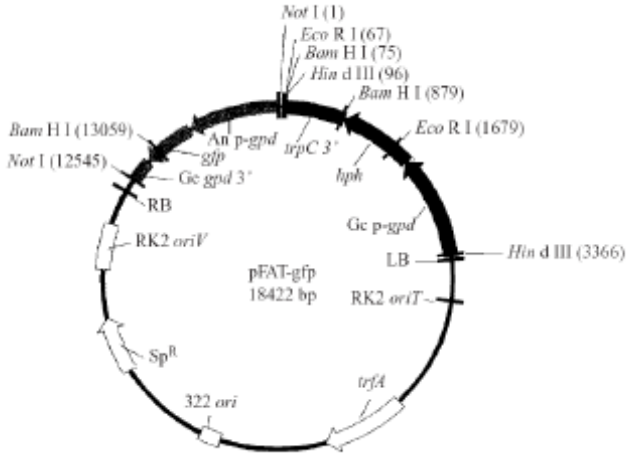

Figura 1 – Mapa do vetor de transformação de fungos mediada por *A. tumefaciens* pFAT-gfp, desenvolvido por Fitzgerald et al. (2003) e gentilmente cedido por Kim M. Plummer (CSIRO Plant Industry, Austrália) para realização deste trabalho. (RB) Borda direita do T-DNA. (LB) Borda esquerda do T-DNA. (*hph*) Gene de resistência a higromicina B de *E. coli*. (*trpC 3'*) Signal de terminação transcricional do gene *trpC* de *A. nidulans*. (An p-*gpd*) Promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato de *A. nidulans*. (Gc p-*gpd*) Promotor do gene *gpd* de *G. cingulata*. (Gc *gpd* 3') Signal de terminação transcricional do gene *gpd* de *G. cingulata*. (Sp^R) Gene de resistência a espectinomicina. (RK2 *oriV*) Origem de replicação vegetativa RK2. (RK2 *oriT*) Origem de transferência RK2. (322 *ori*) Origem de replicação de pBR322. (*trfA*) Gene de replicação *trfA* de RK2. (*gfp*) Gene da proteína verde fluorescente pGreen Lantern (Life Technologies). Fonte: Fitzgerald et al. (2003)

2.2.9 Transformação genética de *G. citricarpa* mediada por *A. tumefaciens*

Primeiramente se fez necessária a adaptação e otimização do método para determinar as melhores condições de transformação para o fungo *G. citricarpa*. Foi adotado o protocolo descrito por de Groot et al. (1998) para fungos filamentosos e realizados testes para avaliar as melhores condições de agrotrasnformação onde foram analisados vários parâmetros como o tipo de mebrana, com diferentes tipos de porosidade, sendo papel filtro (8 µm, J. Prolab, Brasil), éster de celulose (0,45 µm, Millipore) e *nylon* (0,45 µm, Amersham Hybond N^+ ou GE Healthcare) sobre meio de co-cultivo acrescidos de 200 µM ou 400 µM do agente indoutor acetoseringone (AS) (Fluka). Foi avaliado também o melhor tempo de co-cultivo do fungo com a bactéria (48 ou 96 horas). Os testes foram realizados a partir da combinação de todas as possíveis variáveis.

A transformação genética do isolado 12P de *G. citricarpa* via *A. tumefaciens* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por de Groot *et al.* (1998) seguindo as

modificações determinadas acima. *A. tumefaciens* linhagem EHA105, carregando o plasmídio pFAT-gfp (FITZGERALD et al., 2003), foi recuperada do estoque em glicerol 20%, cultivada durante 72h a 28°C em meio YEP (WALKERPEACH; VELTEN, 1994) sólido suplementado com espectinomicina (200 µg.mL^{-1}) e rifampicina (100 µg.mL^{-1}). Uma colônia isolada foi transferida para frasco de vidro contendo 30 mL meio YEP líquido suplementado com espectinomicina (200 µg.mL^{-1}) e rifampicina (100 µg.mL^{-1}), incubada a 28ºC por 24h sob agitação (180 rpm). Uma suspensão de células da agrobactéria foi diluída para um densidade óptica (DO) a 660nm de 0,15 em meio de indução (IM) líquido (10 mM K_2HPO_4; 10 mM KH_2PO_4; 2,5 mM NaCl; 2 mM $MgSO_4$; 0,7 mM $CaCl_2$; 9 µM $FeSO_4$; 4 mM NH_4SO_4; 10 mM glicose; 0,5% glicerol; 40 mM ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico esterilizado por filtração, pH 5,3, e adicionado ao meio de cultura após autoclavagem) na presença ou na ausência de acetoseringona (AS) (200µM) em um volume final de 20 mL. As células foram incubadas a 28°C em 180 rpm, por um tempo adicional até que a cultura alcançasse DO_{660nm} entre 0,6 e 0,8. Nas condições utilizadas este tempo de indução de competência foi de aproximadamente 9 horas.

Após 15 dias de crescimento do isolado 12P de *Guignardia citricarpa* em meio BDA, o fungo foi repicado sobre pedaços (quadrados de 1,0 cmX1,0 cm) das membranas a serem testadas posicionados espalhados em placas de Petri contendo o meio de indução (IM) sólido (10 mM K_2HPO_4; 10 mM KH_2PO_4; 2,5 mM NaCl; 2 mM $MgSO_4$; 0,7 mM $CaCl_2$; 9 µM $FeSO_4$; 4 mM NH_4SO_4; 5 mM glicose; 0,5% glicerol; 40 mM ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico esterilizado por filtração, 1,5% p/v ágar, pH 5,3, e adicionado ao meio de cultura após autoclavagem) para o co-cultivo, acrescido de AS (200 e 400 µM) ou não (placas controle). O micélio foi crescido por 3 dias, conforme pré-teste, até que atingissem um crescimento de 0,5 cm de diâmetro, e logo após, receberam a cultura bacteriana para o co-cultivo.

As placas foram incubadas a 25°C, na ausência de luz, durante 48 horas. Após este período, que é denominado tempo de co-cultivo, as membranas foram transferidas para placas contendo meio de cultivo BDA suplementado com 75 µg.mL^{-1} de higromicina B (Invitrogen Life Technologies), conforme estabelecido anteriormente como CIM, 300 µg.mL^{-1} de cefoxitina sódica (Eurofarma) e 125 µg.mL^{-1} de tetraciclina;

e incubadas a 28ºC por 60 dias. A cefoxitina sódica é usada para eliminar a bactéria, e a higromicina B para selecionar os transformantes e a tetracilcina é para evitar contaminações. As placas foram avaliadas por até 60 dias após a transferência das membranas. Os micélios resistentes à higromicina B, visualizados após esse período, foram contados e repicados para placas de petri contendo meio de cultivo seletivo (BDA suplementado com 75 $\mu g.mL^{-1}$ de higromicina B) para posterior purificação e armazenamento. Foram realizados dois experimentos de transformação, mantendo as mesmas condições, visando avaliar a consistência do protocolo adotado no que diz respeito à repetibilidade e capacidade de obtenção de transformantes.

2.2.10 Purificação e estocagem dos fungos

A purificação dos transformantes estocados foi realizada por meio repicagem em série e semeadura em meio de cultura BDA. Para isso, com o auxílio de palitos de madeira esterilizados, foram coletados micélios dos transformantes e semeados em placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram incubadas em estufa a 28ºC para o crescimento e obtenção de transformantes purificados. Estes foram armazenados de acordo com o método Castelani, no qual os fungos foram crescidos em meio BDA, e então foram coletados discos de meio de cultura com micélios e colocados em frascos de 10 mL contendo água destilada esterilizada. Os frascos foram identificados e armazenados à temperatura ambiente. Outro estoque também foi feito do mesmo modo, mas com a utilização de óleo mineral puro esterilizado ao invés de água destilada esterilizada previamente.

2.2.11 Estabilidade mitótica dos transformantes

Para estimar a estabilidade mitótica do DNA exógeno no genoma do hospedeiro, todos os transformantes foram analisados. Pedaços de micélio dos transformantes foram crescidas durante 15 dias a 28ºC em meio BDA suplementado com 75$\mu g.mL^{-1}$ de higromicina B. Em seguida, fragmentos de micélio das extremidades das colônias foram repicadas para placas contendo meio BDA sem adição de higromicina B durante 5 repicagens sucessivas. Após esse procedimento, fragmentos de micélio provenientes

da quinta repicagem em meio não seletivo foram transferidos para placas contendo meio BDA suplementado com higromicina B (75 µg.mL^{-1}) e incubados a 28ºC durante 15 dias. Avaliou-se, então, o número de transformantes que mantiveram o fenótipo higromicina resistente, por meio de regra de três simples; e também a expressão de fluorescência da proteína verde fluorescente (GFP) sob microscópio óptico de epifluorescência (Zeiss Axiophot-2) sob filtro FITC (459-490 nm).

2.2.12 Análise dos transformantes por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

O DNA genômico de 10 transformantes escolhidos ao acaso e do isolado 12P selvagem *G. citricarpa* foi extraído de acordo com Raeder e Broda (1985) e analisado para a presença do gene *hgr* por meio da técnica da PCR, utilizando os *primers* hph1 (5'–TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT–3') e hph2 (5'–CGCGTCTGCTGCTCCATACAAG–3') (MALONEK; MEINHARDT, 2001), que amplificam fragmento da seqüência do gene do antibiótico higromicina do vetor de transformação pFAT-GFP. As amplificações foram realizadas em termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94^{0}C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94^{0}C por 30 s, 55^{0}C por 30 s e 72^{0}C por 30 s, após os ciclos, uma extensão final a 72^{0}C por 7 min. Cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo Tampão 1x (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 3,7 mM de $MgCl_2$, 1 mM de dNTP, 0,05 U.µL^{-1} de Taq DNA polimerase (Fermentas Life Sciences, Brasil), 0,1 µM de cada *primer* e 1 ng de DNA.

O fragmento amplificado (500 pb) foi observado por eletroforese em gel de agarose 1,2% a 3 volts.cm^{-1}, juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Fermentas). Após a eletroforese o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1 mg.mL^{-1}) e fotodocumentado sobre luz UV.

2.2.13 Análise dos transformantes por *Southern Blot*

Para a análise por *Southern Blot* o DNA genômico de 4 transformantes (42; 43; 36.3 e g) mais o do isolado selvagem 12P foi submetido à hidrólise com a enzima de

restrição *Eco*RI (Invitrogen, Life Technologies) a 10 U.μL^{-1}. A região do T-DNA do vetor pFAT-gfp apresenta dois sítios de reconhecimento para essa endonuclease, ambos localizados no cassete de expressão do gene de resistência a higromicina B (FITZGERALD et al., 2003). Dessa forma, a ausência de sítios de reconhecimento da enzima *Eco*RI no cassete de expressão do gene da proteína verde fluorescente (*gfp*) implica que a utilização desse gene como sonda na análise de *Southern blotting* deve dar origem a uma única banda de 15 kb a partir da digestão do DNA do vetor pFAT-gfp e uma ou mais bandas de tamanhos variados, dependendo do local da inserção e do número de cópias inseridas, a partir da digestão do DNA dos transformantes.

A reação de restrição foi feita em um volume total de 250 μL, contendo 10 μg de DNA, 25 μL de tampão React$^{@}$ 3 10 X e 40 U da enzima *Eco*RI. A reação foi incubada a 37°C durante 12 horas. Para concentrar a amostra hidrolisada foi feita uma precipitação adicionando-se 25 μL de acetato de amônio (7,8 M) e 625 μL de álcool absoluto. Após incubação a -20°C por 12 horas, o material foi centrifugado (14.000 rpm por 40 minutos a 4ºC). O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 700 μL de álcool 70%. As amostras foram centrifugadas por mais 10 minutos (14.000 rpm, 4ºC). O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco a 37ºC. Após a secagem, o DNA hidrolisado foi ressuspenso em 32 μL de TE e 8 μL de sacarose 40%. Os 40 μL de DNA hidrolisado foram colocados em gel de agarose 1% contendo 1% de brometo de etídio (p/v) (1 mg.mL^{-1}). Foi utilizado como marcador de peso molecular 40 μL do DNA Ladder 1kb (0,2 µg.µL^{-1}) (Fermentas). A eletroforese foi realizada a 3 volts.cm^{-1}de distância entre os eletrodos de modo a obter uma corrida lenta.

Após a eletroforese o DNA foi fotodocumentado e transferido para uma membrana de *nylon* conforme procedimento a seguir: foi feito um pequeno corte na porção inferior do lado esquerdo do gel de agarose. O gel foi submetido à depurinização em solução depurinizante HCl 0,25 M (10 mL de HCl em 490 mL de água ultrapura), por 10 minutos. Após este período o gel foi lavado com água destilada e transferido para 500 mL de solução desnaturante (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) por 30 minutos. O gel foi lavado com água destilada e em seguida neutralizado através da incubação por 15 minutos em 250 mL de solução neutralizadora (Tris-HCl 0,5 M; NaCl 1,5 M; EDTA 0,001 M; pH=7,2), com agitação branda à temperatura ambiente. Esse procedimento foi

repetido mais uma vez. A transferência do DNA contido no gel para a membrana de *nylon* (Hybond N^+, Amersham) foi realizada por 12 horas em um aparato de transferência tradicional, utilizando-se a solução de transferência SSC 20 X (NaCl 3 M; citrato de sódio 0,3 M; pH=7,0). A membrana foi seca em cima de papel de cromatografia por 2 horas em forno a 80ºC e armazenda a 4ºC.

2.2.14 Extração do plasmídeo pFAT-gfp e preparo da sonda de hibridação

Células de *E. coli* transformadas com o vetor pFAT-gfp foram inoculadas em meio LB líquido (5 mL) com espectinomicina 200 $\mu g.mL^{-1}$ e incubadas a 37ºC, sob agitação de 200 rpm, por 12 horas. Em seguida, procedeu-se a extração do plasmídio com uso do kit Mobio (*Ultra Clean 6 minute mini plasmid prep kit*) seguindo as orientações do fabricante. O plasmídio de 18,4 kb foi observado por eletroforese em gel de agarose 1,4% a 3 $volts.cm^{-1}$. Para quantificação, comparou-se a fluorescência da amostra com àquela de um padrão conhecido (DNA de fago *lambda* a 12,5; 25; 50; 75; 100 e 200 ng). Após a eletroforese o gel foi corado em solução de brometo de etídio e fotodocumentado.

Para a hibridação foi utilizado como sonda um fragmento de DNA contendo o gene *gfp* de 700 pb. Este fragmento foi obtido por PCR com os *primers* glGFP5 (5'-GCCGGAATTCATGAGCAAGGGCGAGGAACTGTTC-3') e glGFP3 (5'-GCCGAGCTCAGATCTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'). A marcação da sonda foi realizada segundo o protocolo do kit *Gene Images™ AlkPhos Direct™ Labelling and Detection System* (GE Healthcare). A hidridação foi realizada conforme recomendado pelo protocolo do kit *Gene Images™ AlkPhos Direct™ Labelling and Detection System* (GE Healthcare).

2.2.15 Análise dos transformantes por microscopia óptica de fluorescência (MOF)

Transformantes escolhidos aleatoriamente foram analisados quanto à expressão do gene *gfp*, por meio de microscopia óptica de epifluorescência. Para essa visualização, lâminas esterilizadas receberam um pedaço do micélio, por meio de palito

de madeira esterilizado e 1 gota de água destilada esterilizada, cobertos por uma lamínula esterilizada. As análises foram realizadas em microscópio de epifluorescência (Zeiss Axiophot-2) com o filtro indicado para análise da GFP. As amostras foram excitadas utilizando filtro de 490 nm e as imagens foram capturadas com uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio, com auxílio do software ISIS (Meta Systems, Alemanha). As imagens do isolado selvagem 12P foram utilizadas como controle.

2.2.16 Amplificação, clonagem e sequenciamento das regiões que flanqueiam o T-DNA

As regiões que flanqueiam a inserção do T-DNA foram identificadas por meio da técnica TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced Polymerase Chain Reaction) (LIU; WHITTIER, 1995). Esta metodologia consiste de três reações de PCR sucessivas, utilizando *primers* "*nested*" específicos para as seqüências das bordas do T-DNA juntamente com um *primer* arbitrário e degenerado (AD) de seqüência curta, e a eficiência de amplificação de produtos específicos e não específicos pode ser controlada pela temperatura (COMBIER et al., 2003). Os *primers* utilizados foram construídos e gentilmente cedidos pela Dra. Léia Cecília de Lima Fávaro. São *primers* específicos para as seqüências das bordas esquerda e direita do T-DNA do vetor pFAT-gfp (FITZGERALD et al., 2003). Os *primers* da borda esquerda utilizados foram LB1-1 (5'-GTCAGCTCCGGCACCTTATCCTTG-3'), LB2-2 (5'-CCTCGTTACATCAGCTCGCAGCTAC-3') e LB3-1 (5'-CGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC-3'). Os *primers* específicos da borda esquerda utilizados nas reações secundária e terciária (LB2-2 e LB3-1, respectivamente) foram posicionados a uma distância de 105 pb um do outro, para facilitar a confirmação da especificidade do produto por meio de comparação do tamanho das bandas geradas.

O DNA genômico dos transformantes foi extraído de acordo com Raeder e Broda (1985) e utilizado como molde nas reações de TAIL-PCR. Os *primers* arbitrários utilizados (AD1, AD2 e AD3) e a composição das reações de PCR foram as mesmas descritas por Liu et al. (1995). A amplificação por TAIL-PCR foi realizada seguindo as condições propostas por Mullins et al. (2001). As reações de amplificação foram

realizadas em termociclador PTC – 200 (MJ Research). Para cada transformante, os produtos gerados nas reações primária, secundária e terciária foram analisados lado a lado em gel de agarose 1,2% a 3 volts.cm^{-1}. Todos os fragmentos obtidos na reação terciária que mostraram diminuição do comprimento consistente com a posição dos primers na região T-DNA (em comparação aos produtos da reação secundária) foram considerados como sendo as junções do T-DNA (COMBIER et al., 2003).

Os produtos das reações terciárias foram purificados do gel de agarose, clonados em plasmídio pGEM-T Easy (Promega, Brasil) e transformados em células de *E. coli* DH5α. A amplificação do inserto foi realizada por PCR de colônia, utilizando os *primers* universais M13. As reações foram preparadas em volume final de 50 μL, com 0,2 mM de dNTP; 3,7 mM de $MgCl_2$; Tampão 1x (50mM de KCl e 20mM de Tris-HCl - pH 8,4); 0,05 U.μL^{-1} de Taq DNA polimerase (Fermentas Life Sciences, Brasil) e 0,2μM de cada *primer*. A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 94^{0}C por 4 min, com 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de 1 min a 94^{0}C, 1 min a 60^{0}C e 2 min a 72^{0}C e extensão final de 10 min a 72^{0}C. Os produtos de PCR foram purificados (UltraClean™ PCR Clean-Up Kit, MOBIO Laboratories) e seqüenciados no Centro de Estudos do Genoma Humano, São Paulo, Brasil. Posteriormente, a região correspondente ao T-DNA foi retirada e as seqüências flanqueadoras restantes foram analisadas com auxílio da ferramenta BLAST (BlastN, BlastX e TBlastX) contra a base de dados do GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

2.2.17 Caracterização dos transformantes

Foram realizadas análises enzimáticas (protease, lipase, esterase e pectinase) a fim de comparar a produção entre os transformantes. As análises foram realizadas conforme o item **2.2.3**.

2.2.18 Interação entre *Guignardia citricarpa* e Citros

Com o objetivo de avaliar o comportamento de *G.citricarpa* durante a colonização de Citros, utilizou-se a abordagem da análise de microscopia. Essas análises foram

realizadas tanto com o isolado selvagem 12P quanto com os transformantes expressando a proteína verde fluorescente (GFP). Além disso, bioensaios mostrando a capacidade de formação de sintomas em frutos de laranja também foram avaliados.

