

**RICARDO COSTA LEÃO**

**DETECÇÃO DE ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS E  
DESENVOLVIMENTO PARCIAL DE UM PROTOCOLO DE INATIVAÇÃO  
GÊNICA MEDIADA PELO TRANSPOSON *Impala* EM *Fusarium graminearum*.**

**LAGES-SC**

**2007**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CURSO DE MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

**RICARDO COSTA LEÃO  
Engenheiro Agrônomo**

**DETECÇÃO DE ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS E  
DESENVOLVIMENTO PARCIAL DE UM PROTOCOLO DE INATIVAÇÃO  
GÊNICA MEDIADA PELO TRANSPOSON *Impala* EM *Fusarium graminearum*.**

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do Grau de Mestre no Curso de  
Mestrado em Produção Vegetal da Universidade  
do Estado de Santa Catarina – UDESC.

**LAGES – SC  
2007**

**RICARDO COSTA LEÃO**  
Engenheiro Agrônomo-UDESC/LAGES-CAV

**DETECÇÃO DE ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS E  
DESENVOLVIMENTO PARCIAL DE UM PROTOCOLO DE INATIVAÇÃO  
GÊNICA MEDIADA PELO TRANSPOSON *Impala* EM *Fusarium graminearum*.**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, para obtenção do título de Mestre Produção Vegetal.

Aprovado em:  
Pela banca examinadora:

Homologado em:  
Por:

---

Dr. Altamir F. Guidolin  
Orientador – UDESC/Lages-SC

---

Dr. Ricardo Trezi Casa  
Coordenador Técnico do Curso  
Mestrado em Produção Vegetal

---

Dr. Jorge Fernando Pereira  
Co-Orientador  
Embrapa Trigo – RS

---

Dr. Osmar Klauberg Filho  
Coordenador do Programa de  
Mestrado em Produção Vegetal

---

Dr. Ricardo Trezi Casa  
UDESC/Lages-SC

---

Adil Knackfuss Vaz  
Diretor Geral do Centro de  
Ciências Agroveterinárias  
UDESC/Lages-SC

---

Dra. Cileide M. M. C. A. Souza  
UDESC/Lages-SC

---

Dr. Jéferson L. M. Coimbra  
UDESC/Lages-SC

**Lages, Santa Catarina  
18 de Junho de 2007.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela oportunidade a mim concedida de realizar este trabalho e por ter me dado força e paciência nos momentos difíceis.

A minha esposa Karina e minha filha Thais pela paciência, dedicação e apoio. Pela compreensão de minha ausência nos momentos difíceis e também de alegria em que não pude estar presente devido ao compromisso assumido na realização deste trabalho e principalmente pelo amor a mim dedicado desde o início ao fim desta jornada.

Aos meus Pais que não mediram esforços para eu chegar até aqui, sempre apoiando minhas decisões e me dando amor e compreensão, serei eternamente grato.

Ao Dr. Jorge Fernando Pereira, um agradecimento especial pelos ensinamentos, pela paciência e dedicação dada a mim para realização deste projeto, que serão também aproveitados em minha vida acadêmica e profissional.

Ao Professor Dr. Altamir Frederico Guidollin e a Pesquisadora Dra. Ana Chistina Albuquerque, por aceitarem como orientado e pela confiança em mim.

Aos Pesquisadores e funcionários da Embrapa Trigo, em especial a equipe do laboratório de Biotecnologia: Dra. Sandra Brammer, Dra. Ana Lúcia, Dr. Edson, Francimar, Ellen, Carla, Neusa, Sandra Mansur, a equipe do laboratório de Fitopatologia: Dra. Imaculada, Dr. João, Alexandre, João, Ana, as bibliotecárias Regina e Rosana e ao funcionário e amigo Claudir pela paciência, convívio e carinho com que me receberam.

Aos colegas de mestrado, em especial aos meus amigos: Fábio, Diorvânia, Claytson, Juliano, Felipe Penter, Leonardo, André e Tânia, pelos agradáveis momentos de convivência.

Aos estagiários do laboratório de biotecnologia da Embrapa Trigo: Estevon, Ana Claudia, Fabiana, Marcel e Taiana, pelos agradáveis momentos de convivência, principalmente na hora do chimarrão.