2.2.19 Produção de esporos

Para os experimentos de bioensaio onde são necessárias inoculações do fungo, primeiramente obtivemos a produção de esporos de *G. citricarpa.* Folhas de laranja Valência foram destacadas, lavadas em água corrente, cortadas em pequenos fragmentos de 1cm^2 e autoclavadas durante 20 minutos em água destilada. Oito fragmentos foram colocados em cada placa de Petri contendo meio ágar-água 3%. Com o auxílio de palito de madeira autoclavado, pedaços de micélio de *G. citricarpa* foram repicados de modo adjacente aos quadrados de folha de laranja. As placas foram mantidas a temperatura ambiente, sob fotoperído de 12h durante 21 dias, quando observa-se a formação dos esporos (Figura 2a;b)

2.2.20 Inoculação dos esporos em frutos – Bioensaio de patogenicidade

Frutos de laranja Valência foram inoculados com esporos de *G. citricarpa* por meio de um ferimento feito levemente por um palito de madeira esterilizado. Cerca de 5 ferimentos por fruto foram feitos e sobre eles, os esporos foram depositados e cobertos com algodão, a fim de deixá-los sempre úmidos Figura 2c;d;e;f). Os frutos foram armazenados em câmara úmida durante 15 dias, com regas constantes. Após esse período, foram observados a capacidade de cada transformante, bem como do isolado selvagem, de produzir sintomas nos frutos. Foi avaliado também, a colonização do fungo na planta, por meio de análise microscópica. Cortes nos sintomas foram realizados e colocados sobre lâmina esterilizada, com 1 gota de água destilada esterilizada e cobertos por lamínula esterilizada. As lâminas foram observadas em microscópio de epifluorescência (Zeiss Axiophot-2) com o filtro indicado para análise da GFP. As amostras foram excitadas utilizando filtro de 490 nm e as imagens foram capturadas com uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio, com auxílio do

software ISIS (Meta Systems, Alemanha). As imagens do isolado selvagem 12P de *G. citricarpa*, bem como de um isolado endofítico 16E de *G. mangiferae*, cortes apenas da casaca da laranja e cortes de fruto contendo somente o ferimento foram utilizadas como controle.

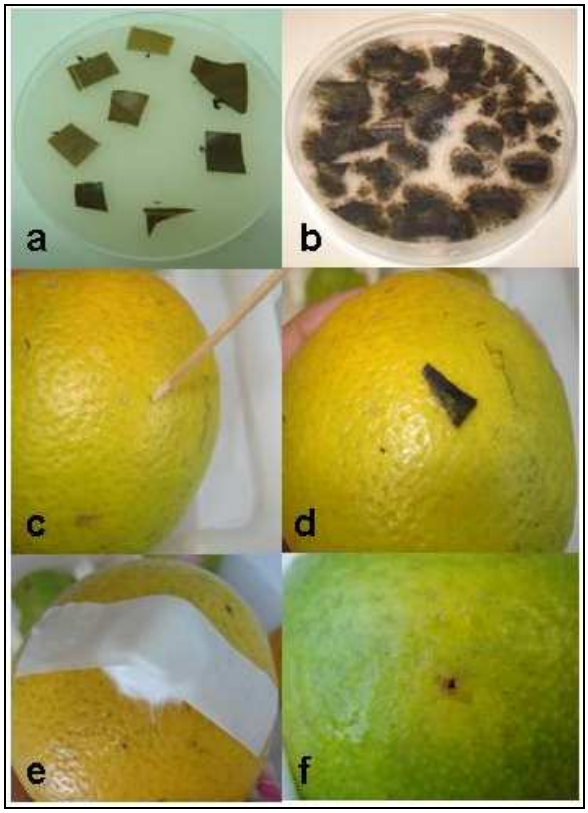

Figura 2 –Metodologia para a obtenção de esporos de *G. citricarpa* e Bioensaio em frutos de laranja. **a**- **b**: Produção de esporos de *G. citricarpa* sobre folhas de laranja, em placa de Petri, após 21 dias (**b**); **c-e**: Modo de inoculação para realizar o bioensaio de patogenicidade; **f**: Sintoma característico de MPC em frutos de laranja após aproximadamente 15 dias após a inoculação, mantidos em câmara úmida

2.2.21 Delineamento experimental

Nos experimentos necessários foram realizadas análises estatísticas com no mínimo três repetições por tratamento em delineamento inteiramente casualizado ou em blocos ao acaso. A análise dos dados foi realizada no programa SAS (*Statistical Analysis System*, Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), onde foi aplicado teste de Tukey para as médias de índice enzimático, ao nível de 5% de significância.

2.3 Resultados e Discussões

2.3.1 Secreção de enzimas hidrolíticas por isolados endofíticos e patogênicos de *Guignardia* sp.

Testes semi-quantitativos para a detecção de enzimas secretadas por fungos em meio sólido foram realizadas (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). A capacidade de produção de zonas de clareamento (halos) em meio sólido é um modo simples e rápido de avaliar a secreção de enzimas por fungos (St. LEGER; JOSHI; ROBERTS, 1997). Este é o primeiro relato da análise de produção de enzimas hidrolíticas por isolados de *Guignardia* spp. As enzimas endoglucanase, protease, esterase, lipase e xilanase foram avaliadas por esse método qualitativo, enquanto que as enzimas quitinase e endopoligalacturonase foram avaliadas de maneira quantitativa. A caracterização fisiológica dos isolados por meio da secreção enzimática revelou diferenças significativas entre os isolados das espécies endofítica (*G. mangiferae*) e patogênica (*G. citricarpa*). De um modo geral, houve diferenças significativas na produção das enzimas endoglucanase, esterase, xilanase, além de endopoligalacturonase (**Gráfico 1**). Nessas enzimas, observou-se que os maiores índices enzimáticos (IE) foram encontrados nos isolados da espécie patogênica (*G. citricarpa*). A produção diferencial para endopoligalacturonase na espécie patogênica já havia sido relatada anteriormente por Romão et al. (2004). A produção de lipase e quitinase foi considerada não diferente estatisticamente para ambas espécies. Já a produção de proteases não foi verificada para nenhum dos isolados incluídos nesse estudo. Fávaro (2009) também observou que nenhuma das linhagens do fungo endofítico de cana-de-açúcar *Epicoccum nigrum* utilizadas em suas análises apresentaram a produção de proteases. Carroll e Petrini (1981) e Lumyong et al. (2002) avaliaram espécies endofíticas e encontraram esse mesmo resultado com relação à produção de proteases. Eles acreditam que esses endófitos requerem fontes de carbono mais simples para o crescimento, característica nutricional que é comum em fungos de caráter simbiôntico.

Durante infecção e colonização das plantas, os fungos precisam vencer algumas barreiras físicas. Uma das estratégias utilizadas para suplantar essas barreiras consiste

na produção de uma série de enzimas extracelulares, como celulases, pectinases, xilanases, cutinases e proteinases. A produção dessas enzimas ocorre desde os primeiros estágios de infecção, para degradação de cutina e parede celular, até a efetiva penetração e subsequente diferenciação das hifas dentro do hospedeiro (MENDGEN; DEISING, 1993). St. Leger et al. (1997) observaram que os fungos apresentam uma adaptação enzimática aos requerimentos de seus nichos ecológicos, para exemplificar, espécies fitopatogênicas produzem altos níveis de enzimas degradadoras de polissacarídeos pécticos, celulose e xilana, assim como cutinase, mas secretam baixos níveis de quitinases e protease, exatamente como foi observado nos resultados desse trabalho (**Gráfico 1**). Essas enzimas em especial devem desempenhar um papel fundamental na patogenicidade de *G. citricarpa,* pois a fase inicial de ataque às células da planta para penetração, bem como as fases de estabelecimento e desenvolvimento do fungo, dependem delas. Como a fase saprofítica é de extrema importância na epidemiologia do estabelecimento da doença MPC (SCHINOR et al, 2002), enzimas hidrolíticas em altos níveis são requisitadas por esse fungo para a degradação dos tecidos senescentes das plantas.

As partes aéreas das plantas são cobertas de cutícula, um polímero complexo rico em derivados de ácido graxo esterificado, associado e coberto por cêras, que forma uma camada de proteção a ser rompida pelos fungos durante os primeiros estágios do processo de infecção. Em *Colletotrichum graminicola*, a matriz extracelular que envolve os conídios contém várias enzimas (NICHOLSON; EPSTEIN, 1991), algumas delas identificadas como cutinases (PASCHOLATI et al., 1993). Depois de atravessar a cutícula, as paredes celulares representam a próxima barreira física para os fungos. Paredes celulares de plantas consistem de uma complexa combinação de carboidratos (celulose, hemicelulose e pectina), proteínas, lignina, água e algumas substâncias incrustadas, como cutina e suberina. Enzimas degradadoras de parede celular (CWDE) têm sido avaliadas em um grande número de fungos. Fungos fitopatogênicos secretam grandes quantidades de pectinases, enzimas capazes de degradar pectina, um dos maiores polímeros presente na parede celular das plantas, o que foi também observado nos resultados desse estudo (**Gráfico 1**). De fato, as pectinases têm sido descritas como as primeiras enzimas extracelulares produzidas pelos fungos durante o processo

de infecção (JONES et al., 1972). Estudos envolvendo interrupção de genes alvo mostraram que essas enzimas desenvolvem função importante na patogenicidade e virulência de vários fungos que causam maceração do tecido, como *Acpg1* em *Alternaria citri*, *Bcpg1* em *Botrytis cinerea, pelB* em *Colletotrichum gloeosporioides* e *pelA* e *pelD* em *Nectria haematococca* (ISSHIKI et al., 2001; TEN HAVE et al., 1998; ROGERS et al., 2000; YAKOBY et al., 2001). Nesse sentido, Herbert et al. (2004) detectaram a expressão de dois genes de endopoligalacturonases, *CLPG1* e *CLPG2*, durante a interação do patógeno *Colletotrichum lindemuthianum* com plantas de feijão. Os autores sugerem que *CLPG2* se acumula na parede celular do fungo durante o crescimento em meio de cultura com pectina e durante a formação do apressório, tanto *in vitro* quanto durante a interação com a planta. Outros estudos têm demonstrado que as pectinases podem ter importante papel também no desenvolvimento de fungos biotróficos. Oeser *et al.* (2002) determinaram que endopoligalacturonase é o verdadeiro fator de patogenicidade na interação do fungo *Claviceps purpurea* com centeio, sugerindo que a enzima poderia facilitar o desenvolvimento biotrófico do fungo sem causar excessiva maceração nos tecidos infectados. Diante dos resultados apresentados no presente trabalho, pode-se inferir que a endopoligalacturonase apresenta um papel importante, não único, no processo de patogenicidade em *Guignardia citricarpa*, uma vez que apresenta maiores índices de produção dessa enzima quando comparada à espécie endofítica *G. mangiferae*.

Os resultados também mostram diferenças na produção da enzima endoglucanase, que é responsável pela hidrólise da celulose. A celulose é o principal componente da parede celular de plantas. A completa hidrólise da celulose para glicose envolve uma combinação de múltiplas enzimas (celobioidrolases, endoglucanases e β-glucosidades) com diferentes especificidades de substratos. Enzimas celulolíticas têm sido isoladas de fungos, como genes de celobioidrolases de *Penicillium janthinellum* (KOCH et al., 1993), *Phanerochaete chrysosporium* (COVERT et al., 1992), *Humicola grisea* (TAKASHIMA et al., 1996), *Trichoderma viride* (CHENG et al., 1990), diferentes espécies de *Aspergillus* (TAKADA et al., 1998; GIELKENS et al., 1999), *Agaricus bisporus* (RAGUZ et al., 1992) e *Neurospora crassa* (TALEB; RADFORD, 1995). A alta capacidade de degradação da parede celular vegetal por fungos patogênicos, como

visto nos resultados desse trabalho, representa uma grande vantagem no seu estabelecimento na planta. No caso de *Guignardia citricarpa*, quando os esporos estão em contato com a superfície dos tecidos susceptíveis, e em condições ambientais apropriadas, podem germinar originando um apressório (McOnie, 1964), que necessita secretar grande quantidade de enzimas digestivas, como as glucanases, para se desenvolver e penetrar na célula do hospedeiro, até colonizar todo o tecido vegetal (VARMA et. al., 1999).

A degradação da parede celular das plantas ainda envolve uma série de outras enzimas. Por exemplo, cerca de 20 genes codificadores de endoxilanases e β-xilosidases têm sido clonados em espécies de *Aspergillus.* Genes de xilanases têm sido clonados a partir de fungos como *Penicillium, A. bisporus, Magnaporthe grisea* (KIMURA et al., 2000; De GROOT et al., 1998; ALCOCER et al., 2003; EMAMI; HACK, 2003; WU et al., 1995) e *T. reesei* (FOREMAN et al., 2003). As xilanases são uma classe de enzimas que degradam o polissacarídeo linear beta-1,4-xilano em xilose, decompondo assim, a hemicelulose, um dos principais componentes das paredes celulares das plantas.

A ocorrência de múltiplos genes codificadores de enzimas funcionalmente redundantes que degradam barreiras físicas do hospedeiro é uma característica bastante comum em fungos que infectam plantas (ROGERS et al., 2000). Da mesma maneira, devem ser encontrados também em *G. citricarpa.* Assim, múltiplos genes para cutinases, pectinases, xilanases, e proteases são encontrados em fitopatógenos (KOLATTUKUDY; GAMBLE, 1995; TEN HAVE et al., 1998; TEMPLETON et al., 1994; ABEL-BIRKHOLD; WALTON, 1996; MURPHY; WALTON, 1996). Nesses casos, a interrupção de um único gene provavelmente não resultará em diminuição da virulência. Além disso, alguns genes que codificam enzimas degradadoras, como *pelD* de *Nectria haematococca,* podem ser expressos apenas no hospedeiro (GUO et al., 1996), ou diferentes genes são expressos em diferentes órgãos, ou durante diferentes estágios de desenvolvimento e infecção (YAO; KOLLER, 1995; FAN; KOLLER, 1998).

Esses resultados reforçam o papel de enzimas hidrolíticas no estabelecimento de interações fungo-planta. No caso de *G. citricarpa*, a endopoligalacturonase pode

apresentar um papel bastante importante na infecção, como observados para outros fitopatógenos (HERBERT et al., 1998; OESER et al., 2002).

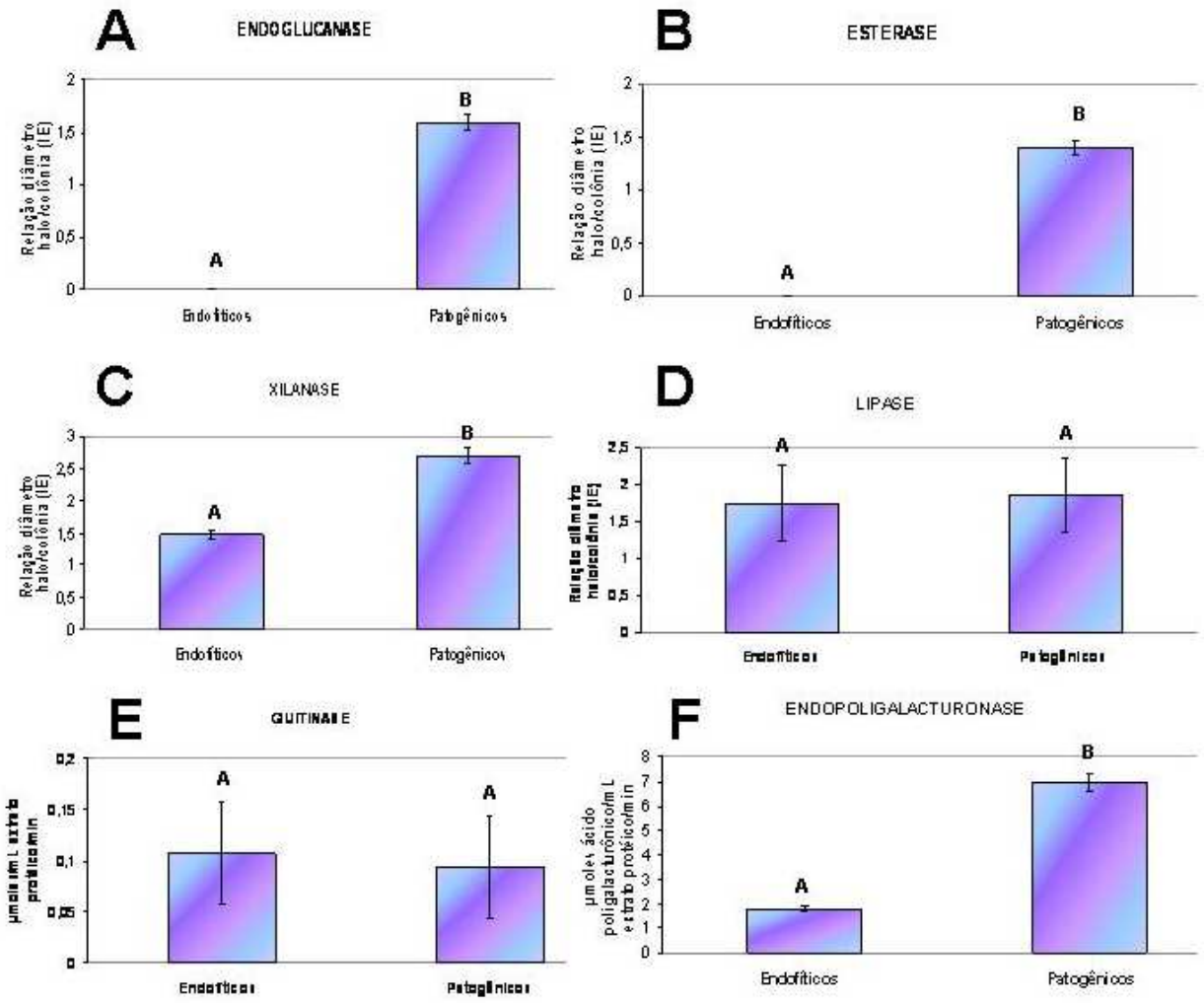

Gráfico 1. Atividade enzimática de isolados das espécies endofítica (*G. mangiferae*) e patogênica (*G. citricarpa*) de *Guignardia* sp. **A** – Produção de Endoglucanase; **B –** Produção de Esterase; **C** – Produção de Xilanase; **D** – Produção de Lipase; **E** – Produção de Quitinase; **F** – Produçao de Endopoligalacturonase. Valores médios de 15 isolados da espécie endofítica e 15 isolados da patogênica, com três repetições cada. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (alfa = 0,05)

2.3.2 Identificação do gene de endopoligalacturonase em *Guignardia sp.*

A busca e identificação de genes em organismos têm sido intensificadas nos últimos anos devido ao avanço das tecnologias moleculares, em especial, aliadas à Bioinformática. No gênero *Guignardia* existem duas espécies bastante relacionadas tanto morfologicamente quanto geneticamente: *G. citricarpa*, patogênica a citros, e *G. mangiferae*, descrita como espécie endofítica de citros. Uma vez que são tão intimamente relacionadas, deve haver características diferenciais presentes na espécie patogênica que a torna classificada como tal. Visando esse melhor entendimento, mecanismos associados à patogenicidade foram avaliados. Como característica geral, os organismos patogênicos possuem um aparato especial, com certos genes conservados mesmo entre diferentes espécies. Pensando nisso, uma busca por esses genes foi realizada visando a construção de *primers*, com base na similaridade entre esses genes, possibilitando a obtenção de sequências parciais de genes relacionados à patogenicidade de *G. citricarpa.* Simultaneamente, foi realizada uma busca ao banco dados de informações do NCBI (*National Center of Biotecnology Information*) para a classificação taxonômica das espécies utilizadas. Através dessas informações, foi realizado um novo alinhamento contendo apenas sequências gênicas de espécies de fungos taxonomicamente próximos à família de *Guignardia*. A partir da homologia entre as sequências, foram construídos *primers* nas regiões conservadas.

Atualmente, encontram-se depositadas no banco de dados do GenBank 747 sequências nucleotídicas para fungos pertencentes ao gênero *Guignardia*, sendo 118 relativas à *G. citricarpa*; 399 de *G. mangiferae*; 25 de *G. bidwelli*; 18 para *G. philoprina*; e 13 para *G. vaccinii*, existindo, ainda, 174 de outros taxa (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Dentre essas sequências, nenhuma é relativa a um gene relacionado à patogenicidade, sendo a sua grande maioria correspondente a regiões ITS fúngicas. Assim, esse trabalho relata pela primeira vez a sequência parcial do gene de endopoligalacturonase no gênero *Guignarida*. Com base na quantidade de sequências depositadas no GenBank, nota-se que a cada dia novos genes vem sendo descobertos, mas ainda existe uma deficiência de estudos nesse sentido para esse gênero, que

apresenta importância mundial devido aos grandes prejuízos que proporciona para a agricultura.

Nesse trabalho, visou-se a construção de *primers* baseados em genes relacionados à patogenicidade, em especial, o da enzima endopoligalacturonase, que em análises enzimáticas anteriores (ROMÃO et al., 2006) e confirmadas nesse trabalho, mostrou uma produção significativamente maior na espécie patogênica *G.* citricarpa, quando comparada às quantidades produzidas pela espécie endofítica *G. mangiferae.* Para o desenho de *primers in silico*, uma busca na literatura de genes fúngicos comprovados que atuam no estabelecimento e desenvolvimento de doenças em plantas foi realizada, e foram obtidas ESTs (*Expressed Sequence Tags*) a partir de 119 sequências de diversos genes, contidas no banco de dados do NCBI-GenBank (*The National Center for Biotechnology Information*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) (Anexo A). Genes de organismos da mesma família de *Guignardia* sp., ou de famílias próximas foram selecionados e as ORFs (*Open Reading Frame*) com maior similaridade entre os organismos foram alinhadas no Programa MEGA 4.0. Assim, os *primers* foram construídos e avaliados *in silico* pelo Programa IDT DNA (www.idtdna.com). Ao final do processo de construção dos *primers*, como etapa da PCR, foram delineados 6 pares, conforme explicitado na **tabela 2**.

Tabela 2 - Pares de *primers* construídos e utilizados nesse trabalho

Primers	**ALVO**	**Sequências**
BCATR8 (F) *BCATR8* (R)	ABC Transport	TATCAAATCATCTGGGGAGACAAAGC AGATATTGTTCYCCRGTGACACTG
PKS1 (F) *PKS1* (R)	Poliketina Sintase	AAYGGCGGCAAGAMSAAGCCCAAGTTC CATCATBGAYAAGTGYTTYCCYGGCATGTGRC
Clpg2 (F) *Clpg2* (R)	Endopoligalacturonase	AAYGGCGGCAAGAMSAAGCCCAAGTTC CCGTTCTCGCTAYTCCTGRTCYATGACG
Cut3 (F) *Cut3* (R)	Cutinase	GMGWCRGGSMACTTGG CGGCRMRGGRTCTGC
PecA (F) *PecA* (R)	Poligalacturonase	GTATTGCAAGATAGAAADGGG GGCACCACTGTATGCATAGA
Cel1 (F) *Cel1* (R)	Exoglucanase	CMASAAGGGCAGCAACGG GTAGAGTCGAGCCAGAGCATGTTGGAGTGGTGCTG

O par de *primers Clpg2* se mostrou eficiente para os isolados patogênicos e endofíticos do gênero *Guignardia*. Após a purificação da sua banda única (526 pb), o produto foi enviado para ser sequenciado no Centro de Estudos do Genoma Humano USP-SP. O resultado do sequenciamento foi confrontado com a base de dados do GenBank (Blastx) e mostrando a similaridade (66%) com a sequência da enzima endopoligalacturonase de diversos gêneros de fungos como *Fusarium, Aspergillus, Giberella, Emericella, Penicillium, Botryotinia, Geotrichum, Alternaria, Ophiostoma, Sclerotinia, Colletotrichum, Galactomyces, Botrytis, Phaeosphaeria*.

A análise da árvore filogenética (**Figura 3**) mostra que as sequências tanto dos isolados endofíticos como as dos patogênicos apresentaram homologia com a sequência do gene *pg2* de endopoligalacturonase já conhecida de *Colletotrichum lindemuthianum* (X95457 GenBank). Esse fungo é relatado como o agente causal da antracnose em feijoeiros, sendo um dos fitopatógenos de maior ocorrência e responsável por prejuízos expressivos à cultura. A antracnose pode ser altamente devastadora, proporcionando perdas de até 100% na produção, o que mostra a severidade do problema e a alta capacidade de destruição do patógeno (SARTORATO, 2002; TALAMINI et al., 2004). Provavelmente, *C. lindemuthianum* possui um aparato patogênico bastante forte e eficaz.

Na árvore observa-se também que, além dessa similaridade com *C. lindemuthianum* (endofíticos 98% e patogênicos 100%), os isolados endofíticos (*G. mangiferae*) se agruparam entre si (98% de similaridade), o mesmo ocorrendo com os isolados patogênicos (*G. citricarpa*) (100% de similaridade). Ao considerar esse dado, podemos inferir que talvez essas pequenas diferenças entre as sequências dessas duas espécies (2%) possam fazer parte de um aparato gênico diferencial capaz de influenciar na característica patogênica da espécie *G. citricarpa*.

A enzima endopoligalacturonase já se mostra presente na participação da patogenicidade de diversas doenças fúngicas em vegetais (OLIVEIRA et al., 2008). A podridão branca é uma doença que acomete muitas espécies de plantas de interesse econômico. Tal doença é caracterizada pela maceração dos tecidos da planta dando a estas um aspecto de podridão. O causador é o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, conhecido também por mofo branco. Quando esse patógeno infecta a planta, seu

primeiro desafio é vencer a parede celular, para isso, produz enzimas responsáveis por degradar a parede celular da planta hospedeira. Dentre as principais enzimas estão as endopoligalacturonases, responsáveis por degradar o polímero de pectina. A planta por sua vez ativa seus mecanismos de defesa produzindo proteínas inibidoras de poligalacturonases (PGIPs) que limita o potencial destrutivo do fungo. No trabalho de Oliveira et. al (2008), mostrou-se a caracterização da expressão de genes de endopoligalacturonases e PGIP em hastes de feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) infectado com *S. sclerotioum* para determinar sua associação com o processo de infecção. Sob condições de patogenicidade, os genes correspondentes a endopoligalacturonase do fungo *S. sclerotiorum PG*1 foram altamente expressos durante a infecção; o gene *PG*3 foi regulado durante as últimas fases de infecção; *PG*5 apresentou níveis constantes de expressão; e os genes *PG*6 e *PG*7 apresentaram expressão reduzida. Esses resultados fornecem evidências de que as endopoligalacturonases contribuem para o processo de infecção durante a fase de colonização, promovendo a liberação de oligogalacturonídeos que são poderosas moléculas sinalizadoras podendo ativar a resposta de defesa da planta, como a síntese de proteínas inibidoras de poligalacturonases (OLIVEIRA et al., 2008). Assim, não apenas um único gene, mas famílias gênicas podem ser responsáveis por características de patogenicidade em diversos sistemas e em diferentes estádios de desenvolvimento do fungo e evolução da doença.

Da mesma maneira, Mendes (2008) avaliou a expressão de genes de endopoligalacturonase em *Fusarium moniliforme* durante a infecção de cana-de-açúcar. Esses genes avaliados são expressos pelo *F. moliniforme* durante todos os estágios de infecção, incluindo contato inicial com o hospedeiro, resposta à defesa da planta, aquisição de nutrientes e fase necrótica (DI PIETRO; RONCERO, 1998; KAHMANN; BASSE, 2001). Para *G. citricarpa*, a fase necrotrófica é uma das mais importantes (SCHINOR et al., 2002), na qual há a produção de esporos em restos culturais do campo. Dessa forma, a participação de enzimas degradadoras é fundamental, uma vez que a parede celular é a principal barreira das plantas contra patógenos. Outros genes devem desempenhar importante papel na infecção, visto que durante a penetração ativa os fitopatógenos secretam um conjunto de enzimas hidrolíticas, incluindo

cutinases, celulases, pectinases e proteases (KNOGGE, 1996). Para vencer essa barreira o patógeno secreta enzimas degradadoras da parede celular, as quais atuam quebrando os polímeros da parede em moléculas que servem como alimento, além de abrir a via de infecção através do tecido da planta (ANNIS; GOODWIN, 1997). As pectinases e cutinases são as primeiras enzimas extracelulares produzidas durante a infecção do hospedeiro, e as do tipo 'endo' são consideradas o principal fator de maceração da parede em doenças de podridão (SELLA et al., 2004). Estudos mostram que a disrupção de genes de endopectinases diminuem a virulência ou patogênese tanto de fungos biotróficos quanto de necrotróficos (TEN HAVE et al., 1998; OESER et al., 2002). Como a parede celular de frutos de laranja possui muita pectina (PERES, 1997), esse gene deve participar ativamente em *G. citricarpa,* uma vez que é importante na degradação da casca para conseguir penetrar e colonizar o tecido. É importante considerar que o processo de infecção e seus diferentes estágios são determinados pela ação conjunta de vários genes.

Nos resultados obtidos por Mendes (2008), tanto a linhagem endofítica quanto a patogênica de *F. moliniforme* apresentaram alta capacidade de colonização de cana-de-açúcar. Ambas as espécies produziram endopoligalcturonase, assim como os resultados obtidos nesse trabalho. Na caracterização desse gene, Mendes (2008) observou que embora a agressividade da linhagem patogênica tenha se apresentado mais severamente, o endófito também conduziu a planta à morte nas condições avaliadas. No endófito, o gene da endopoligalacturonase *pgIII* foi mais expresso do que no patógeno. Isso se explica pelo fato desse gene possuir a capacidade de escapar do reconhecimento de defesa da planta, assim, ele apresenta maior participação na infecção pelo endófito que pelo patógeno (ANDRÉ-LEROUX et al., 2005).

Dessa forma, é bastante provável que os produtos de genes vegetais ou fúngicos modulados durante a interação (induzidos ou suprimidos) tenham papel essencial na sua regulação. Sendo assim, dados da literatura têm mostrado a existência de genes específicos para cada tipo de interação e também a presença de genes conservados entre interações patogênicas e simbióticas (SCHULZ; BOYLE, 2005; GÜIMIL et al., 2005). Relações simbióticas entre fungos e plantas são amplamente encontradas na natureza, e resultam em interações que variam de

mutualismos a parasitismos (KOGEL et al., 2006). Dependendo do balanço dessas interações, os fungos são descritos como patógenos (relação desbalanceada onde o fungo causa doença) ou mutualistas (relação balanceada, em que os fungos estabelecem algum tipo de simbiose com a planta, tais como a micorrízica, a endofítica e a epifítica) (KOGEL et al., 2006).

Esses resultados mostram que tanto endófitos quanto patógenos necessitam das enzimas de degradação para colonizar as plantas. O que pode diferenciá-los é o reconhecimento pela maquinaria de defesa da planta, havendo um consórcio no caso de endofíticos, e um ataque quando patógenos (SCHULZ; BOYLE, 2005). É um fino ajuste de interação entre os dois organismos. Esse fato também explica a razão de uma espécie ser considerada patogênica para uma planta e endofítica para outra. No caso de *Guignardia* sp., *G. citricarpa* é agente causal de doenças em várias culturas além de citros, como abacate e tomate (BAKER, 1938), arroz (SUGHA et al., 1986), citros (McONIE, 1964; JOHNSTON), eucalipto (CROUS et al., 1993). Entretanto, *G. mangiferae* foi isolada de Citros de material aparentemente sadio, sendo classificados como endófitos (CARROLL, 1986; PETRINI, 1991; LEUCHTMANN et al., 1992, GLIENKE, 1995).

Existe um limiar muito pequeno entre as espécies patogênicas e endofíticas (SCHULZ; BOYLE, 2005). Os principais mecanismos de estabelecimento do fungo são iguais entre eles, havendo apenas um reconhecimento por parte da planta. Assim, as duas espécies possuem esse mecanismo, mostrando que um grupo ou família de genes, nesse caso, se faz responsável pelo estabelecimento da infecção. Caso que não ocorre na interação bastante conhecida entre o fungo endofítico *Epichloë festucae* e gramíneas, onde foram realizados ensaios de interrupção gênica e observou-se que com a mutação em um único gene, *NoxA*, o fungo passou de uma condição simbiótica com a planta para antagonista. (TANAKA et al., 2006).

Isso mostra a tênue e complexa relação entre uma interação planta-microrganismo, que pode se alterar em diferentes condições, situações e ambientes. Autores discutem, inclusive, a existência de uma co-evolução entre plantas e fungos patogênicos (BARBIERI; CARVALHO, 2001). Outros autores também analisam a hipótese de que ocorre um balanço antagônico entre virulência de endofíticos e

respostas de defesa da planta resultam em uma colonização assintomática (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Das cerca de 100.000 espécies fúngicas que já foram descritas (HAWKSWORTH, 2004), aproximadamente dois terços estabelecem íntimas relações com outros organismos vivos, tais como parasíticas, comensalísticas ou mutualísticas (BARBIERI; CARVALHO, 2001). Tanto fungos como as plantas sofrem inúmeras modificações morfológicas e fisiológicas durante o desenvolvimento da interação. Isso se deve principalmente a um complexo e refinado mecanismo de regulação gênica.

Inúmeros trabalhos têm sido realizados mostrando a importância do conhecimento desses genes, tanto expressos diferencialmente entre o tipo de interação (em especial com ação no próprio fungo), como interferindo e modulando genes nas plantas hospedeiras (RODRIGUEZ; REDMAN; KIM, 2007). De modo geral, essas interações ainda precisam ser bastante estudadas e avaliadas a fim de um melhor entendimento da sua dinâmica e desenvolvimento, em especial as relações existentes no patossistema formado por *Guignardia citricarpa* e Citros.

Dessa forma, fica evidenciado que a diferença entre endófitos e patógenos de *Guignardia* sp. pode não estar relacionada à estrutura genômica, mas sim à regulação da expressão de genes chaves na interação com a planta hospedeira. Porém, um estudo de infecção mostrando a diferença de expressão entre os genes de endopoligalacturonase durante os estágios de infecção da planta, bem como em condições de campo, ainda devem ser investigados.

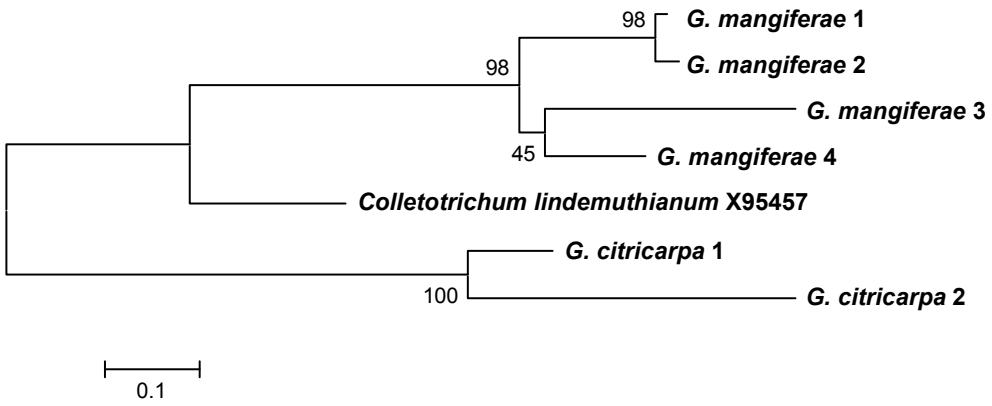

Figura 3 - . Árvore filogenética dos isolados endofíticos (*G. mangiferae*) e patogênicos (*G.* citricarpa) do gênero *Guignardia* obtida por meio de sequências da região do gene de endopoligalacturonase

2.3.3 Transformação genética de *Guignardia citricarpa* via *Agrobacterium tumefacines*

2.3.3.1 Teste de sensibilidade à higromicina B

Para a adaptação de um protocolo de agrotransformação eficiente para o fungo *Guignardia citricarpa*, alguns pré-testes foram realizados a fim de estipular a concentração do antibiótico higromicina B a ser utilizada para a seleção dos transformantes, uma vez que o cassete gênico do vetor de transformação pFAT-gfp possui o gene *hph*, que confere resistência a esse antibiótico. Assim, a resistência do isolado selvagem 12P de *G. citricarpa* foi testada em placas de Petri contendo meio BDA acrescidos de concentrações crescentes de higromicina B (25; 50; 75; 100; 150 e 200 $\mu g.ml^{-1}$). Foi observado que a partir da concentração de 50 $\mu g.mL^{-1}$ desse antibiótico não houve crescimento fúngico, sendo determinada essa a concentração mínima inibitória (CMI) do crescimento desse fungo. Para os experimentos de transformação por *Agrobacterium*, foi utilizada a concentração de 75 $\mu g.ml^{-1}$ a fim de assegurar a confiabilidade dos resultados.

A sensibilidade de fungos à higromicina B é bastante variável, sendo altamente específica para cada organismo. O uso de diferentes concentrações desse antibiótico nos meios seletivos já foram apontados como 50 $\mu g.mL^{-1}$ (GORFER et al., 2007;

FÁVARO, 2009), 100 µg.mL^{-1} (FITZGERALD et al., 2003), 150 µg.mL^{-1} (ZHONG et al., 2007) e 200 µg.mL^{-1} (MATA et al., 2007; ROMÃO, 2010). Assim, é importante a determinação da concentração mínima inibitória para cada fungo e/ou linhagem a ser transformado(a).

2.3.3.2 Teste de crescimento sobre diferentes tipos de membranas e meio de indução (IM)

Quanto à capacidade do fungo *G. citricarpa* crescer sobre diferentes tipos de membranas (papel de filtro, éster de celulose e *nylon*) observou-se que ele foi hábil em crescer nas três condições, bem como no meio de cultura IM, podendo ser realizados os ensaios de transformação genética via *Agrobacterium* utilizando-se esses três tipos de materiais. Além disso, esse teste mostrou que aos 3 dias após a inoculação o crescimento micelial atingiu cerca de 0,5 cm de diâmetro. Assim, três dias anteriores à etapa de co-cultivo com as células bacterianas de *Agrobacteruim*, o fungo *G. citricarpa* foi inoculado, facilitando a possibilidade de infecção das hifas já em desenvolvimento.

2.3.3.3 Agrotransformação de *Guignardia citricarpa*

Uma técnica bastante utilizada na transformação genética de fungos filamentosos é a transformação mediada pela bactéria fitopatogênica *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT), que vem sendo muito utilizada para transferência de genes e como ferramenta para mutagênese insercional (ABUODEH et al., 2000; BLAISE et al., 2007). Baseando-se nesse sistema natural de transferência de genes de procarioto para eucarioto, essa técnica num primeiro momento foi usada como estratégia para transferir genes de interesse comercial às plantas. Em fungos, o método foi primeiramente descrito por Bundock et al. (1995) para transformação de *Saccharomyces cereviseae*, e posteriormente aplicado aos fungos filamentosos (de GROOT et al., 1998). Desde então, tem sido empregado com sucesso para inúmeras espécies fúngicas de interesse agrícola, industrial e médico, incluindo membros dos filos Ascomicota, Basidiomicota, Zigomicota e também Oomicota (MICHIELSE et al., 2005; LACROIX et al., 2006; FÁVARO, 2009).

Entretanto, embora seja grande o número de espécies fúngicas já descritas como passíveis de serem transformadas via *A. tumefaciens*, ainda não havia sido descrita essa metodologia para fungos do gênero *Guignardia*. Considerando a importância do patógeno *G. citricarpa,* torna-se particularmente interessante estabelecer um sistema eficiente de transformação para essa espécie.

Sendo assim, esse trabalho visou a obtenção de um protocolo de transformação genética para *Guignardia citricarpa*. Os primeiros passos foram a adaptação e otimização da técnica de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Os experimentos foram baseados no trabalho exposto por De Groot et al. (1995), com as modificações específicas para *G. citricarpa*. Para avaliar a eficiência da metodologia de agrotransformação, neste trabalho alguns parâmetros foram avaliados num primeiro ensaio, dentre eles o tipo de membrana (papel de filtro, éster de celulose e *nylon*); tempo de co-cultivo entre os micélios do fungo com as células bacterianas (48 e 96h); e ainda, concentração do agente indutor de virulência da bactéria durante o processo de transformação, acetoseringona (AS) (200 e 400 µM). Além desses parâmentros, outros ainda podem ser testados, uma vez que as condições ótimas para obtenção de altas frequências de transformação são específicas para cada fungo e/ou linhagem a ser transformada. Michielse et al. (2005) descrevem diferentes fatores como determinantes da eficiência de transformação, entre eles, a linhagem de *Agrobacterium*, o material fúngico inicial, a concentração de acetoseringona, as condições de co-cultivo e o tipo de membrana.

Os resultados deste trabalho (**Tabela 3**) mostram que a obtenção de transformantes de *G. citricarpa* foi possível a partir de todas as condições adotadas e que as diferentes condições praticamente não originaram diferentes eficiências de transformação. Mesmo assim, as condições que apresentaram melhor eficiência (maior número de transformantes por condição) para o experimento de transformação genética de *G. citricarpa* mediado por *A. tumefaciens* foram de 96 horas de co-cultivo, em meio contendo 200 µM de AS, com micélios crescendo sobre membrana de éster celulose (Millipore; 0,45 cm de porosidade). Com esses parâmetros estabelecidos para *G. citricarpa*, outros dois experimentos seguindo essas condições foram realizados, para aumentar o número de transformantes e também, para avaliar a repetibilidade do

protocolo estabelecido. Os transformantes foram obtidos quando acetoseringona estava presente tanto no meio de crescimento das bactérias quanto durante o co-cultivo. Na ausência de acetoseringona, nenhum transformante foi recuperado. Este composto fenólico funciona como um indutor da expressão dos genes de virulência (*vir*) (GELVIN, 2003) e é essencial para a transferência do T-DNA, como tem sido observado para outros fungos (MICHIELSE et al., 2005).

No total dos três experimentos, foi obtido um banco de 175 transformantes resistentes à higromicina B e expressando GFP, após cerca de 60 dias de incubação. Esse é um resultado curioso que difere bastante da maioria dos fungos que já foram agrotransformados. A habilidade natural de crescimento de *G. citricarpa* em meio de cultura BDA é muito lenta, com cerca de 15 dias de crescimento, até que tome toda a placa de Petri. Trabalhos mostram a obtenção prontamente de transformantes, com 7 dias em *Epicoccum nigrum* (FÁVARO, 2009) e até com apenas 4 dias em *Trichoderma virens* (ROMÃO, 2010).