Aos Funcionários e Professores do Centro de Ciências agroveterinária, principalmente aqueles ligados ao Mestrado em Produção Vegetal, pelos ensinamentos repassados e pela boa vontade e presteza com que me receberam durante a realização deste desafio.

Sou grato a minha família: vó Lica, vó Nilza, vô Marcos, meu irmão Jackson, minhas sobrinhas (Isabela, Maria Julia, Gabriele e Sofia), meus sogros Ayrton e Rute, meus tios, primos e amigos que me apoiaram de diferentes maneiras para que eu alcançasse meus objetivos.

A minha família de Passo Fundo, Mauro, Ana, Joarez, Adriel, Gabriel, Vinícius e em especial a Dona Carmem que me acolheu como um filho e não mediu esforços para que me sentisse em casa e ao meu grande amigo José (Zé) pelas horas de cantorias.

## RESUMO

O fungo *Fusarium graminearum* (teleomorfo *Gibberella zeae*) é o agente etiológico da giberela do trigo, atualmente uma das principais doenças de inverno no Brasil. Epidemias ocorrem esporadicamente, embora nos últimos anos, registraram-se incrementos na intensidade da doença em quase todas as áreas produtoras de trigo no mundo. Vários estudos demonstram uma grande diversidade genética em isolados de *F. graminearum* de diferentes áreas geográficas, como também em isolados de uma mesma localidade. Em fungos filamentosos como o *F. graminearum*, uma das principais fontes de mutações capaz de gerar alta variabilidade genética são os elementos transponíveis ou transposons. Essas mutações algumas vezes estão envolvidas com a quebra de resistência, fenômeno importante para o surgimento de epidemias. Os objetivos deste trabalho foram de detectar putativas seqüências de elementos transponíveis no genoma deste fungo, bem como, desenvolver e analisar procedimentos e métodos adequados para a co-transformação de isolados brasileiros deste fungo com o plasmídeo *pNII60*, o qual carrega o transposon *impala*, e o plasmídeo *pAN7.1*, no qual esta inserido o gene de resistência a higromicina B. Para detectar putativas seqüências de elementos transponíveis no genoma deste patógeno foram construídos oligonucleotídeos específicos para amplificação, via PCR de seqüências características destes elementos transponíveis. Foram utilizados 14 isolados de *F. graminearum*, provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo e um total de 10 pares de oligonucleotídeos foram construídos (6 pares para genes que codificam a enzima transposase, 3 pares para genes que codificam a enzima transcriptase reversa e 1 par um gene que codifica a proteína GAG). Dos 10 pares de oligonucleotídeos utilizados, o par que amplificaria uma região de transcriptase reversa similar ao mesmo gene de *Magnaporthe grisea* não amplificou nenhum fragmento nos isolados utilizados, e o par que amplificaria uma região de transposase similar ao mesmo gene de *Metarhizium anisopliae* originou muitos fragmentos de diferentes tamanhos não condizentes com o tamanho esperado de 683 pb. Dos oito pares de oligonucleotídeos restantes, cinco amplificaram as regiões esperadas para a transposase (regiões de 715 pb similar a uma transposase de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, 306 pb similar a uma transposase de *Aspergillus awamori*, 556 pb similar a uma transposase de *A. niger*, 339 pb similar a uma transposase de *Arabidopsis thaliana* e 554 pb similar a uma transposase de *Cochliobolus carbonum*), dois amplificaram as regiões de transcriptase reversa (regiões de 161 pb similar a uma transcriptase reversa de *A. thaliana* e 752 pb similar a uma transcriptase reversa de *Caenorhabditis elegans*) e um amplificou um fragmento de tamanho esperado de 581 pb similar ao gene *gag* de *F. oxysporum*. A amplificação ocorreu, mesmo que para diferentes pares de oligonucleotídeos, em todos os 14 isolados analisados, confirmando a presença de seqüências putativas de elementos transponíveis em isolados de *F. graminearum* provenientes de diferentes regiões do Brasil, além de demonstrar uma diversidade de classes de putativos elementos, uma vez que cada seqüência é característica de um determinado grupo de elementos transponíveis. Para o desenvolvimento do protocolo de inativação gênica foram