Além disso, o número de transformante também difere bastante dos resultados encontrados na literatura. Isso também se deve ao fato de que *G. citricarpa* foi agrotransformada com micélio como material inicial da transformação. Outros fungos mais vorazes no crescimento, esporulam naturalmente em condições laboratoriais (placa de Petri com meio de cultura apropriado). Assim, como material inicial de transformação pode ser utilizado seus esporos, ou conídios, o que aumenta substancialmente o número de transformantes gerados, e em menos tempo. Geralmente, o aumento de células fúngicas leva ao aumento no número de transformantes (ZWIERS; WAARD, 2001; ROLLAND et al., 2003; REIS et al., 2004; ROGERS et al., 2004; ZEILINGER, 2004). Fato observado também por Mikosch et al. (2001), demonstrando que o uso de esporos germinados levou a maior formação de transformantes contendo múltiplas cópias do T-DNA do que a utilização de micélio. Outros exemplos são para *Venturia inaequalis*, em que FITZGERALD et al. (2003) obtiveram um máximo de 223 transformantes por 200 mg de micélio, enquanto que para *Verticillium fungicola*, 4068 transformantes por 10^5 conídios foram obtidos (AMEY et al., 2002). Além disso, Romão (2010) comprova essa hipótese pois mostra que o uso de

uma maior concentração de esporos levou a formação de um maior número de transformantes em *T. Virens*.

Diferentes membranas, tais como nitrocelulose, *nylon* (Hybond), celofane e papel de filtro, têm sido usadas na etapa de co-cultivo de diversos protocolos. De maneira geral, membranas de nitrocelulose e Hybond C têm proporcionado menores eficiências de transformação (MICHIELSE et al., 2005; VIJN; GOVERS, 2003) do que papel de filtro e Hybond N^+ (ZEILINGER, 2004). Fávaro (2009) observou que um aumento expressivo no número de colônias resistentes foi obtido quando membranas de *nylon* foram empregadas no co-cultivo. O mesmo também foi relatado para *A. fumigatus* (SUGUI; CHANG; KWON-CHUNG, 2005) e para o oomiceto *Phytophthora infestans* (VIJN; GOVERS, 2003).

A alteração no tempo de co-cultivo também tem revelado variação na eficiência de transformação. Para a maioria das espécies fúngicas, o tempo de co-cultivo por 48 horas resultou em uma maior eficiência de transformação (De GROOT, 1998; MULLINS et al., 2001; RHO et al., 2001; LEAL et al., 2004; WELD; EADY; RIDGWAY, 2006; ZHONG et al., 2007), entretanto, em alguns casos a extensão desse tempo pode resultar em um maior número de transformantes (COMBIER et al., 2003), como observado nesse trabalho (**Tabela 3**) e em outros fungos, tais como *F. oxysporum* (MULLINS et al., 2001), *Beauveria bassiana* (LECLERQUE et al., 2004), *Colletotrichum graminicola* (FLOWERS; VAILLANCOURT, 2005), *Cryptococcus neoformans* (McCLELLAND; CHANG; KWON-CHUNG, 2005), *Magnaporthe oryzae* (BETTS et al., 2007), *C. falcatum* e *C. acutatum* (MARUTHACHALAM et al., 2008) e *Epicoccum nigrum* (FÁVARO, 2009).

O fungo *G. citricarpa* possui a massa micelial altamente pigmentada e a parede espessa, fatores que podem dificultar a transformação, como também foi demonstrado para *C. minitans* (ROGERS et al., 2004) e *E. nigrum* (FÁVARO, 2009). A utilização dos fragmentos miceliais também resultou em setores resistentes à higromicina B (dados não mostrados).

De modo geral, os resultados obtidos mostraram que as condições escolhidas para a agrotransformação de *G.citricarpa* foram consistentes para a obtenção de transformantes. A **Figura 4** mostra o aspecto das placas do experimento de

transformação 60 dias após a transferência das membranas para o meio seletivo contendo higromicina B. O estabelecimento do sistema de transformação por *Agrobacterium* para *G. citricarpa* possibilita a geração de transformantes e o uso dessa ferramenta para estudos de mutagênese insercional e interrupção gênica visando a identificação de genes importantes, como os envolvidos com os mecanismos de patogenicidade utilizados por esse fungo.

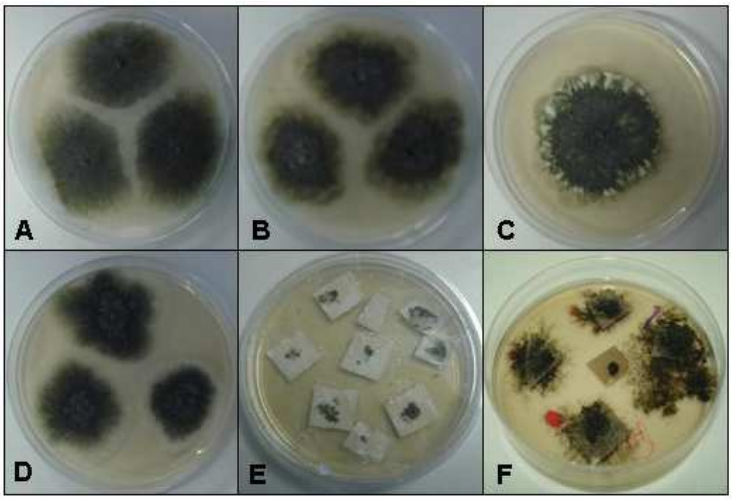

Figura 4. Aspecto das colônias de *G. citricarpa* crescendo sobre diferentes tipos de membrana: **A** – Papel de filtro; **B** – *Nylon*; **C** – Éster de celulose. **D** – Isolado selvagem 12P de *G. citricarpa*. **E** – Experimento de agrotranformação, etapa de co-cultivo; **F** – Crescimento dos transformantes de *G. citricarpa* resistentes à higromicina B. Nota-se que não houve modificações morfológicas dos transformantes quando comparados ao isolado selvagem 12P

Tabela 3 - Eficiência da agrotransformação genética de *G. citricarpa* sob influência de diversos parâmetros testados

VARIÁVEL	CONDIÇÃO	NÚMERO DE TRANSFORMANTES
Membrana	**Éster de celulose ***	**37**
	Papel de filtro	**33**
	Nylon	**26**
Concentração de AS ($\mu M.mL^{-1}$)	**200 ***	**49**
	400	**37**
Tempo de co-cultivo (h)	**48**	**30**
	96 *	**56**

2.3.2.4 Estabilidade mitótica dos transformantes

A estabilidade mitótica dos transformantes de *G. citricarpa* foi avaliada após a repicagem destes em meio de cultura não seletivo (sem higromicina B) e observação do micélio sob microscópio de epifluorescência. Após 5 passagens sucessivas nesse meio, os transformantes foram repicados para o meio de cultura seletivo, contendo 75 $\mu g.mL^{-1}$ de higromicina B. Os resultados mostram que 82% dos transformantes mantiveram o fenótipo de resistência à higromicina B e expressão da proteína verde fluorescente (GFP). Altas taxa de estabilidade mitótica também foram descritas para diferentes espécies fúngicas transformadas com gene *gfp* pelo sistema *Agrobacterium* (FITZGERALD et al., 2003; GORFER et al., 2007; MARTINO et al., 2007; DUARTE et al., 2007; WANG; LI, 2008). Foi observada também uma alta taxa de formação de setores nos transformantes. A formação de setores em *G. citricarpa* pode estar relacionado à perda de RNAdf (KAVA-CORDEIRO et al., 2008).

Transformantes escolhidos aleatoriamente foram analisados por microscopia óptica de epifluorescência (MOF) (**Figura 5**). A emissão de fluorescência foi observada nas hifas de todos os transformantes avaliados, mostrando a estabilidade desses transformantes, resultado de uma síntese estável de mRNA e sua tradução.

Nas hifas do isolado selvagem 12P de *G. citricarpa* não foi detectada fluorescência, sendo utilizado como controle. A expressão da GFP foi distribuída ao longo das hifas, sendo que se pode notar alguns segmentos de hifas com expressão reduzida ou sem expressão de GFP (**Figura 5d**). Em *L. maculans* (ECKERT et al., 2005), esse mesmo padrão de expressão da GFP foi relatado, onde a análise por microscopia de luz dos segmentos de hifas sem expressão revelou que estas regiões apresentavam células colapsadas em hifas mais velhas. A distribuição não uniforme de fluorescência nas hifas de algumas espécies de fungos tem sido relacionada à exclusão de GFP dos vacúolos e mitocôndrias, com acúmulo abundante desta proteína nos núcleos e citoplasma (FERNÁNDEZ-ÁBALOS et al., 1998).

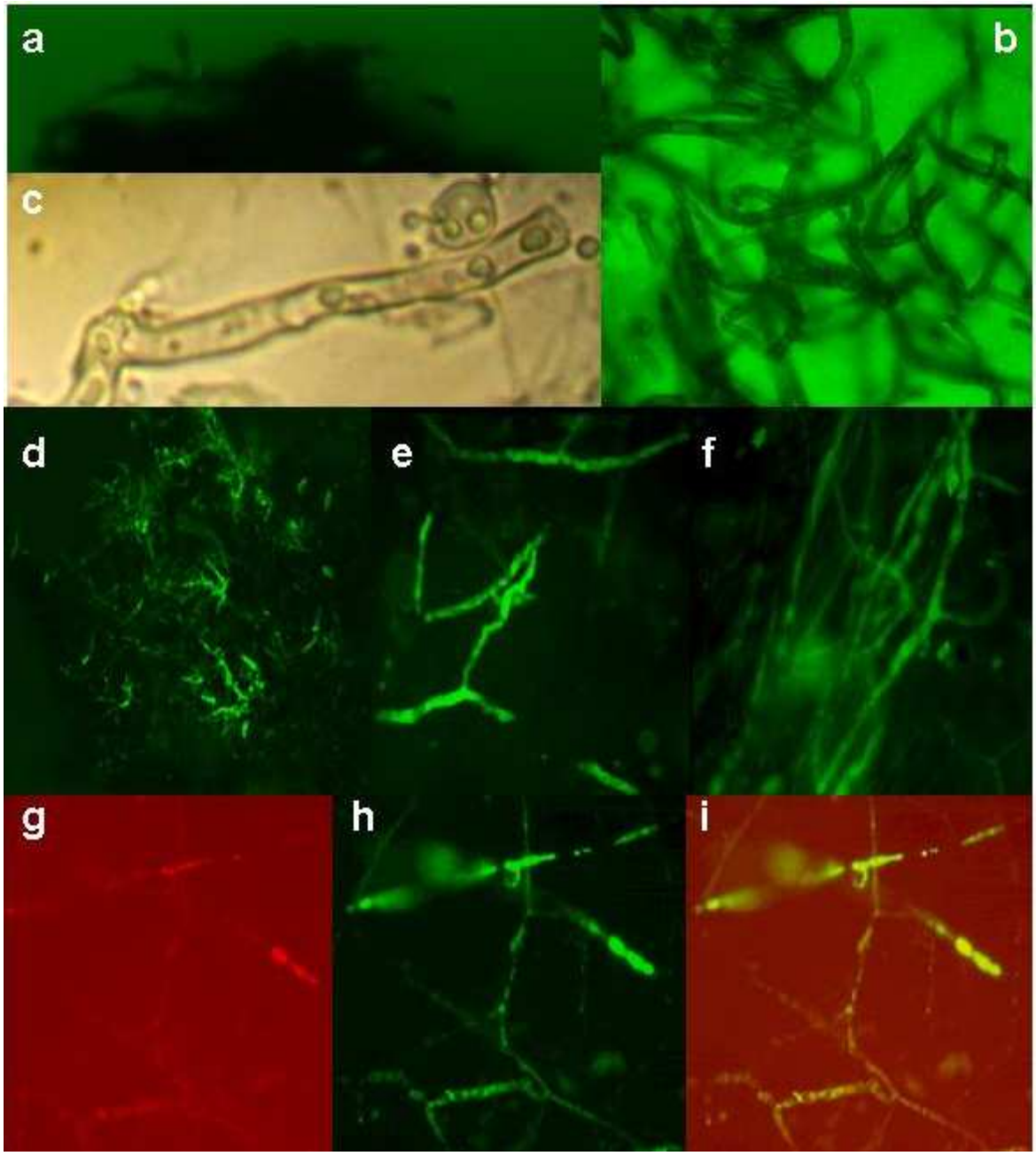

Figura 5 – Confirmação da inserção do gene da GFP do vetor pFAT-gfp no genoma de transformantes de *G. citricarpa* por microscopia óptica de espifluorescência (MOF). **a**: Controle negativo, isolado selvagem 12P, micélio sem fluorescência (200X); **b**: Controle negativo, isolado selvagem 12P, hifas sem fluorescência (400X); **c**: Isolado selvagem 12P sob microscopia óptica, aspecto das hifas (400X); **d-e**: Transformante de *G. citricarpa* exibindo micélio com fluorescência, nota-se que há partes das hifas onde se observa maior intensidade da fluorescência (**d** 100X; 400X); **f**: Transformante de *G. citricarpa* crescido em meio líquido mostrando micélio com fluorescência, nota-se que as hifas parecem apresentar aspecto mais fino, provavelmente devido ao crescimento em meio líquido (400X); **g-i**: Transformante de *G. citricarpa* sob os diferentes tipos de filtros de luz, vermelha (g) e verde (**h**) e com a sobreposição de ambos (**i**). Observam-se hifas emitindo fluorescência (400X)

2.3.3.5 Confirmação da transformação por PCR e análise de *Southern Blot*

A transformação genética de *G. citricarpa* mediada por *A. tumefaciens* foi confirmada por PCR e *Southern Blot*. Sete transformantes resistentes à higromicina B foram selecionados ao acaso para confirmação via PCR da presença do gene *hgr* no plasmídeo pFAT-gfp. Os resultados (**Figura 6**) mostram a amplificação de um fragmento de 600 pb correspondente ao gene *hph* de higromicina B em todos os transformantes testados bem como no vetor pFAT-gfp. A amostra do isolado selvagem 12P não apresentou nenhum produto de amplificação, como já esperado.

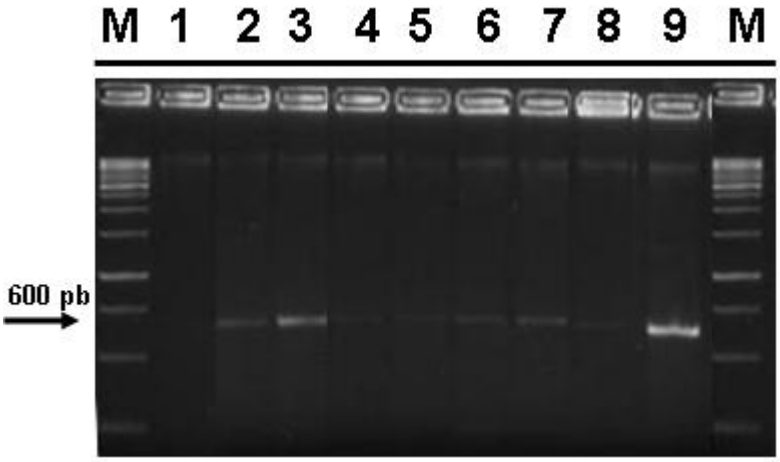

Figura 6 – Amplificação do gene *hph* por PCR, utilizando os *primers* hph1 e hph2 (MALONEK; MEINHARDT, 2001), de 7 transformantes do isolado 12P de *G.citricarpa*. Na linha **1** não houve amplificação a partir do DNA do isolado selvagem 12P; nas linhas **2-8** observam-se os fragmentos de DNA amplificados (600 pb) dos sete transformantes escolhidos ao acaso; na linha **9** representa-se o segmento de DNA amplificado do vetor pFAT-gfp, como controle positivo; e nas linhas **M** mostram-se o marcador de peso molecular 1 kb (Fermentas)

O número de cópias do T-DNA inseridas ao acaso no genoma dos transformantes de *G. citricarpa* foi avaliada por *Southern Blot* com o uso de uma sonda contendo a sequência do gene *gfp* (700 pb). Quatro transformantes foram escolhidos de maneira aleatória e a análise revelou a confirmação da integração de T-DNA no genoma dos transformantes e também mostrou o número de cópias dessa inserção. Os resultados apresentados indicam que houve diferentes pontos de integração, pois entre os transformantes se observa a detecção de bandas de diferentes tamanhos (**Figura 7**). Em dois dos transformantes analisados foi observada a inserção de mais de uma cópia do DNA exógeno em seu genoma. No isolado selvagem 12P de *G. citricarpa* não foi

detectado nenhum sinal de hibridização, conforme esperado. O vetor pFAT-gfp apresentou uma banda de 15 kb, aproximadamente. Os reultados obtidos nesse trabalho discordam com os obtidos para várias espécies de fungos que têm sido transformadas por *A. tumefaciens* e apresentam na maioria das vezes, a inserção de cópias únicas no seu DNA (MICHIELSE et al., 2005; WALTON; IDNURM; HEITMAN, 2005; JEON et al., 2007; BLAISE et al., 2007; HUSER et al., 2009).

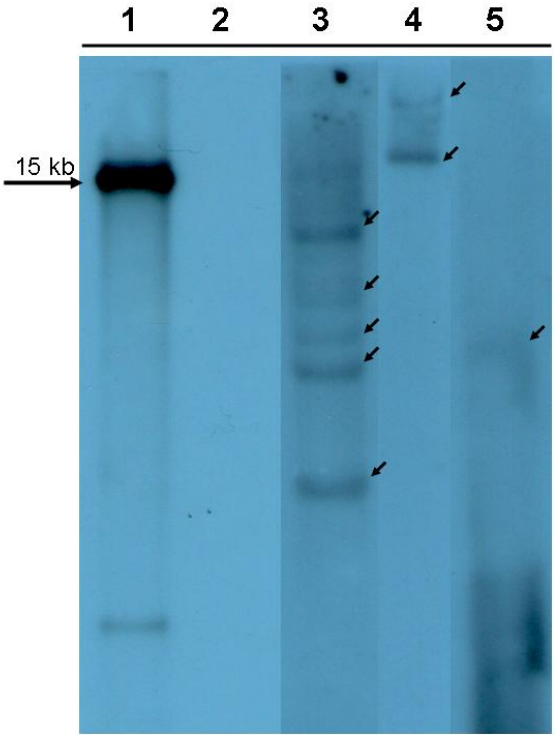

Figura 7 – Hibridização de *Southern blot* de 3 transformantes do isolado 12P de *G. citricarpa*. 15 µg de DNA genômico foram clivados com a enzima de restrição *Eco*RI, a qual corta o T-DNA duas vezes e não corta internamente o gene *gfp*, e transferidos para membranas de *nylon* e hibridizados com uma sonda de fragmento de 700 pb do gene *gfp*. Linha **1** contém o vetor pFAT-gfp utilizado como controle positivo; linha **2** mostra o isolado selvagem 12P de *G. citricarpa*, utilizado como controle negativo; linhas **3-5** apresentam os isolados transformados, escolhidos ao acaso. As setas indicam as bandas visualizadas

2.3.3.6 Análise das regiões que flanqueiam a inserção do T-DNA

A identificação das regiões que flanqueiam a inserção do T-DNA no genoma dos transformantes foi realizada utilizando a técnica TAIL-PCR (LIU et al., 1995). Foram avaliados transformantes aleatórios do isolado 12P de *G. citricarpa*. As reações de TAIL-PCR foram consideradas positivas quando a reação terciária produziu um ou mais

fragmentos do tamanho esperado (**Figura 8**), com base na posição de anelamento dos primers específicos para as bordas do T-DNA (FÁVARO, 2009).

Utilizando os *primers* específicos para a borda esquerda (LB) do vetor pFAT-gfp gentilmente cedidos pela Dra. Léia Cecília de Lima Fávaro, em combinação com os *primers* arbitrários AD1, AD2 e AD3 (LIU et al., 1995), foi possível obter produtos de amplificação únicos com uma banda de massa molecular de 250 pb (**Figura 9**).

A análise das sequências que flanqueiam a borda esquerda (LB) do T-DNA foi realizada para 8 transformantes. Com o sequenciamento, foi revelada a sequência intacta da borda esquerda, correspondendo à sequência do próprio plasmídeo pFAT-gfp, mostrando que houve a inserção não somente do T-DNA, mas também do vetor binário. Dados semelhantes já foram observados mostrando a elevada frequência de integração de DNA plasmidial em outros fungos como *C. lagenarium*, onde as seqüências do vetor binário foram encontradas em 43% das seqüências analisadas (TSUJI et al., 2003), em *C. graminicola*, onde 70% dos transformantes apresentaram integrações em tandem de todo o plasmídeo Ti (FLOWERS; VAILLANCOURT 2005), e também em *Trichoderma reesei* (ZHONG et al., 2007), *Botrytis cinerea* (ROLLAND et al., 2003) e em *E. nigrum* (FÁVARO, 2009). A recuperação de sequências do vetor binário adjacentes à borda esquerda do T-DNA indica a ocorrência de uma falha na clivagem desta região quando a transferência foi iniciada. Durante a transformação mediada por *A. tumefaciens* a transferência do DNA inicia na borda direita e termina na borda esquerda, resultando na transferência de todo o DNA localizado entre estas bordas (FÁVARO, 2009). Além disso, foram encontradas similaridades com regiões identificadas como transposons e microssatélites.

O resultado do sequenciamento também revelou elevada identidade com sequências de proteínas depositadas no GenBank. O transformante 15 apresentou similaridade (98%) com uma proteína hipotética de *Pseudomonas* sp. denominada Adenilil sulfato redutase (CAP03145.1), que é responsável por catalisar reações com sulfato, reduzindo-o a sulfito, muito utilizada por bactérias, para respiração (LAMPREIA et al., 1991).

Já o transformante 27 apresentou alta similaridade (96%) com a proteína hipotética Metil-coenzima M redutase (CBF64720.1) de *Sclerolinum contortum*. Essa enzima é responsável pela formação microbiana de metanol (ERMLER et al., 1997).

Outra proteína identificada para o transformante 49 mostrou alta similaridade (90%) com N-acetilglucosaminil-transferase (CAD90583.1) de *Bradyrhizobium* sp., enzima da categoria das glicosiltransferases, com o papel de catalisar reações de transferência de açúcares. O resultado da transferência de glicosil pode ser um carboidrato, um glicosídeo, um oligossacarídeo ou um polissacarídeo. Algumas glicosiltransferases podem também catalisar a transferência de fosfato inorgânico ou água. Glicosil transferência pode, ainda, ocorrer em resíduos de proteínas, geralmente de tirosina, serina e treonina (CHOU; JUNGALWALA, 1996).

Esses resultados demonstram que a transformação mediada por *A. tumefaciens* é uma ferramenta útil para mutagênese insercional de *G. citricarpa*, e que a metodologia otimizada desenvolvida neste trabalho pode ser utilizada para identificação de genes envolvidos em diferentes processos metabólicos nesse fungo, em especial, aqueles envolvidos nos processos de patogenicidade.

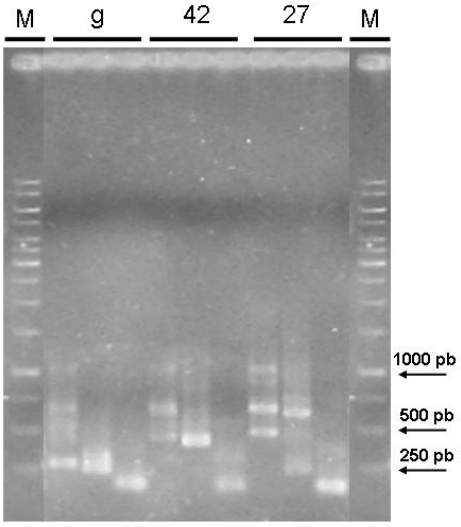

Figura 8 – Análise em gel de agarose dos produtos gerados por TAIL-PCR (*Thermal Asymmetric Interlaced Polymerase Chain Reaction*) a partir de 3 transformantes (**g**, **42** e **27**), elegidos ao acaso, de *G. citricarpa*. A amplificação desses transformantes foi realizada com os *primers* específicos da borda esquerda do T-DNA do vetor pFAT-gfp (LB1-1, LB2-2 e LB3-1) e com o *primer* arbitrário degenerado AD2. A figura representa, para cada transformante (da esquerda para direita), os produtos das reações primárias, secundárias e terciárias do protocolo. É possível visualizar as diferenças de tamanho entre os produtos das reações secundárias e terciárias, com base na posição de anelamento dos *primers* específicos. Linha **M** contém o Marcador de massa molecular 1Kb (Fermentas)

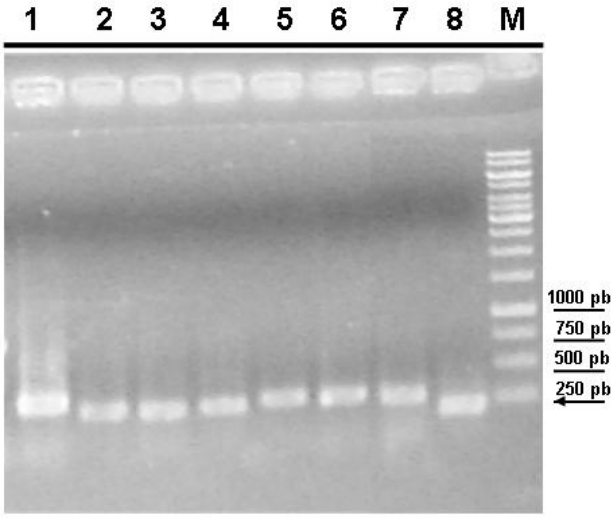

Figura 9 – Análise em gel de agarose dos produtos gerados por TAIL-PCR (*Thermal Asymmetric Interlaced-Polymerase Chain Reaction*) a partir de 7 transformantes representativos do isolado 12P de *G. citricarpa*. A amplificação desses transformantes foi realizada com os *primers* específicos da borda esquerda do T-DNA do vetor pFAT-gfp (LB1-1, LB2-2 e LB3-1) e com o primer arbitrário degenerado AD2. Linhas **1-8** representam os produtos das reações terciária do protocolo. Os produtos de amplificação que representam as junções do T-DNA com o genoma do fungo estão representados pelas bandas (~ 250 pb). Linha **M** contém o marcador de massa molecular 1Kb (Fermentas)

2.3.3.7 Caracterização dos transformantes

Nesse trabalho, após o estabelecimento de um protocolo de transformação genética de *G. citricarpa* mediada por *A. tumefaciens*, um banco de transformantes resistentes à higromicina B e expressando a proteína GFP foi gerado, permitindo diversos tipos de investigação, abrindo novas fronteiras de estudos. Assim, os transformantes do isolado 12P de *G. citricarpa* foram avaliados quanto à similaridade morfológica e fisiológica com o isolado selvagem 12P.

Os resultados mostraram que com a transformação genética, o crescimento em meio BDA a 28º C não foi alterado, mantendo-se as características morfológicas iguais às do isolado selvagem. Ambos apresentaram taxa de crescimento semelhante, crescimento lento, micélio grosso e de coloração não alterada (**Figura 4**). Romão (2010) também não observou diferenças quando comparou transformantes de *T. Virens* com sua linhagem selvagem original. Diversos trabalhos na literatura demonstram que a geração de transformantes pode originar um grande número de mutantes que se

apresentam morfologicamente diferentes das linhagens/isolados que os originou, mudando de textura, taxa de crescimento e coloração (FÁVARO, 2009;).

Para a abordagem fisiológica, 15 transformantes foram avaliados quanto à capacidade de produção de enzimas hidrolíticas em meio sólido (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). No **gráfico 2** pode-se observar os valores encontrados para a secreção de pectinase. As análises foram realizadas pelo método semi-quantitativo, em meios de cultura seletivos, avaliando a produção por meio do halo de degradação em meio sólido, formado em placas de Petri.

Os resultados mostram que para protease, não houve detecção de produção para nenhum transformante, bem como para o isolado selvagem 12P. Para as enzimas lipase e esterase, as produções dos transformantes foram similares às do isolado selvagem 12P de *G. citricarpa*, não havendo diferenças significativas na secreção dessas enzimas (dados não mostrados).

Já para pectinase, houve diferenças para alguns transformantes, quando comparados à produção pelo isolado selvagem 12P (**Gráfico 2**). Dos 15 transformantes aleatórios analisados, 5 apresentaram uma produção similar ao isolado selvagem 12P, enquanto que 10 deles apresentaram uma produção estatisticamente significativamente diferenciada, houve uma menor quantidade de secreção dessa enzima. Esses resultados mostram que pode ter ocorrido alguma alteração na capacidade de produção dessas enzimas devido à transformação genética via *A. tumefaciens* pela qual passaram. Mais uma vez, observa-se o papel da enzima endopoligalacturonase nos mecanismos de patogenicidade do fungo *G. citricarpa*.

Esses transformantes se mostraram com estabilidade mitótica preservada quanto à inserção do DNA exógeno que receberam, apresentando um fenótipo resistente à higromicina B e expressando a GFP. Assim, outras modificações certamente ocorreram no genoma desses transformantes afetando seu metabolismo e devem ser investigadas. Uma delas pode ter sido na deficiência da produção da enzima pectinase.

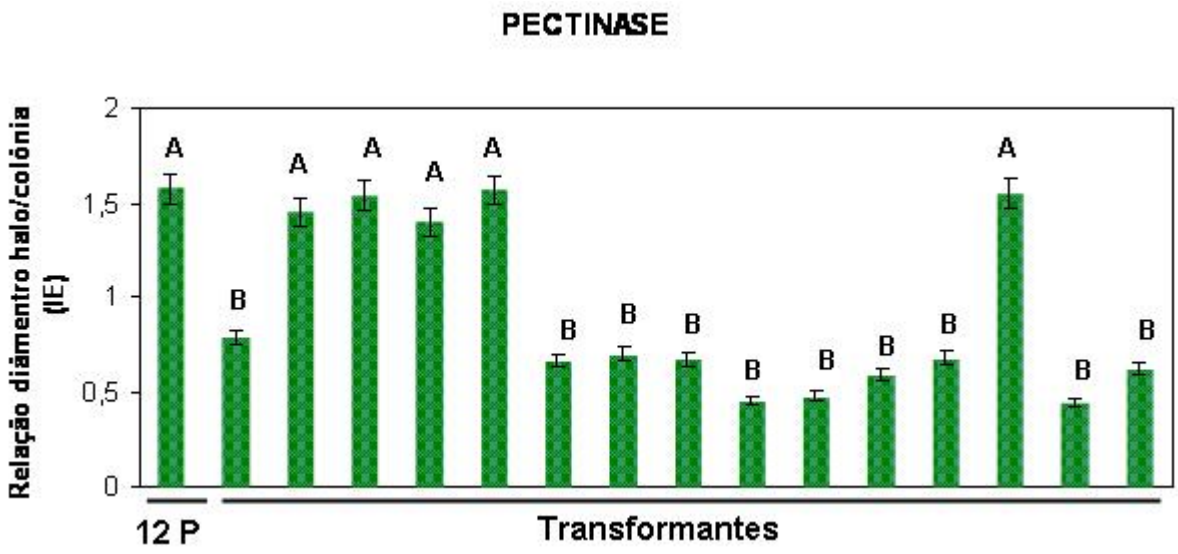

Gráfico 2 -Perfil da produção de pectinase por agrotransformantes de *G. citricarpa*. Valores médios, com três repetições cada. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (alfa = 0,05)

2.3.4 Interação entre *Guignardia citricarpa* e *Citrus* sp.

O estabelecimento de uma metodologia de transformação genética para *G. citricarpa* foi realizada com sucesso neste trabalho. Isso permite estudos de mutagênese insercional além de *knockout* gênico, buscando a função de diversos genes no metabolismo do fungo, merecendo especial atenção, aqueles que possam estar ligados a caracteres de patogenicidade. A técnica também proporcionou a análise da interação desse patógeno com *Citrus* sp., uma vez que o vetor inserido no genoma fúngico possui o cassete de expressão da proteína GFP, permitindo o monitoramento do comportamento de *G. citricarpa* quando inoculados em frutos de laranja. A capacidade de germinação do fungo, bem como seu desenvolvimento e modo de colonização e infecção, foram investigados por meio de microscopia óptica de epifluorescência (MOF). Além disso, observou-se a capacidade dos transformantes em causar sintomas em frutos, por meio desse bioensaio de patogenicidade.

2.3.4.1 Capacidade de formar sintoma – Bioensaio de patogenicidade

Para o bioensaio de patogenicidade, os esporos de *G. citricarpa* selvagem 12P e de transformantes foram inoculados em frutos de laranja destacados até que os sintomas típicos de MPC (SPÓSITO, 2003) fossem produzidos. A lesão causada pela doença se caracteriza por manchas arredondadas na casca dos frutos, de coloração avermelhada num estágio inicial (**Figura 10**).

De forma generalizada, os resultados são apresentados na **Figura 10**. Utilizaram-se como controle primeiramente frutos somente com o ferimento, de modo que essa etapa não afetasse os resultados por meio da suposta produção de compostos de defesa pela planta, uma vez que sofreu um dano, e isso se confundisse ou influenciasse os resultados para a formação da lesão característica da enfermidade (**Figura 10a**). Outro controle utilizado foi o da inoculação de esporos de isolados endofíticos de *G. mangiferae*, de maneira que funcionou como controle negativo, mostrando a não capacidade de formar sintoma em frutos (**Figura 10b**). O controle positivo foi a inoculação de esporos do isolado selvagem 12P de *G. citricarpa*, mostrando a lesão formada em cascas do fruto (**Figura 10c**). Os esporos de outros transformantes foram inoculados e observou-se a formação de sintomas típicos (**Figura 10d-f**). Todos os transformantes inoculados apresentaram a capacidade de desenvolvimento de sintomas. Com base nesse resultado, pode-se inferir que a transformação genética não afetou essa habilidade de causar lesões, ou seja, como a inserção do DNA exógeno é aleatória no genoma do fungo, essa integração ocorreu em algum *loci* que não interferiu na patogenicidade dos fungos transgênicos. Quando se pretende realizar uma mutagênese insercional dirigida, pode-se avaliar o potencial de alguns genes hipotéticos de serem responsivos pelo caráter patogênico dado à espécie, como observado em diversos trabalhos na literatura, envolvendo os mais distintos patossistemas, (RHO et al., 2001; COMBIER et al., 2003; ROGERS et al., 2004; LECLERQUE et al., 2004; WALTON et al., 2005; WHITE; CHEN, 2007; ZHONG et al., 2007; TALHINHAS et al., 2008). Com o estabelecimento da metodologia de agrotransformação para *G. citricarpa*, futuros experimentos para esse fim podem ser realizados de forma eficiente.

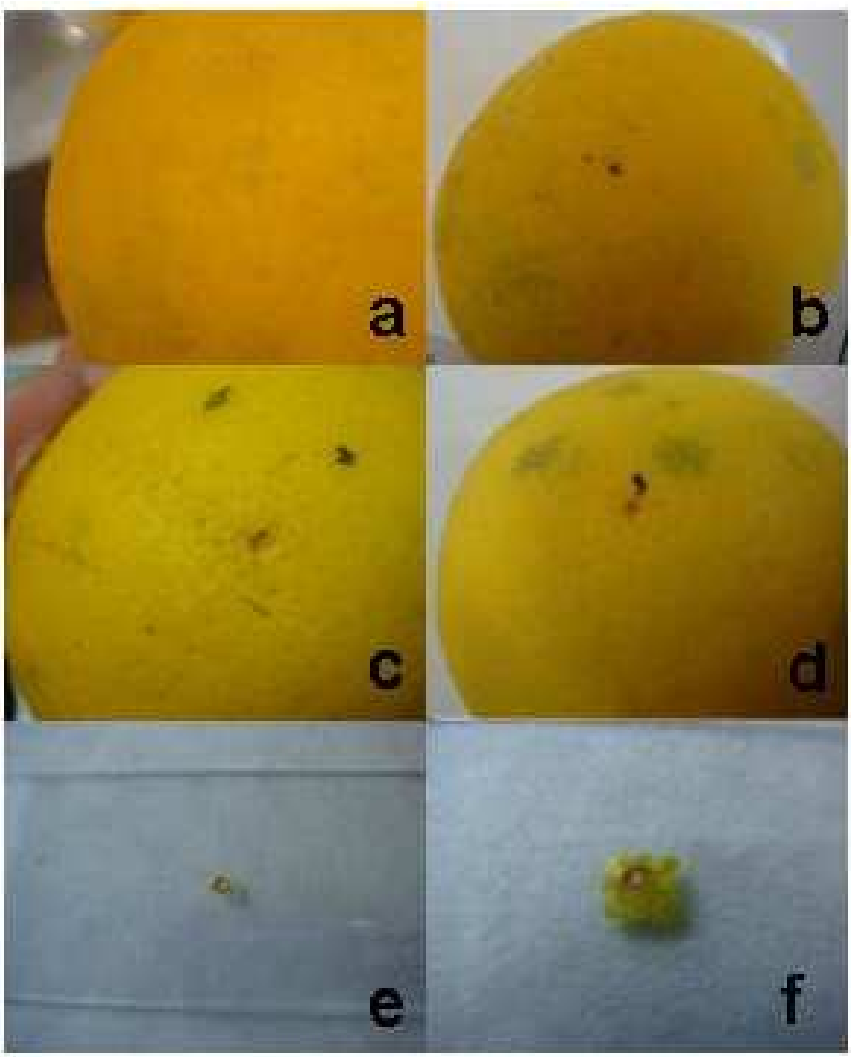

Figura 10 – Bioensaio de patogenicidade mostrando a capacidade dos transfromantes de *G. citricarpa* em produzir sintomas típicos da doença MPC. Laranjas inoculadas com *G. citricarpa*. **a**: Controle negativo, só ferimento na casca; **b**: Controle negativo, ferimento inoculado com esporos da espécie endofítica *G. mangiferae*, nota-se que não há desenvolvimento de sintoma característico, conforme esperado; **c**: Controle positivo, ferimento inoculado com esporos da espécie patogênica *G. citricarpa*, se observa a formação do sintoma característico da doença MPC; **d**: Sintoma característico da doença, causado pela inoculação de esporos de transformantes de *G. citricarpa*; **e**-**f**: Sintoma característico da doença, causado pela inoculação de esporos de transformantes de *G. citricarpa*. Cortes sob lâmina esterilizada, para observação em microscopia óptica de epifluorescência (MOF)

2.3.4.2 Sintomas do bioensaio analisados sob MOF

Com base no bioensaio realizado, foram realizados cortes nos sintomas clássicos de MPC para observação sob MOF, uma vez que os transformantes possuem o gene *gfp* inseridos, permitindo o monitoramento do comportamento destes na colonização das células de casca de laranja.

De maneira geral, os resultados (**Figura 11**) mostraram que esse fungo coloniza intensamente a superfície da casca de laranja, formando uma densa massa micelial em torno das células epidérmicas. Além disso, a análise de cortes transversais também revelou que *G. citricarpa* é capaz de penetrar o tecido hospedeiro e colonizar o espaço intercelular das primeiras camadas da epiderme da casca do fruto.

A observação do material foi realizada utilizando-se dois filtros, FITC (459-490 nm) e Rodamina (546 nm), pois o fungo só emite fluorescência sob filtro FITC, assim é possível distinguir claramente a real fluorescência do fungo em imagens sobrepostas, sem o risco de afirmar nenhum falso resultado. Como controles, foram utilizados frutos com sintomas resultantes da inoculação do isolado selvagem 12P de *G. citricarpa* (**Figrua 11a-c**). Nota-se que o material vegetal emite certa fluorescência natural, principalmente revelada com o uso do filtro Rodamina (**Figura 11c**), mas ao se comparar com a fluorescência dos transformantes, percebe-se diferença de intensidade. O controle negativo foi a análise de lâminas contendo cortes de frutos apenas com o ferimento, evitando que haja qualquer confusão nas imagens ao comparar a fluorescência do tecido da casca, que pode produzir substâncias como óleos (limoleno) e interferirem nos resultados. Ao observar as imagens, fica claro que essa fluorescência não influenciou os resultados (**Figura 11d-f**). A massa micelial dos transformantes emite uma intensa fluorescência verde (**Figura 11h;i**), permitindo a observação da colonização do fungo por toda a superfície do tecido vegetal. Verifica-se que o fungo coloniza primeiramente os espaços intercelulares do tecido vegetal (**Figura 11j**). Interessantemente, o comportamento do fungo parece começar a emitir algum órgão de penetração, em estágio inicial, a fim de penetrar na célula (**Figura 11k**). Nas primeiras camadas do tecido da casca, nas bordas do sintoma, observa-se a massa de micélio formada, nos diferentes tipos de filtro, evidenciando na sobreposição destes, a fluorescência do fungo transgênico (**Figura 11m-o**).

Esses resultados reforçam a utilidade da GFP como repórter no estudo da interação planta-patógeno, auxiliando nos estudos desses fungos, desvendando comportamentos e fornecendo informações para tentar elucidar os mecanismos de infecção adotados por eles, visando diminuir doenças fúngicas importantes em culturas de interesse econômico para o país e para o mundo, em especial, a MPC.