selecionados os solados F02 e F12 patogênicos a cultivar BR18-Terena. Um teste para avaliação do meio de cultura para seleção dos mutantes resistentes ao clorato demonstrou que o meio descrito por Cove (1979) é o mais indicado para os isolados selecionados. Um total de 15 isolados mutantes resistentes ao clorato foi obtido, dos quais 5 foram identificados como mutantes para o gene nitrato redutase (*niaD*), 8 mutantes para um regulador específico (*nirA*) e 2 mutantes para permease. Diferenças quanto ao número de mutantes selecionados pelo número de placas inoculadas, número de mutantes nitrato redutase e produção de esporos assexuais, indicam que a escolha do isolado pode influenciar na obtenção de mutantes e na produção de protoplastos. Testes com diferentes concentrações de higromicina revelaram que doses acima de 30  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  são suficientes para o controle do crescimento do fungo. Dois mutantes nitrato redutase (M01 e M194) foram selecionados para a protoplastização e co-transformação, com base na menor produção de micélio residual em relação aos demais. Apenas um transformante foi obtido sendo denominado T3, mostrando a viabilidade do protocolo, mas também, que mais estudos devem ser realizados para se aumentar o número de transformantes. Se confirmada, através de hibridização, a transformação de T3 com uma única cópia do elemento *impala*, este poderá além de confirmar a capacidade de transposição deste elemento em *F. graminearum*, também servir em estudos de expressão gênica, principalmente àqueles genes envolvidos no processo de patogenicidade.

**Palavras chave:** *Fusarium graminearum*, trigo, transposons, variabilidade genética.

## ABSTRACT

The fungi *Fusarium graminearum* (teleomorph *Gibberella zeae*) is the etiological agent of scab wheat, one of the most important cereal's winter diseases in Brazil. Outbreaks are generally sporadic but in the last few years is frequently reported an increase in disease intensity in almost all the wheat producing areas around the world. Some studies demonstrate a high genetic diversity in *F. graminearum* from different geographic areas, as well as in isolates at the same locality. In filamentous fungi, as the *F. graminearum*, one of the main mutation's causes is the transposable elements or transposons which are capable to generate different types of mutations. In some cases, these mutations are involved with the resistance break, an important phenomenon for the occurrence of epidemics. The objectives of this study were to detect putative transposable elements sequences in the *F. graminearum* genome, as well as to develop and to analyze adequate procedures for co-transformation of brazilin isolates of this fungi with the vectors *pNII60*, which carry the transposon *impala* and *pAN7.1*, which code to hygromycin B resistance. To detect putative sequences of transposable elements in the *F. graminearum* genome, specific oligonucleotides were constructed and 14 isolates, originated from the States of Rio Grande do Sul, Paraná and São Paulo were used. A total of 10 oligonucleotides pairs were constructed (6 oligonucleotides pairs were specific to transposase, 3 to transcriptase reverse and 1 to gene that code for GAG protein). Considering these 10 oligonucleotides pairs, the one that would amplify a transcriptase reverse region similar to a *Magnaporthe grisea* reverse transcriptase did not amplify any fragment in the isolates total DNA, and the pair that would amplify a transposase region similar to *Metarhizium anisopliae* originated many fragments of different sizes that do not show relation with 683 bp expected size fragment. Considering the eight oligonucleotides pairs remained, five of them amplified the expected fragments for transposase (715 bp region similar to *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* transposase, 306 bp similar to *Aspergillus awamori* transposase, 556 bp similar to *A. niger* transposase, 339 bp similar to *Arabidopsis thaliana* transposase and 554 bp similar to *Cochliobolus carbonum* transposase), two of them amplified the transcriptase reverse fragments (161 bp similar to *A. thaliana* reverse transcriptase and the 752 bp similar to *Caenorhabditis elegans* reverse transcriptase) and one oligonucleotide pair amplified an 581 bp expected size fragment similar to *F. oxysporum* *gag* gene. The amplification occurred, even for different oligonucleotides pairs, in all 14 analyzed isolates confirming the presence of transposable elements putative sequences in Brazilian isolates of *F. graminearum*. This also shows a diversity of groups of these putative elements, considering that some of the sequence amplified is characteristic of a transposable element specific group. To develop the genic inactivation protocol, we select the isolates F02 and F12 which are pathogenic for BR18-Terena cultivar. To evaluate the better medium for selection of chlorate resistant mutants, it was analyzed two different medium. This analysis showed that medium describe by Cove (1979) is more indicate for selected the chlorate resistant mutants. A total of 15