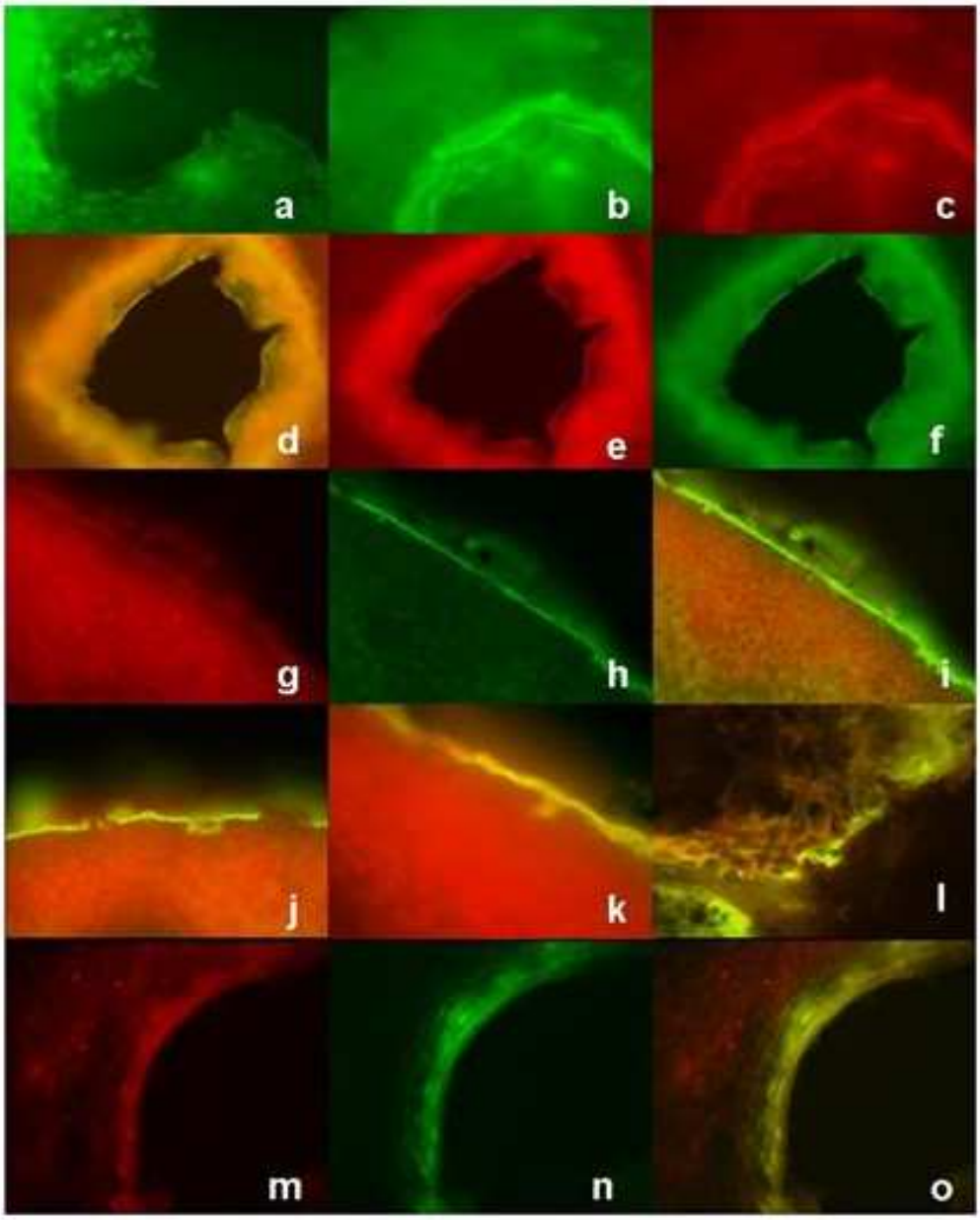

Figura 11 – Imagens dos sintomas de MPC sob MOF. Os sintomas avaliados provém dos frutos utilizados no ensaio de patogenicidade. **a-c**: Controle negativo, lesão causada pelo isolado selvagem 12 P de *G. citricarpa*. Nota-se que não há fluorescência emitida sob o filtro FITC (**a,b**), apenas uma leve fluorescência vinda do tecido vegetal, captada sob filtro Rodamina (**c)** (100X); **d-f**: Controle negativo, casca do fruto com ferimento, sem a infecção por transformantes de *G. citricarpa*. Observa-se que não há fluorescência sendo emitida, mesmo com a sobreposição dos filtros (**d**) FITC (**f**) e Rodamina (**e**) (100X); **g-i**: Constata-se a massa micelial de um transformante de *G. citricarpa* crescendo por toda a superfície do tecido vegetal, emitindo intensa fluorescência (200X); **j**: Colonização inicial dos espaços intercelulares do tecido vegetal (200X); **k**: Nota-se a formação de algum órgão de penetração celular, como haustório ou apressório (200X); **l**: Detalhe das células vegetais sendo envolvidas pela massa micelial dos fungos transgênicos (100X); **m-o**: Detalhe do ferimento e colonização das primeiras camadas de células vegetais (100X)

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram obtidos resultdos inéditos. Primeiramente, a caracterização fisiológica de isolados endofíticos e patogênicos de *Guignardia* sp. em que foram apresentados os perfis de secreção de enzimas hidrolíticas dos mesmos e, ao compará-los, observa-se padrões distintos entre essas duas espécies e, ainda, confirmam a diferença na produção da enzima endopoligalacturonase anteriormente observada em outro estudo.

A descrição da sequência parcial do gene da endopoligalacturonase em espécies de *Guignardia* sp. também é um resultado exclusivo, abrindo caminho para maiores investigações sobre o envolvimento desse gene no processo de patogenicidade de *G. citricarpa*. Além disso, a observação combinada desses dois experimentos sugere que os diferentes níveis de expressão do gene da endopoligalacturonase podem determinar o comportamento endofítico ou patogênico de *Guignardia* sp.

O presente estudo descreve pela primeira vez a transformação genética de micélio de *G. citricarpa* mediada por *Agrobacterium tumefaciens.* O uso dessa metodologia rendeu a obtenção de transformantes resistentes à higromicina B e expressando a proteína GFP, o que permitiu os estudos de monitoramento do comportamento do fungo, bem como a colonização de frutos de Citros. Assim, os resultados forneceram informações básicas sobre a interação de *G. citricarpa* e Citros sp. A observação dos sintomas de MPC na casca de frutos de laranja causados pela inoculação de transformantes de *G. citricarpa* permitiu a visualização de uma densa massa micelial envolvendo principalmente os espaços intercelulares das primeiras camadas de células epidérmicas do tecido vegetal.

Essas informações contribuem para a compreensão do possível papel da endopoligalacturonase nos processos de patogenicidade do fungo *G. citricarpa.* Além disso, o estabelecimento do sistema de agrotransformação pode ser utilizado como ferramenta para estudos de mutagênese insercional visando a identificação de genes envolvidos na interação planta-patógeno, em particular, os relacionados à patogenicidade.

REFERÊNCIAS

ABECITRUS – Associação Brasileira dos Exportadores de Citros. Série histórica de exportação de suco de laranja. Disponível em : <http:// www.abecitrus.com.br>. Acesso em: 31 maio 2007.

ABEL-BIRKHOLD, P.; WALTON, J. D. Cloning, disruption and expression of two endo-b1,4-xylanase genes, *XYL2* and *XYL3* from *Cochliobolus carbonum.* **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 4129–4135, 1996.

ABELLO, J.; KELEMU, S.; GARCIA, C. *Agrobacterium*-mediated transformation of the endophytic fungus *Acremonium implicatum* associated with *Brachiaria* grasses. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, p.407-413, 2008.

ABUODEH, R.O.; ORBACH, M.J.; MANDEL, M.A.; DAS, A; GALGIANI, J. N. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. **The Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 181, p. 2106–2110, 2000.

ADASKAVEG, J.; KORSTEN, L.; AGOSTINI, J.P.; LEVY, L.; BULLUCK, R.; MILES, A.; CARROLL, G.; PALM, M.; DEWDNEY, M.; PERES, N.; EL-LISSY, O.; SCHUBERT, T.; GOTTWALD, T.; SEAVER, D.; HENDERSON, M.; SPÓSITO, M.B.; HOLLINGSWORTH, C.; TIMMER, P.; HORNBY, P.; ZELLER, K.; HORNYAK, M. *Guignardia citricarpa* (Citrus Black Spot, CBS) technical working group final report. **United States Department of Agriculture (USDA), Animal Plant Health Inspection Service (APHIS), Plant Protection and Quarantine (PPQ), Center for Plant Health Science and Technology (CPHST),** Washington, 2 jun., 2010.

AGRIOS, G.N. (Plant disease caused by fungi. **Plant Pathology**, London, p. 245-406, 1997.

AGUILAR-VILDOSO, C.I., RIBEIRO, J.G.B., FEICHTENBERGER, E., GOES, A., SPÓSITO, M.B. **Manual técnico de procedimentos da Mancha Preta dos Citros**. Brasília: MAPA/DAS/DDIV, 2002. 72p.

ALCOBA, N.J.; VIGIANI, A.R.; BEJARANO, N.V.; ALVAREZ, S.E.; SERRANO, M.A.; BONILLO, M. C. **Mancha negra de los citricos.** Epidemiologia y control. San Salvador de Jujuy: Ediciones Universidad Nacional de Jujuy, 2000. 56p.

ALCOCER, M.J.; FURNISS, C.S.; KROON, P.A.; CAMPBELL, M.; ARCHER, D.B. Comparison of modular and non-modular xylanases as carrier proteins for the efficient secretion of heterologous proteins from Penicillium funiculosum. **Applied Microbiological Biotechnology**, Washington, v. 60, p. 726–732, 2003.

AMEY, R.C.; ATHEY-POLLARD, A.; BURNS, C.; MILLS, P.R.; BAILEY, A.; FOSTER, G. D. PEG-mediated and *Agrobacterium*-mediated transformation in the mycopathogen *Verticillium fungicola*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 4–11, 2002.

ANDRÉ-LEROUX, G.; TESSIER, D.; BONNIN, E. Action pattern of *Fusarium moniliforme* endopolygalacturonase towards pectin fragments: comprehension and prediction. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics,** Amsterdam, v. 1749**,** p. 53-64, 2005.

ANNIS, S.L.; GOODWIN, P.H. Recent advances in the molecular genetics of plant cell walldegrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology,** Dordrecht, v. 103**,** p. 1-14, 1997.

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR. W.; AGUILAR-VILDOSO C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.

ARO N.; PAKULA, T.; PENTTILA M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 719–739, 2005.

AVERNA-SACCÁ, R. Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas pelo *Phoma citricarpa*. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 15, n. 11, p. 668-674, 1940.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S.K. (Ed.). **Fungi**: multifaceted microbes, Boca Raton: CRC Press, cap. 6, p. 189-207, 2007.

BAAYEN, R.P.; BONANTS, P.J.M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G.C.; VAN DER Aa, H.A.; WEERDT, M. de; BROUWERSHAVEN, I.R. van; SCHUTTLE, G.C.; MACCHERONI JR, W.; GLIENKE-BLANCO, C.; AZEVEDO, J.L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, Washington, v. 92, p. 464-477, 2002.

BAKER, R.E.D. Studies in the pathogenicity of tropical fungi. II. The ocorrence of latent infections indeveloping fruits. **Annals of Botany**, Oxford, v. 2, p. 919-931, 1938.

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.

BALZERGUE, S.; DUBREUCQ, B.; CHAUVIN, S.; Le CLAINCHE, I.; Le BOULAIRE, F.; de ROSE, R.; SAMSON, F.; BIAUDET, V.; LECHARNY, A.; CRUAUD, C.; WEISSENBACH, J.; CABOCHE, M.; LEPINIEC, L. Improved PCR-walking for large-scale isolation of plant T-DNA borders. **Biotechniques**, New York, v. 30, p. 496-498, 2001.

BARBIERI, R.;CARVALHO, I.F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Agrociência,** Pelotas, v. 7, p. 79-83, 2001.

BARRERA-FIGUEROA, B. E.; HIDALGO-LARA, M. E.; REYES-MÁRQUEZ, B. E.; BETTS, M. F.; TUCKER, S. L.; GALADIMA, N.; MENG, Y.; PATEL, G.; LI, L.; DONOFRIO, N.; FLOYD, A.; NOLIN, S.; BROWN, D.; MANDEL, M. A.; MITCHELL, T. K.; XU, J. R.; DEAN, R. A.; FARMAN, M. L.; ORBACH, M. J. Development of a high throughput transformation system for insertional mutagenesis in *Magnaporthe oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 1035–1049, 2007.

BETTS, M.F.; TUCKER, S.L.; GALADIMA, N.; MENG, Y.; PATEL, G.; LI, L.; DONOFRIO, N.; FLOYD, A.; NOLIN, S.; BROWN, D.; MANDEL, M.A.; MITCHELL, T. K.; XU, J. R.; DEAN, R.A.; FARMAN, M.L.; ORBACH, M.J. Development of a high throughput transformation system for insertional mutagenesis in *Magnaporthe oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 1035–1049, 2007.

BISSET, J.; PALM, M.E. Species of *Phyllosticta* on conifers. **Canadian Journal of Botany**, Guelph, v. 67, p. 3378-3385, 1989.

BLAISE, F.; REMY, E.; MEYER, M.; ZHOU, L.; NARCY, J. P.; ROUX, J.; BALESDENT, M. H.; ROUXEL, T. A critical assessment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for pathogenicity gene discovery in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 123-138, 2007.

BONANTS, P.J.M.; CARROLL, G.C.; WEERDT, M.; BROUWERSHAVEN, I.R. van; 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.

BRASILEIRO, A. C. M. Cultivo e conservação de *Agrobacterium*. **Manual de Transformação Genética de Plantas.** Brasília: EMBRAPA, 1998. cap. 4 p. 65-74.

BRASILEIRO, A.C.M. ;LACORTE, C. Interação *Agrobacterium*-hospedeiro. **Manual de Transformação Genética de Plantas.** Brasília: EMBRAPA, 1998.cap. 5: p. 75-92.

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

CALAVAN, E.C. Black Spot of Citrus. **The California Citograph**, California, v. 46, p. 22-24, 1960.

CAMPOY, S.; PEREZ, F.; MARTIN, J. F.; GUTIERREZ, S.; LIRAS, P. Stable transformants of the azophilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Current Genetics**, Berlin, v. 43, p. 447–452, 2003.

CARDOSO FILHO, J.A. **Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) e dos indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-s-metil e *Saccharomyces cereviseae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (Teleomorfo: *Guignardia citricarpa*)**. 2003. 125p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CARROLL, G.; PETRINI, O. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. **Mycologia**, New York, v. 75, p. 53–63, 1981.

CARROLL, G.C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to a mutualistic symbiont. **Ecology**, Brooklyn, v. 69, p. 2-9, 1988.

CARROLL, G.C.; CARROLL, F. Studies on the incidence of conifereous endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 5, p. 3034-3043, 1978.

CATANZARITI, A.M.; DODDS, P. N.; ELLIS, J.G. Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 269, n. 2, p. 181-188, 2007.

CHENG, C.; TSUKAGOSHI, N.; UDAKA, S. Nucleotide sequence of the cellobiohydrolase gene from *Trichoderma viride*. **Nucleic Acids Research,** Oxford, v. 18, p. 5559, 1990.

CHOU, D.K.; JUNGALWALA, F.B. N-Acetylglucosaminyl transferase regulates the expression of the sulfoglucuronyl glycolipids in specific cell types in cerebellum during development. **Journal of Biological Chemsitry**, New York, v. 271, n. 46, 1996.

CHUNG, K.-R.; PERES, N.A.; TIMMER, L.W. Citrus Diseases Exotic to Florida: Black Spot. University of Florida. **IFAS Plant Pathology,** Florida, p. 213, 2009.

CITOVSKY, V.; KOZLOVSKY, S, V.; LACROIX, B.; ZALTSMAN, A.; DAFNY-YELIN, M.; VYAS, S.; TOVKACH, A.; TZFIRA, T. Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 9–20, 2007.

COMBIER, J.P.; MELAYAH, D.; RAFFIER, C.; GAY, G.; MARMEISSE, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 220, p. 141-148, 2003.

COSTA, H.; VENTURA, J.A.; ARLEU, R.J.; AGUILAR-VILDOSO, C.I. Ocorrência da pinta preta (*Guiganardia citrica*rpa) em citros no estado do Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 205, 2003. Suplemento.

COTTAGE, A.; YANG, A.; MAUNDERS, H.; de LACY, R. C.; RAMSAY, N. A. Identification of DNA sequences flanking T-DNA insertions by PCR walking. **Plant Molecular Biology Reporter**, Arizona, v. 19, p. 321-327, 2001.

COVERT, S.F.; VAN DEN WYMELENBERG, A.; CULLEN, D. Structure, organization, and transcription of a cellobiohydrolase gene cluster from *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology,** Oxford, v. 58, p. 2168–2175, 1992.

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

CROUS, P.W.; WINGFIELD, M.J.; FERREIRA, F.A.; ALFENAS, A. *Mycosphaerella parkii* and *Phyllosticta eucaliptorum*, two new species from eucalyptus leaves in Brazil. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, p. 582-584, 1993.

DI PIETRO, A.; RONCERO, M.I.G. Cloning, expression, and role in pathogenicity of *pg1*

DUARTE, R.T.D.; STAATS, C.C.; FUNGARO, M.H.P.; SCHRANK, A.; VAINSTEN, M.H.; FURLANETO-MAIA, L.; NAKAMURA, C.V.; SOUZA, W.; FURLANETO, M.C. Development of a simple and rapid *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 44, p. 248-254, 2007.

EADY, C.C.; LISTER, C.E.; SUO, Y.; SCHAPER, D. Transient expression of uidA constructs in *in vitro* onion (*Allium cepa* L.) cultures following particle bombardment and *Agrobacterium*mediated DNA delivery. **Plant Cell Reports**, New York, v. 15, p. 958-962, 1996.

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. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 253, p. 67–74, 2005.

EMAMI, K.; HACK, E. Conservation of XYN11A and XYN11B xylanase genes in *Bipolaris sorghicola*, *Cochliobolus sativus*, *Cochliobolus heterostrophus*, and *Cochliobolus spicifer*. **Current Microbiology,**, New York, v. 45, p. 303–306, 2002.

ERMLER, U.; GRABARSE, W.; SHIMA, S.; GOUBEAUD, M.; THAUER, R.K. Crystal Structure of Methyl-Coenzyme M Reductase: The Key Enzyme of Biological Methane Formation. **Science**, Washington, v. 278, n. 5342, p. 1457-1462, 1997.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. Fungicide resistance: definitions and use of terms. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin**, Paris, v. 18, n. 4, p. 569-571, 1988.

EVERETT ,K.R.; REES-GEORGE, J. Reclassification of an isolate of *Guignardia citricarpa* from New Zealand as *Guignardia mangiferae* by sequence analysis. **Plant Pathology,** Dordrecht, v. 55, p. 194-199, 2006.

FAGAN, C.; GÓES, A. Efeito da mancha de frutos cítricos causada por *Guignardia citricarpa* nas características tecnológicas do suco de frutos de laranjeira 'Natal' e 'Valência'. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 26, n. 1, p. 122, 2000.

FÁVARO, L.C.L. **Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana-de-açúcar(*Saccharum officinarum*, L.)**. 2009. 219p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FAWCETT, H.S. **Citrus disease and control**. New York: McGraw Hill Book, 1936. 656p.

FEICHTENBERGER, E. Mancha preta dos Citros no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, n. 1, p. 93-108, 1996.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G.W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. 3rd.Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, São Paulo, v. 2:, cap. 25, p. 261-296, 1997.

FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M.B. Doenças fúngicas dos citros: manejo integrado. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 2, p. 44-47, 2004.

FERNÁNDEZ-ÁBALOS, J.M.; FOX, H.; PITT, C.; WELLS, B.; DOONAN, J. H. Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 27, p. 121–130, 1998.

FITZGERALD, A.M.; MUDGE, A.M.; GLEAVE, A.P.; PLUMMER, K.M. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 803–810, 2003.

FLOWERS, J. L.; VAILLANCOURT, L. J. Parameters affecting the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Colletotrichum graminicola*. **Current Genetics**, Berlin, v. 48, p. 380–388, 2005.

FNP-CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2003**: anuário de agricultura brasileira. São Paulo, 2003. 545p.

FRÖHLICH, J.; HYDE, K.D. Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic? **Biodiversity and Conservation**, London, v. 8, p. 977–1004, 1999.

GAMA, G.B.M.N. da; MEDEIROS, J.X. de; PINHEIRO, L.E.L.O cenário da cooperação como fator de desenvolvimento para o sistema agroindustrial citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 21, n. 2, p. 239-258, 2000.

GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, p. 16–37, 2003.

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. 1995. 115p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

GLIENKE-BLANCO,C.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; VIEIRA, M.L.C.; BARROSO, P.A.V.; AZEVEDO, J.L. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 251-255, 2002.