chorate resistant mutants were obtained, being five identified as nitrate reductase mutants (*niaD*), eight specific regulator mutants (*nirA*) and two permease mutants. Differences related to the number of mutants obtained and number inoculated plates, number of nitrate reductase mutants and macroconides production indicate that the choice of the isolate can influence the isolation of mutants and in protoplast production. Analysis with different hygromycin B concentrations revealed that doses up to  $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$  were enough to control the fungal growth. Two nitrate reductase mutants (M01 and M194) were select to protoplastization and co-transformation, once these two mutants in relation to others produce lower concentration of residual mycelium. Only one transformant were obtained and it was denominated T3, what shows that the transformation protocol needs to be modified to increase the number of transformants. If hybridization experiments confirm the transformation of T3 with only one copy of the *impala* element, it will be confirmed the transposition ability of *impala* in *F. graminearum*, and it will be useful in genetic inactivation studies, especially to genes involved in pathogenicity process.

**Keywords:** *Fusarium graminearum*, wheat, transposons, genetic variability.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1.** Esquema da co-transformação de *F. graminearum* com o vetores *pNI160* (contendo o elemento *impala* inserido no gene *niaD* de *Fusarium oxysporum*) e *pAN7.1* (contendo o gene de resistência a higromicina B) e a obtenção dos fenótipos revertentes.....45

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da amplificação da região ITS do rDNA como controle da qualidade do DNAs dos isolados. Números 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica marcador de tamanho (Ladder 100 pb). “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho dos fragmentos amplificados.....71
- Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação originados a partir dos diferentes oligonucleotídeos construídos neste trabalho. Amplificação de uma região de 369 pb com similaridade ao gene que codifica uma transposase de *Arabidopsis thaliana*. Números de 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica o marcador de tamanho (Ladder 100pb) e “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho dos fragmentos amplificados.....72
- Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação originados a partir dos diferentes oligonucleotídeos construídos neste trabalho. Amplificação de uma região de 715 pb com similaridade ao gene que codifica uma transposase de *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*. Números de 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica o marcador de tamanho (Ladder 100pb) e “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho dos fragmentos amplificados.....73

**Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação originados a partir dos diferentes oligonucleotídeos construídos neste trabalho. Amplificação de uma região de 554 pb com similaridade ao gene que codifica uma transposase de *Cochliobolus carbonum*. Números de 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica o marcador de tamanho (Ladder 100pb) e “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho dos fragmentos amplificados.....74

**Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação originados a partir dos diferentes oligonucleotídeos construídos neste trabalho. Amplificação de uma região de 306 pb com similaridade ao gene que codifica uma transposase de *Aspergillus awamori*. Números de 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica o marcador de tamanho (Ladder 100pb) e “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho dos fragmentos amplificados.....74

**Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação originados a partir dos diferentes oligonucleotídeos construídos neste trabalho. Amplificação de uma região de 556 pb com similaridade ao gene que codifica uma transposase de *Aspergillus niger*. Números de 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica o marcador de tamanho (Ladder 100pb) e “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho dos fragmentos amplificados.....75

**Figura 7.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação originados a partir dos diferentes oligonucleotídeos construídos neste trabalho. Foi observada a amplificação de fragmentos de diversos tamanhos não condizentes ao tamanho esperado do fragmento de 683 pb similar ao gene que codifica uma transposase de *Metarhizium anisopliae*. Números de 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica o marcador de tamanho (Ladder 100pb) e “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho do fragmento esperado.....76

**Figura 8.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação originados a partir dos diferentes oligonucleotídeos contruídos neste trabalho. Amplificação de uma região de 657 pb com similaridade ao gene que codifica a proteína GAG de *Fusarium oxysporum*. Números de 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica o marcador de tamanho (Ladder 100pb) e “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho dos fragmentos amplificados.....77

**Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação originados a partir dos diferentes oligonucleotídeos construídos neste trabalho. Amplificação de uma região de 161 pb com similaridade ao gene que codifica uma transcriptase reversa de *Arabidopsis thaliana*. Números de 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica o marcador de tamanho (Ladder 100pb) e “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho dos fragmentos amplificados.....78

**Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação originados a partir dos diferentes oligonucleotídeos construídos neste trabalho. Amplificação de uma região de 752 pb com similaridade ao gene que codifica uma transcriptase reversa de *Caenorhabditis elegans*. Números de 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica o marcador de tamanho (Ladder 100pb) e “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho dos fragmentos amplificados.....78

## CAPÍTULO II

**Figura 1.** A) Sintoma inicial do desenvolvimento da doença observado na cultivar BR18 Terena, atacando uma espigada individualmente; B) Espiga apresentando os sintomas característicos da doença: aristas arrepiadas e espiguetas despigmentadas.....98

**Figura 2.** Teste para identificação de mutantes nitrato redutase caracterizados pela habilidade de crescimento em diferentes fontes de nitrogênio. A) Isolado F12 crescendo em meio mínimo mais clorato (Cove, 1979), denominado de M194. Pode-se observar a área de crescimento diferenciado demarcado com um círculo vermelho. B) Mutante M194 crescendo em meio mínimo (MM) mais cloreto de amônio (nota-se o crescimento aéreo dos micélios). C) Mutante M194 crescendo em MM mais glutamato. D) Mutante M194 crescendo em MM mais nitrito. E) Mutante M194 crescendo em MM mais hipoxantina. F) Mutante M194 inoculado em MM mais nitrato, não foi observado crescimento de micélio aéreo neste meio (a coloração avermelhada é devido a um crescimento residual do micélio do mutante).....101

**Figura 3.** Teste de resistência de *F. graminearum* a diferentes concentrações de higromicina. A) meio BDA sem higromicina (controle); B) meio BDA com 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de higromicina; C) meio BDA com 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de higromicina; D) meio BDA com 30  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de higromicina; E) meio BDA com 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de higromicina; F) meio BDA com 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de higromicina.....103

**Figura 4.** Protoplastos plaqueados pelo método “pour-plate” em meio completo contendo glutamato como única fonte de nitrogênio, sacarose 1M como estabilizador osmótico e higromicina (50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de meio). As placas “B” e “C” apresentam pontos de crescimento vigoroso, que foram repicados, cada um, para placas isoladas contendo o mesmo meio.....105

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Tabela 1.</b> Elementos transponíveis isolados de fungos filamentosos.....	31
---	----

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1.</b> Isolados de <i>F. graminearum</i> utilizados neste trabalho.....	66
---	----

<b>Tabela2.</b> Lista de oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primers</i> ) selecionados, genes, espécie com quem apresentam similaridade na sequência do gene, número de pares de bases esperado na amplificação da região alvo, sequências dos pares de oligonucleotídeos e temperatura de anelamento.....	70
--	----

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1.</b> Teste para a identificação de mutantes nitrato redutase com diferentes fontes de nitrogênio.....	102
---	-----

## SUMÁRIO

<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
1. FUSARIOSE DA ESPIGA DO TRIGO.....	17
1.1. <i>Fusarium graminearum</i> .....	20
2. VARIABILIDADE GENÉTICA X PATOGENICIDADE.....	23
3. ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS.....	26
3.1. Classificação.....	28
3.2. Regulação da transposição.....	32
4. VARIABILIDADE GENÉTICA CAUSADA POR ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS..	33
4.1. Efeito mutagênico dos elementos transponíveis.....	33
4.2. Variação mediada pela inserção.....	35
4.3. Variações mediadas por excisões.....	36
4.4. Rearranjos mediados por transposons.....	36
5. ESTUDOS DE POPULAÇÕES PATOGÊNICAS UTILIZANDO ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS.....	37
5.1. Ferramentas para a Análise da Estrutura da População e Epidemiologia.....	38
5.1.1. Acompanhamento de populações patogênicas com transposons.....	39
5.1.2. Diagnóstico baseado em PCR.....	40
5.1.3. Inativação gênica por elementos transponíveis.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

<b>CAPÍTULO I – Detecção de elementos transponíveis em <i>Fusarium graminearum</i>, agente causal da giberela do trigo.....</b>	<b>61</b>
---	-----------