GÓES, A. Controle da mancha preta dos frutos cítricos. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 19, n. 2, p. 305-320, 1998.

GONG, X.; FU, Y.; JIANG, D.; LI, G.; YI, X.; PENG, Y. L-Arginine is essential for conidiation in the filamentous fungus *Coniothyrium minitans.* **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 1368–1379, 2007.

GORFER, M.; KLAUBAUF, S.; BANDIAN, D.; STRAUSS, J. *Cadophora finlandia* and *Phialocephala fortinii*: *Agrobacterium*-mediated transformation and functional GFP expression. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, p. 850–855, 2007.

GOUKA, R. J.; GERK, C.; HOOYKAAS, P. J.; BUNDOCK, P.; MUSTERS, W.; VERRIPS, C. T.; DE GROOT, M. J. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. **Nature Biotechnology**, London, v. 17, p. 598–601, 1999.

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

GÜIMIL, S.; CHANG, H.S.; ZHU, T.; SESMA, A.; OSBOURN, A.; ROUX, C.; IOANNIDIS, V.; OAKELEY, E.J.; DOCQUIER, M.; DESCOMBES, P.; BRIGGS, S.P.; PASZKOWSKI, U. Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA,** Stanford, 102, 8066-8070, 2005.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. G. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycology**, Adelaide, v.67, p.597-607, 1975.

HAWKSWORTH, D.L.; ROSSMAN, A.Y. Where are all the undescribed fungi? **Phytopathology,** Washington, v. 87, p. 888–891, 1997.

HUERTAS-GONZÁLEZ, M.D.; RUIZ-ROLDAN, M.C.; GARCIA MACEIRA, F.I.; RONCERO, M.I.; DI PIETRO, A. Cloning and characterization of *pl1* encoding an *in planta*-secreted pectate lyase of *Fusarium oxysporum*. **Current Genetics**, Berlin, v. 35, p. 36-40, 1999.

IDNURM, A.; HOWLETT, B.J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. **Molecular Pant Pthology,** Oxford, v. 4, p. 241–255, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola.** Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa01200504.shtm. Acesso em: 14 jun. 2010.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Os números da citricultura**. São Paulo: Secretaria da Agricultura e Abastecimento, São Paulo, 1997. 28p.

ISSHIKI, A.; AKIMITSU, K.; YAMAMOTO, M.; YAMAMOTO, H. Endopolygalacturonase is esencial for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata.* **Molecular Plant-Microbe Interact ,** Saint Paul, v.14, p. 749-757, 2001.

JEON, J.; PARK, S.-Y.; CHI, M.-H.; CHOI, J.; PARK, J.; RHO, H.-S.; KIM, S.; GOH, J. Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. **Nature Genetics**, London, v. 39, p. 561-565, 2007.

JONES, T.M.; ANDERSON, A.J.; ALBERSHEIM, P. Hostpathogen interactions IV. Studies on the polysaccharide degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici.* **Physiological Plant Pathology,** New York, v. 2, p. 153-166, 1972.

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

KAHMANN, R.; BASSE, C. Fungal gene expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 4, p. 374-380, 2001.

KHANG, C. H.; PARK, S.-Y.; LEE, Y.-H.; KANG, S. A dual selection based, targeted gene replacement tool for *Magnaporthe grisea* and *Fusarium oxysporum.* **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 483–492, 2005.

KAVA-CORDEIRO, V.; NISHIMURA, R.C.; MARIUSSI, R.C.; MONTENEGRO, D.H.; STRINGARI, D.; FABRIS, J.; SILVANO, C.; GALLI-TERASAWA, L.V.; GLIENKE, C.; AZEVEDO, J.L. Ocorrência de RNA dupla fita em *Guignardia citricarpa* e *G. mangiferae:* relações com a patogenicidade e especificidade com o hospedeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008. , Salvador. **Resumos...** Salvador, 2008. 16 19 set 2008 p. 35.

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 Linneage Society,** Sidney, v. 73, p. 249-292, 1948.

KIMURA, T.; ITO, J.; KAWANO, A.; MAKINO, T.; KONDO, H.; KARITA, S.; SAKKA, K.; OHMIYA, K. Purification, characterization, and molecular cloning of acidophilic xylanase from *Penicillium* sp.40. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Japão, v. 64, 1230–1237, 2000.

KNOGGE, W. Fungal infection of plants. **The Plant Cell,** Stanford, v. 8, p. 1711-1722, 1996.

KOGEL, K.H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite--what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, p. 358-363, 2006.

KOLATTUKUDY, P.E.; ROGERS, L.M.; LI, D.; HWANG, C.S.; FLAISHMAN, M.A. Surface signaling in pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Stanford, v. 92, p. 4080-4087, 1995.

KUNIK, T.; TZAFIRA, T.; KAPULNIK, Y.; GAFNI, Y.; DINGWALL, C.; CITOVISKY, V. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Stanford, v. 98, p. 1871-1876, 2001.

LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A.C.M; CARNEIRO, V.T. (Org.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/EMBRAPA, 1998, p. 93-109.

LACROIX, B.; TZFIRA, T.; VAINSTEIN, A.; CITOVSKY, V. A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 22, p. 29-37, 2006.

LAMPREIA, J.; FAUQUE, G.; SPEICH, N.; DAHL, C.; MOURA, I.; TRÜPER, H.G.; MOURA, J.J. Spectroscopic studies on APS reductase isolated from the hyperthermophilic sulfate-reducing archaebacterium *Archaeglobus fulgidus*. **Biochemichal Biophysical Research Community,** New York, v.181, p. 342-7, 1991.

LEAL, C.V.; MONTES, B.A.; MESA, A.C.; RUA, A.L.; CORREDOR, M.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, Philadelphia, v. 42, p. 391-395, 2004.

LECLERQUE, A.; WAN, H.; ABSCHUTZ, A.; CHEN, S.; MITINA, G.V.; ZIMMERMANN, G.; SCHAIRER, H.U. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Current Genetics**, Berlin, v. 45, p. 111–119, 2004.

LEUCHTMANN, A.; PETRINI, O.; PETRINI, L.E.; CARROLL, G.C. Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta species*. **Mycological research**, Ottawa,, p. 287-295, 1992.

LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science,** Washington, v. 257, p. 967-971, 1992.

LIU, Y.-G.; WHITTIER, R.F. Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. **Genomics**, Orlando, v. 25, p. 674-681, 1995.

LORANG, J.M.; TUORI, R.P.; MARTINEZ, J.P.; SAWYER, T.L.; REDMAN, R.S.; ROLLINS, J.A.; WOLPERT, T.J.; JOHNSON, K.B.; RODRIGUEZ, R.J.; DICKMAN, M. B.; CIUFFETTI, L.M. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 1987-1994, 2001.

LORENZ, M.C. Genomic approaches to fungal pathogenicity. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, p. 372-378, 2002.

LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, E.H.C.; HYDE, K. Enzymatic activity of endophytic fungi of six native seedling species from Doi Suthep-Pui Nathional Park, Thailand. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 1109–1112, 2002.

MALONEK, S.; MEINHARDT, F. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete *Calonectria morganii*. **Current Genetics**, Berlin, v. 40, p. 152–155, 2001.

MARTINO, E.; MURAT, C.; VALLINO, M.; BENA, A.; PEROTTO, S.; SPANU, P. Imaging mycorrhizal fungal transformants that express EGFP during ericoid endosymbiosis. **Current Genetics**, Berlin, v. 52, p. 65-75, 2007.

MARUTHACHALAM, K.; NAIR, V.; RHO, H.-S.; CHOI, J.; KIM, S.; LEE, Y.-H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Colletotrichum falcatum* and *C. acutatum*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 18, p. 234–241, 2008.

MATA, M.M.; TANIWAKI, M.H.; IAMANAKA, B.T.; SARTORI, D.; OLIVEIRA, A.L.; FURLANETO, M.C.; FUNGARO, M.H. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, p. 148-151, 2007.

MARTINO, E.; MURAT, C.; VALLINO, M.; BENA, A.; PEROTTO, S.; SPANU, P. Imaging mycorrhizal fungal transformants that express EGFP during ericoid endosymbiosis. **Current Genetics**, Berlin, v. 52, p. 65-75, 2007.

McCLELLAND, C.M.; CHANG, Y.C.; KWON-CHUNG, K.J. High frequency transformation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by *Agrobacterium tumefaciens*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p.904-913, 2005.

McONIE, K.C. Orchard development and discharge of ascospores of *Guignardia citr*icarpa and the onset of infection in relation to the control of citrus black spot. **Phytopathology**, Washington, v. 54, n. 12, p. 1448-1453, 1964.

McONIE, K.C. Germination and infection of citrus by ascospores of *Guignardia citricarpa* in relation to the control of black spot. **Phytopathology**, Washington, v. 57, p. 743-746, 1967.

MENDES, R. **Diversidade e caracterização genética de comunidades microbianas endofíticas associadas à cana-de-açúcar**. 2008. 119p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. (Org.). **Micologia:** avanços no conhecimento. Recife: UFPE, 2007. p. 129-140.

MENDGEN, K.; DEISING, H. Infection structures of fungal plant pathogens - a cytological and physiological evaluation. **New Phytologist**, New York, v. 124, p. 193-213, 1993.

MEYER, L.; SANDERS, R.; JACOBS, R.; KORSTEN, L. A one-day sensitive method to detect and distinguish between the citrus black spot pathogen *Guignardia citricarpa* and the endophyte *Guignardia mangiferae*. **Plant Disease**, Saint Paulo, v. 90, n. 1, p. 97-101, 2006.

MICHIELSE, C; HOOYKAAS, P.; VAN DEN HONDEL, C.; RAM, A. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Current Genetics**, Berlin, v. 48, p. 1–17, 2005.

MIKKELSEN, L.; SARROCCO, S.; LÜBECK, M.; JENSEN, D. F. Expression of the red fluorescent protein DsRed-Express in filamentous ascomycete fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 223, p. 135-139, 2003.

MIKOSCH, T.S.; LAVRIJSSEN, B.; SONNENBERG, A.S.; GRIENSVEN, L.J van Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. **Current Genetics**, Berlin, v. 39, p. 35–39, 2001.

MORIOKA, L.R.I.; FURLANETO, M.C.; BOGAS, A.C.; POMPERMAYER, P.; DUARTE, R.T.D.; VIEIRA, M.L.C.; WATANABE, M.A.E.;FUNGARO, M.H.P. Efficient genetic transformation system for the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. **Current Microbiology**, New York, v. 52, p. 469–472, 2006.

MULLINS, E.D.; KANG, S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 58, p. 2043–2052, 2001.

MURPHY, J.M. ;WALTON, J.D. Three extracellular proteases from *Cochliobolus carbonum:* cloning and targeted disruption of *ALP1***.** **Molecular Plant-Microbe Interactions,** Saint Paul, v. 9, p**.** 290–297, 1996.

NAKAYASHIKI, H.; NGUYEN, Q.B. RNA interference: roles in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.11, p. 494-502, 2008.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 15 jun. 2010.

NICHOLSON R.L.; EPSTEIN, L. Adhesion of fungi to the plant surface: prerequisite for pathogenesis. In COLE, G.T.; HOCH, H.C..(Ed.). **The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals**. New York: Plenum Press. 1991. p. 3–23.

OESER, B.; HAIDRICH, P.M.; MÜLLER, U.; TUDZYNSKI, P.; TENBERGE, K.B. Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea/*rye interaction. **Fungal Genetics and Biology,** New York, v. 36, p. 176-186, 2020.

OLIVEIRA, M.B.; NASCIMENTO, L.B.; LOBO JÚNIOR, M.; PETROFEZA, S. PGIPs são diferencialmente expressos em feijoeiro durante a infecção de *Sclerotinia sclerotiorum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008 Salvador. **Resumos...** Salvador, 2008. p. 56.

PANZENHAGEN, N.V.; KOLLER, O.C.; VAQUIL, P.D.; SOUZA, P.V.D; DAL SOGLIO, F.K. Aspectos técnico-ambientais da produção orgânica na região citrícola do Vale do Rio Caí, RS. **Ciênica Rural**, Santa Maria,, v.38, n.1, p. 90-95, 2008.

PASCHOLATI, S.F.; DEISING, H.; LEITE, B.; ANDERSON, D.; NICHOLSON, R.L. Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Physiology Molecular Plant Pathology***.,* New York, v. 42, p. 37–51, 1993.

PAUL, I.; JAARSVELD, A.S. van; KORSTEN, L.; HATTINGH, V. The potential global geographical distribution of Citrus Black Spot caused by *Guignardia citricarpa* (Kiely): likelihood of disease establishment in the European Union. **Crop Protection**, Guildford, v. 24, p. 297-308, 2005.

PERES, N.A.; HARAKAVA, R.; CARROLL, G.C.; ADASKAVEG, J.E.; TIMMER, L.W. Comparison of Molecular Procedures for Detection and Identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 5, p. 525-531, 2007.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. (Ed.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York:Spring-Verlag, 1991. p. 179–197.

POINTING, S. B. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 2, p. 17-33, 1999.

PONS, N. Estudio taxonomico de especies de *Phoma* y *Phyllosticta* sobre caña de azucar (*Saccharum* sp). **Fitopatologia Venezoela**, Maracay, v. 48, p. 367-372, 1990.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MCDONALD, K.D.; BUFTON, A. W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, New York, v. 5, p. 141–238, 1953.

PUNITHALINGAM, E.; WOODHAMS, J.E. The conidial appendage in *Phyllosticta* spp. **Nova Hedwigia**, Sttutgard, v. 36, p. 151-175, 1982.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 17–20, 1985.

RAGUZ, S.; YAGUE, E.; WOOD, D.A.; THURSTON, C.F. Isolation and characterization of a cellulose-growth-specific gene from *Agaricus bisporus*. **Gene,** Amsterdam, v**.** 119, p. 183–190, 1992.

REIS, M.C.; FUNGARO, M.H.P.; DUARTE, R.T.D.; FURLANETO, L.; FURLANETO, M. C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, p. 197-202, 2004.

REXOVÁ-BENKOVÁ, L.; MARKOVIC. Pectic enzymes. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry,** Washington, v. 33, p. 323-385, 1976.

RHO, H.S.; KANG, S.; LEE, Y.H. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the plant pathogenic fungus*, Magnaporthe grisea*. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 12, p. 407–411, 2001.

RIDOUT, C.J.; SKAMNIOTI, P.; PORRITT, O.; SACRISTAN, S.; JONES, J.D.G.; BROWN, J.K.M. Multiple avirulence paralogues in cereal powdery mildew fungi may contribute to parasite fitness and defeat of plant resistance. **Plant Cell,** Baltimore, v. 18, p. 2402-2414, 2006.

ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A.M. **A mancha preta dos frutos: um dos fatores limitantes à produção citrícola do Estado do Rio de Janeiro**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1995. n. 19, p. 1-5.

RODRIGUES, K.F.; SIEBER, T.N.; GRÜNIG, C.R.; HOLDENRIEDER, O. Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR-PCR amplifications and ITS1-5.8S-ITS2 sequences. **Mycological research**, Cambridge, v. 108, p. 45-52, 2004.

RODRIGUES, M.B.C. **Controle de *Guignardia citricarpa,* agente causal da Mancha Preta dos Citros.** 2006. 67p. Dissertação (Mestrado emGenética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

RODRIGUES, M.B.C.; SPÓSITO, M.B.; AGUILAR-VILDOSO, C.I; ANDREOTE, F.D.; ARAÚJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Resistência a Benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta dos Citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, n.3, v.42, p.323-327, 2007.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R.; KIM, Y.O. Conferring stress tolerance and yield enhancement to crops via symbiosis as a strategy for diminishing regulatory processes. **Entomological Research**, Seoul, v. 37, p. A73, 2007.

RODRÍGUEZ-TOVAR, A. V.; RUIZ-MEDRAN, R.; HERRERA-MARTÍNEZ, A.; BARRERA-FIGUERO, B. E.; HIDALGO-LARA, M. E.; REYES-MÁRQUEZ, B. E.; CABRERA-PONCE, J. L.; VALDÉS, M.; XOCONOSTLE-CÁZARESA, B. Stable genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 63, p. 45– 54, 2005.

ROGERS, C.W.; CHALLEN, M.P.; GREEN, J.R.; WHIPPS, J.M. Use of REMI and *Agrobacterium*-mediated transformation to identify pathogenicity mutants of the biocontrol fungus, *Coniothyrium minitans*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 241, p. 207–214, 2004.

ROGERS, L.M.; KIM, Y.K.; GUO, W.; GONZALEZ-CANDELAS, L.; LI, D.; KOLATTUKUDY, P.E. Requirement for either a host-or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca.* **Proceedings of the National Academy of Sciences USA ,** Stanford, v. 97, p. 9813-9818, 2000.

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

ROMÃO, A.S. **Análise da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar e estudo da interação *Trichoderma virens* – planta hospedeira.** 2010. 270p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

ROMÃO, A.S.; MENDES, R.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Análise da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar geneticamente modificada. In: REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 25, 2006. São Pedro. **Resumos...** Piracicaba: Esalq, 2006. p. 122.

SARTORATO, A. Determinção da variabilidade patogênica do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc.) Scrib. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 7., 2002, Viçosa. **Resumos...** Viçosa, UFV: 2002. p. 114-116.

SAVKA, M.A., BLACK, R.C., BINNS, A.N., FARRAND, S.K. Translocation and exudation of tumor metabolites in crown galled plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 9 , n.4, p. 310-313, 1996.

SCHINOR, E.H.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Colonização de folhas de laranjeira 'Pêra' e variedades afins por *Guignardia citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 5, 2002.

SCHUBERT, T.; SUTTON, JEYAPRAKASH, A. Citrus Black Spot (Guignardia ciatricarpa) discovered in Florida. **Pest Alert**. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Charles H. Bronson, Commissioner of Agriculture, Florida, 5 abr., 2010.

SCHUEPP, H. Untersuchungen uber *Guignardia citricarpa* Kiely, den erreger der scwarsfleckenkrankheit auf citrus. **Phytopathology Z.,** Stuttgard, v. 40, p. 258-271, 1961.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, p. 661-686, 2005.

SELLA, L.; CASTIGLIONI, C.; ROBERTI, S.; D'OVIDIO, R.; FAVARON, F. An endopolygalacturonase (PG) of *Fusarium moniliforme* escaping inhibition by plant polygalacturonaseinhibiting proteins (PGIPs) provides new insights into the PG-PGIP interaction. **FEMS Microbiology Letters,** Amsterdam, v. 240**,** p. 117-124, 2004.

SIVANESAN, A. The bitunicate ascomycetes and their anamorphs. **Journal Cramer**, New York, 1984. 701p.

SMITH, M.C. Passenger Processing: Citrus black spot. *Phyllosticta citricarpa*, intercepted on oranges from Cuba. **USDA-APHIS-PPQ Report of a Significant Agricultural Inspection Incident at Miami Service Port,** Cuba, n. 26, 2006.

SPÓSITO, M.B. **Dinâmica temporal e espacial da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros.** Piracicaba, 2003. 112p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

STAFFORD, H.A. Crown gall disease and *Agrobacterium tumefaciens*: a study of the history, present knowledge, missing information, and impact on molecular genetics. **Botanical Review**, New York, v. 66, p. 101-118, 2000.

St. LEGER, R.J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D.W. Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. **Microbiology**, Readin, v. 143, p. 1983–1992, 1997.

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

SUTTON, B.C.; WATERSON, J.M. **Descriptions of pathgenic fungi and bacteria *Guignardia citricarpa*.** Surrey, England, Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1966.n. 85, 2p.

TAKADA, G.; KAWAGUCHI, T.; SUMITANI, J.-I.; ARAI, M. Cloning, nucleotide sequence, and transcriptional analysis of *Aspergillus aculeatus* nº F-50 cellobiohydrolase I (*cbh1*) gene. **Journal Fermentation Bioengenering,** Seoul, v. 85, p. 1–9, 1998.

TAKASHIMA, S.; NAKAMURA, A.; HIDAKA, M.; MASAKI, H.; UOZUMI, T. Cloning, sequencing, and expression of the cellulase genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Journal of Biotechnology,** Amsterdam, v. 50, p. 137–147, 1996.

TALAMINI, V.; SOUZA, E.A.; POZZA, E.A.; CARRIJO, F.R.F.; ISHIKAWA, F.H.; SILVA, K.J.D.; OLIVEIRA, F.A. Identificação de raças patogênicas de *Colletotrichum lindemuthianum* a partir de isolados provenientes de regiões produtoras de feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 30, n.2, p. 371-375, abr./jun. 2004.

TALHINHAS, P.; MUTHUMEENAKSHI, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H.; SREENIVASAPRASAD, S. *Agrobacterium*-mediated transformation and insertional mutagenesis in *Colletotrichum acutatum* for investigating varied pathogenicity lifestyles. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 39, p. 57–67, 2008.

TANAKA, A.; CHRISTENSEN, M.J.; TAKEMOTO, D.; PARK, P.; SCOTT, B. Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic interaction. **Plant Cell**, Baltimore, v. 18, p. 1052-1066, 2006.

TEMPLETON, M.D., SHARROCK, K.R., BOWEN, J.K., CROWHURST, R.N.; RIKKERINK, E.H. **Gene,** Amsterdam, v. 142, p. 141–146, 1994.

TEN HAVE, A.; MULDER, W.; VISSER, J.; VAN KAN, J.A. The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botryis cinerea.* **Molecular Plant-Microbe Interactions,** Saint Paul, v. 11, p.1009-1016, 1998.

TIMMER, L.W.; GARNSEY, S.M.; GRAHAM, J.H. **Compendium of citrus diseases**. 2nd .ed., St. Paul: APS Press, 2000. 92p.

TZFIRA, T.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 17, p. 147-154, 2006.

VAN ATTIKUM, H.; BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P.J.J. Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration. **EMBO Journal**, London, v. 20, p. 6550-6558, 2001.

VAN DER AA, H.A. Studies in *Phyllosticta* I. **Studies in Mycology**, Stanford, n. 5, 1973.

VAN GENT-PELZER, M.P.E.; VAN BROUWERSHAVEN, I.R.; KOX, L.F.F.; BONANTS, P.J.M. A TaqMan PCR method for routine diagnosis of the quarantine fungus *Guignardia citricarpa* on citurs fruit. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, n. 6, p. 357-363, 2007.

VARMA, A.; VERA, S.; SAHAY, N.; BÜTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica,* a cultivable plant-growth promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2741-2744, 1999.

VIJN, I.; GOVERS, F. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, p. 459–467, 2003.

WAGNER, B.L.; LEWIS, L.C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana.* **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3468–3473, 2000.

WALTON, F.J.; IDNURM, A.; HEITMAN, J. Novel functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 57, p. 1381-1386, 2005.

WALTON, J.D. Desconstruing the Cell Wall. **Plant Physiology**, Stanfrod, v. 104, p. 1113-1118, 1994.

WANG, J.; GUO, L.; ZHANG, K.; WUA, Q.; LIN, J. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Volvariella volvacea*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 8524–8527, 2008.

WEI, X.; ZHU, C.; ZHU, B. An efficient and stable method for the transformation of heterogeneous genes into *Cephalosporium acremonium* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 15, p. 683-688, 2005.

WELD, R.J.; EADY, C.C.; RIDGWAY, H.J. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 202–207, 2006.

WHITE, D.; CHEN, W. Towards identifying pathogenic determinants of the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, p. 3–12, 2007.

WU, S.C.; KAUFFMANN, S.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Purification, cloning and characterization of two xylanases from *Magnaporthe grisea*, the rice blast fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions,** Saint Paul, v. 8, p. 506–514, 1995.

XU, J.R., PENG, Y.L., DICKMAN, M. B., SHARON, A. the dawn of fungal pathogen genomics. **Annual Review of Phytopathology,** Danvers, v. 44, p. 337–66, 2006.

YAKOBY, N.; BENO-MOUALEM, D.; KEEN, D.T.; DINOOR, A.; PINES, O.; PRUSKY, D. *Colletotrichum gloeosporioides pelB*, encoding pectate lyase, is a key gene in fungal–fruit interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions,** Saint Paul, v. 14, p. 988–995, 2001.

YAO, C. ;KOLLER, W. Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: different cutinases are expressed during saprophytic and pathogenic stages of *Alternaria brassicicola*.**Molecular Microbe Interacttions***,* Saint Paul, v. 8, p. 122–130, 1995.

ZEILINGER, S. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. **Current Genetics**, Berlin, v. 45, p. 54–60, 2004

ZHANG, A.; LU, P.; DAHL-ROSHAK, A.M.; PARESS, P.S.; KENNEDY, S.; TKACZ, J.S.; AN, Z. Efficient disruption of a polyketide synthase gene (pks1) required for melanin synthesis through *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glarea lozoyensis*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 268, p. 645–655, 2003.

ZHANG, Y.; LIU, S.; CHE, Y.; LIU, X. Epicoccins A–D, epipolythiodioxopiperazines from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Epicoccum nigrum.* **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 70, p. 1522–1525, 2007.

ZWIERS, L.H.; DE WAARD, M.A. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Current Genetics**, Berlin, v. 39, p. 388–393, 2001.

ANEXOS

ANEXO A

Anexo A. - Genes de fungos fitopatogênicos utilizados para o alinhamento de sequências, incluindo sua expressão durante a infecção e o número de acesso no GenBank

(continua)

GENE	Microrganismo	Classe	Expressão durante a infecção	Fase de expressão	Número de acesso no GenBank
Acp g 1	*Alternaria citri*	Dothideomycetes	Endopoligalacturonase	Contato incial	AB047543
AKT1	*Alternaria alternata Japanese*	Dothideomycetes	Biossíntese de toxinas	Todos os estágios	AB015351
AKT2	*Alternaria*	Dothideomycetes	Biossíntese de toxinas	Todos os estágios	AB015352
AKTR-2	*Alternaria*	Dothideomycetes	Biossíntese de toxinas	Todos os estágios	AB035493
AKT3-2	*Alternaria*	Dothideomycetes	Biossíntese de toxinas	Todos os estágios	AB035494
AMT	*Alternaria alternata*	Dothideomycetes	Biossíntese de toxinas	Todos os estágios	AF184074
odc1	*Stagonospora nodorum*	Dothideomycetes	Biossíntese de poliamina e ornitina decarboxilase	Resposta à defesa da planta	AJ249387
Aox1	*Cladosporium fulvum*	Dothideomycetes	Álcool oxidase	Resposta à defesa da planta	AF375246
Ecp1	*Cladosporium fulvum*	Dothideomycetes	?		Z14023
Ecp2	*Cladosporium fulvum*	Dothideomycetes	Avr	Crescimento biotrófico	Z14024
Avr4	*Cladosporium fulvum*	Dothideomycetes	Avr	Crescimento biotrófico	X78829 Y08356
Avr9	*Cladosporium fulvum*	Dothideomycetes	Avr	Crescimento biotrófico	AF312694
HCf1-5	*Cladosporium fulvum*	Dothideomycetes	Hidrofobinas	Contato inicial	
PKS1	*Cochliobolus heterostrophus*	Dothideomycetes	Biossíntese de toxinas	Todos os estágios	U68040
chk1	*Cochliobolus heterostrophus*	Dothideomycetes	MAP Kinase		AF178977
HTS1	*Cochliobolus carbonum*	Dothideomycetes	Biossíntese de toxinas	Todos os estágios	M98024
TOXC	*Cochliobolus carbonum*	Dothideomycetes	Biossíntese de toxinas	Todos os estágios	U73650
TOXF	*Cochliobolus carbonum*	Dothideomycetes	Biossíntese de toxinas	Todos os estágios	AF157629
Ccsnf1	*Cochliobolus carbonum*	Dothideomycetes	Regulação de genes repressores catabólitos		AF159253
PGN1	*Cochliobolus carbonum*	Dothideomycetes	Endo-exopoligalacturonase	Todos os estágios	M55979
PGX1	*Cochliobolus carbonum*	Dothideomycetes	Endo-exopoligalacturonase	Todos os estágios	L48982

Anexo A. - Genes de fungos fitopatogênicos utilizados para o alinhamento de sequências, incluindo sua expressão durante a infecção e o número de acesso no GenBank

continuação

GENE	Microrganismo	Classe	Expressão durante a infecção	Fase de expressão	Número de acesso no GenBank
PM-toxin	*Mycosphaerella zeae-maydis*	Dothideomycetes	Biossíntese de toxinas	Todos os estágios	-
Ptrl ToxA	*Pyrenophora tritici-repentis*	Dothideomycetes	Biossíntese de toxinas	Todos os estágios	U79662
Ptrl ToxA	*Pyrenophora tritici-repentis*	Dothideomycetes	Biossíntese de toxinas	Todos os estágios	AF004369
ToxB	*Pyrenophora tritici-repentis*	Dothideomycetes	Biossíntese de toxinas	Todos os estágios	AY007692
PTK1	*Pyrenophora teres*	Dothideomycetes	MAP Kinase		AF272831
Cht	*Lepthosphaeria maculans*	Dothideomycetes	Cianido hidratase	Estágio necrótico	AF192405
cel2	*Lepthosphaeria maculans*	Dothideomycetes	Celobiohidrolase	Estágio necrótico	AF240001
AvrLm1	*Lepthosphaeria maculans*	Dothideomycetes	Gene Avr		CT485794 Vários (48)
AvrVg	*Venturia inaequalis*	Dothideomycetes	Gene Avr		
Tom1	*Septoria lycopersici*	Dothideomycetes	Tomatinase	Estágio final	
CHT	*Gloeocercospora sorghi*	Dothideomycetes	Cianido hidratase	Estágio inicial	M99044
SCD1	*Fusarium*	Hypocreomycetes	Apressório e biossíntese de melanina	Contato incial	BI201714
cap20	*Fusarium*	Hypocreomycetes	Apressório	Contato inicial	BI201677
cutA	*Fusarium*	Hypocreomycetes	Cutinase, germinação de conídio e penetração	Contato inicial	U63335
cutA	*Fusarium solani* f.sp. *pisi*	Hypocreomycetes	Cutinase	Todos estágios de infecção	M29759
MPG1	*Fusarium*	Hypocreomycetes	Apressório	Contato inicial	BI190870
CTF1β	*Fusarium*	Hypocreomycetes	Cutinase	Contato inicial	U51672
PDA1	*Fusarium*	Hypocreomycetes	Pisatina demetilase	Resposta à defesa da planta	S70757
PEP5	*Fusarium*	Hypocreomycetes	Carregador de efluxo	Resposta à defesa da planta	AF315808
Cel1	*Fusarium*	Hypocreomycetes	Celobiohidrolase	Fase necrótica	A35269
fmk1	*Fusarium oxysporum*	Hypocreomycetes	MAP Kinase		AF286533

Anexo A. - Genes de fungos fitopatogênicos utilizados para o alinhamento de sequências, incluindo sua expressão durante a infecção e o número de acesso no GenBank

continuação

GENE	Microrganismo	Classe	Expressão durante a infecção	Fase de expressão	Número de acesso no GenBank
FoTom1	*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*	Hypocreomycetes	Tomatinase	Todos os estágios	
pg1	*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*	Hypocreomycetes	Endopoligalacturonase	Todos os estágios	U96456
pgx4	*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*	Hypocreomycetes	Endopoligalacturonase	Todos os estágios	AF136444
pl1	*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*	Hypocreomycetes	Pectato liase	Fase necrótica	AF080485
pelA	*Fusarium solani* f.sp. *pisi*	Hypocreomycetes	Pectato liase	Todos estágios de infecção	M94691
pelD	*Fusarium solani* f.sp. *pisi*	Hypocreomycetes	Pectato liase	Todos estágios de infecção	U13050
FsMAPK	*Fusarium solani* f.sp. *pisi*	Hypocreomycetes	MAP Kinase		U52963
ARG1	*Fusarium solani* f.sp. *melonis*	Hypocreomycetes	Biossíntese de arginina	Resposta à defesa da planta	AB045736
PDA1	*Nectria haematococca*	Hypocreomycetes	Pisatina demetilase	Estágio inicial	X73145
MAK1	*Nectria haematococca*	Hypocreomycetes	Detoxificação Maakian	Resposta à defesa da planta	U35892
PEP5	*Nectria haematococca*	Hypocreomycetes	Carregador de efluxo	Estágio inicial	AF315808 AF315315
PEP1	*Nectria haematococca*	Hypocreomycetes	?		AF294788
PEP2	*Nectria haematococca*	Hypocreomycetes	?		AF294788
Avr-Pita	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Gene Avr		EU055569 Vários (19)
PWL2	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Gene Avr		XM_001405464 Vários (5)
ACE1	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Gene Avr		AJ704622
Avr2-YAMO	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Gene Avr		*Cladosporium fulvum*
PWL1	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Gene Avr – sp específico (milheto)		U36923
PWL2	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Gene Avr – sp específico (arroz)		XM_001405464 Vários (5)
Sdh1/RSY	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Biossíntese de melanina	Contato inicial	AB004741

Anexo A. - Genes de fungos fitopatogênicos utilizados para o alinhamento de sequências, incluindo sua expressão durante a infecção e o número de acesso no GenBank

continuação

GENE	Microrganismo	Classe	Expressão durante a infecção	Fase de expressão	Número de acesso no GenBank
BUF	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Biossíntese de melanina	Contato inicial	L22309
Mpg1	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Apressório e conídio	Contato inicial	L20685
PTH 1 1	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Reconhecimento da parede do hospedeiro	Contato inicial	AF119670-2
ACR1	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Germinação de esporos	Contato inicial	XM_365002 CH476821
ABC1	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	ABC Transporter	Crescimento biotrófico	AF032443
pth9	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Proteção contra stress	Resposta à defesa da planta	AF027981
pth3	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Biossíntese de histidina	Resposta à defesa da planta	AF027980
pth2	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Carnitina acil transferase	Resposta à defesa da planta	AF027979
magB	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Cascada de sinal		AF011341
Mps1	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	MAP Kinase		AF020316
pmk1	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	MAP Kinase		U70134
CPKA/pth4	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Kinase		U12335
SUM1	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Kinase		AF024633
mac1	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Adenilato ciclase		AF012921
mac1	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Adenilato ciclase		AF006827
pth8	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	?		AF027983
pth1	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Regulador de repressão da glucose		-
ORP1	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	?		AF315717
NPR1	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Regulador N_2, MPG1		
NPR2	*Magnaporthe grisea*	Sordariomycetes	Regulador N_2, MPG1		XM_368580
PKS1	*Colletotrichum lagenarium*	Sordariomycetes	Apressório	Contato inicial	D83643

Anexo A. - Genes de fungos fitopatogênicos utilizados para o alinhamento de sequências, incluindo sua expressão durante a infecção e o número de acesso no GenBank

continuação

GENE	Microrganismo	Classe	Expressão durante a infecção	Fase de expressão	Número de acesso no GenBank
SCD1	*Colletotrichum lagenarium*	Sordariomycetes	Apressório	Contato inicial	D86079
THR1	*Colletotrichum lagenarium*	Sordariomycetes	Apressório	Contato inicial	D83988
CMK1	*Colletotrichum lagenarium*	Sordariomycetes	MAP Kinase		AF174649
CAP20	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Apressório	Contato inicial	U18061
PelB	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Pectato liase	Todos os estágios	AF052632
CgMEK1	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	MAP Kinase		AB047033
EMK1	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Kinase		AF169644
CgDN3	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Supressor de defesa da planta	Contato inicial	U94180
cap3	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Apressório	Contato inicial	U18756
cap5	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Apressório	Contato inicial	U18757
cap20	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Apressório	Contato inicial	U18061
cap22	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Apressório	Contato inicial	U18758
CHIP1	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Conjugação ubiquitina	Contato inicial	
CHIP2	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Conjugação ubiquitina	Contato inicial	AF149296 *Glomerella*
CHIP3	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Conjugação ubiquitina	Contato inicial	AF089807 *Glomerella*
ctg-1	*Colletotrichum trifolli*	Sordariomycetes	Cascada de sinais		AF044894
Ct-PKAC	*Colletotrichum trifolli*	Sordariomycetes	Kinase		AF046921
clk1	*Colletotrichum lindemuthianum*	Sordariomycetes	Kinase		AF000309
CLTA1	*Colletotrichum lindemuthianum*	Sordariomycetes	Mudança de biotrófico para necrotrófico		AF190427
clpg2	*Colletotrichum lindemuthianum*	Sordariomycetes	Endopoligalacturonase	Conídio, apressório, penetração da hifa	X95457
CLPG1	*Colletotrichum lindemuthianum*	Sordariomycetes	Endopoligalacturonase	Estágio necrotrófico	X95457 X89370

Anexo A. - Genes de fungos fitopatogênicos utilizados para o alinhamento de sequências, incluindo sua expressão durante a infecção e o número de acesso no GenBank

continuação

GENE	Microrganismo	Classe	Expressão durante a infecção	Fase de expressão	Número de acesso no GenBank
SCD1	*Colletotrichum lagenarium*	Sordariomycetes	Apressório	Contato inicial	D86079
THR1	*Colletotrichum lagenarium*	Sordariomycetes	Apressório	Contato inicial	D83988
CMK1	*Colletotrichum lagenarium*	Sordariomycetes	MAP Kinase		AF174649
CAP20	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Apressório	Contato inicial	U18061
PelB	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Pectato liase	Todos os estágios	AF052632
CgMEK1	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	MAP Kinase		AB047033
EMK1	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Kinase		AF169644
CgDN3	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Supressor de defesa da planta	Contato inicial	U94180
cap3	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Apressório	Contato inicial	U18756
cap5	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Apressório	Contato inicial	U18757
cap20	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Apressório	Contato inicial	U18061
cap22	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Apressório	Contato inicial	U18758
CHIP1	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Conjugação ubiquitina	Contato inicial	
CHIP2	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Conjugação ubiquitina	Contato inicial	AF149296 *Glomerella*
CHIP3	*Colletotrichum gloeosporioides*	Sordariomycetes	Conjugação ubiquitina	Contato inicial	AF089807 *Glomerella*
ctg-1	*Colletotrichum trifolli*	Sordariomycetes	Cascada de sinais		AF044894
Ct-PKAC	*Colletotrichum trifolli*	Sordariomycetes	Kinase		AF046921
clk1	*Colletotrichum lindemuthianum*	Sordariomycetes	Kinase		AF000309
CLTA1	*Colletotrichum lindemuthianum*	Sordariomycetes	Mudança de biotrófico para necrotrófico		AF190427
clpg2	*Colletotrichum lindemuthianum*	Sordariomycetes	Endopoligalacturonase	Conídio, apressório, penetração da hifa	X95457
CLPG1	*Colletotrichum lindemuthianum*	Sordariomycetes	Endopoligalacturonase	Estágio necrotrófico	X95457 X89370

Anexo A. - Genes de fungos fitopatogênicos utilizados para o alinhamento de sequências, incluindo sua expressão durante a infecção e o número de acesso no GenBank

(conclusão)

GENE	Microrganismo	Classe	Expressão durante a infecção	Fase de expressão	Número de acesso no GenBank
path-1	*Colletotrichum magna*	Sordariomycetes	Mudança de endofítico para patogênico ?		-NT_166539 *Aspergillus*
-	*Colletotrichum graminicola*	Sordariomycetes	Peptidase		AF263837 - *Glomerella*
Avenacinase	*Gaeumannomyces graminis* var. *Avenae*	Sordariomycetes	Avenacinase	Resposta à defesa da planta	U35463
Tri5	*Giberella zeae*	Sordariomycetes	Biossíntese de toxinas	Todos os estágios	U22464
Tri5	*Giberella pulcaris*	Sordariomycetes	Biossíntese de toxinas	Todos os estágios	M64348
cpg-1	*Cryphonectria parasitica*	Sordariomycetes	Cascada de sinais		Q00580
Cpgb-1	*Cryphonectria parasitica*	Sordariomycetes	Cascada de sinais		U95139
bdm-1	*Cryphonectria parasitica*	Sordariomycetes	Cascada de sinais		AF140555
NIT2	*Neurospora crassa*	Sordariomycetes	Fator transcricional aquisição N_2 – presente em Avr9		AY168017 – *Colletotrichum* U60290- *Magnaporthe*
Cel1	*Claviceps purpurea*	Sordariomycetes	Celobiohidrolase	Contato inicial	U25129 - *Cochliobololus*
pecA	*Aspergillus flavus*	Eurotiomycetes	Endopoligalacturonase	Todos os estágios	U05015
AREA	*Aspergillus nidulans*	Eurotiomycetes	Fator transcricional aquisição N_2 – presente em Avr9		Y13700 Vários e *niger* tb
Bcpg1	*Botrytis cinerea*	Letiomycetes	Endopoligalacturonase	Todos os estágios	U68715
Bcatr8	*Botrytis cinerea*	Letiomycetes	ABC Transporter	Resposta à defesa da planta	AJ006217
bmp1	*Botrytis cinerea*	Letiomycetes	MAP Kinase		AF205375
cutA	*Botrytis cinerea*	Letiomycetes	Cutinase	Contato inicial	Z69264
nip1	*Rhynchosporium secalis*	Ascomiceto mitospórico	Avr; PR		EF683100 Vários
nip2	*Rhynchosporium secalis*	Ascomiceto mitospórico	Avr; PR		
nip3	*Rhynchosporium secalis*	Ascomiceto mitospórico	Avr; PR		
Nrf1			Regulador Avr9	~*Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa*	NT_166524 – *A. niger*
PWL família	*Magnaporthe grisea*		Governam patogenicidade p/ chorão		

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima."

Louis Pasteur