RESUMO.....	62
ABSTRACT.....	63
1. INTRODUÇÃO.....	64
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	66
2.1. Isolados utilizados.....	66
2.2. Construção dos oligonucleotídeos.....	67
2.3. Obtenção de massa micelial.....	67
2.4. Extração de DNA.....	68
2.5. Reação de PCR.....	69
3. RESULTADOS.....	71
4. DISCUSSÃO.....	79
5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	83
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

<b>CAPÍTULO II – Desenvolvimento parcial de um protocolo de inativação gênica por mutagênese insercional mediada pelo transposon <i>impala</i> em <i>Fusarium graminearum</i>, agente causal da giberela do trigo.....</b>	<b>88</b>
--	-----------

RESUMO.....	89
ABSTRACT.....	90
1. INTRODUÇÃO.....	91
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	93
2.1 Teste de patogenicidade.....	93
2.2 Isolados e meios de cultura.....	93
2.3 Seleção dos mutantes.....	94
2.4 Cultura monospórica dos mutantes.....	94
2.5 Teste para identificação de mutantes nitrato-redutase.....	95
2.6 Teste de estabilidade.....	95
2.7 Teste de resistência a higromicina B.....	96
2.8 Plasmídios.....	96
2.9 Protoplastização e transformação.....	96
3. RESULTADOS.....	98
4. DISCUSSÃO.....	105
5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	109
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 1. FUSARIOSE DA ESPIGA DO TRIGO

Epidemias desta doença no trigo têm sido identificadas na Europa, Estados Unidos, China e América do Sul, resultando na perda do rendimento superior a 30%, devido principalmente à redução na qualidade de grãos e alta concentração de micotoxinas produzidas pelo fungo.

No Brasil, a giberela como também é conhecida esta doença, tem sido estudada há mais de três décadas e estudos recentes indicam que a doença, que se apresentava na forma de epidemias leves e esporádicas, alcançou o status de principal doença nas regiões tritícolas com maior frequência no Sul do Brasil, causando impactos econômicos (Reis et al., 1996b; Panisson et al., 2003). A giberela é uma doença de infecção floral e ocorre com maior frequência naquelas regiões onde ocorrem períodos prolongados de chuva (> 72 horas) e temperaturas médias no período chuvoso > 20 °C após o início da floração (Reis et al., 2001).

A giberela é causada por várias espécies do gênero *Fusarium*, como por seus respectivos teleomorfos. As principais espécies relatadas são *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorfo *Gibberella zeae* (Schw.) Petch) e, *F. culmorum* (Smith) Sacc., porém também podem causar epidemias as espécies *F. avenaceum* (Corda ex. Fr.) Sacc. (tel. *G. avenacea* Cook) e *Microdochium nivale* (Ces. Ex Berl. & Vogl.) Sammuels & Hallett (tel. *Monographella nivalis* (Schaff.) Müller (Wiese, 1987).

No sul do Brasil, foi relatada a ocorrência de *F. graminearum*, grupo evolutivo II (Reis, 1986). Além disso, ocorre em outros cereais como: cevada, aveia, triticales e centeio. As epidemias ocorrem esporadicamente, embora nos últimos anos, registraram-se incrementos na intensidade da doença em quase todas as áreas produtoras de trigo do mundo (McMullen et al., 1997; Apony et al., 1998; Clear & Patrick, 2000; Windels 2000). As hipóteses formuladas

para explicar a maior intensidade da giberela baseiam-se, além das condições climáticas favoráveis, na adoção em maior escala do sistema de plantio direto, seqüência de cultivo com espécies suscetíveis como o milho (*Zea mays* L.) e, a inexistência de variedades com suficiente resistência. Todos esses fatores favorecem o aumento do inóculo e a sobrevivência do patógeno (McMullen et al., 1997; Dill-Macky & Jones, 2000; Windels, 2000). Contribuem também, o momento e o uso de doses incorretas de fungicidas aplicados e, a utilização de produtos com insuficiente controle, ou deposição deficiente dos mesmos (Reis et al. 1996a).

Os sintomas da giberela caracterizam-se pela infecção das espiguetas, que exibem anasarca seguidas da destruição da clorofila. Com a evolução da colonização do fungo, essas se apresentam despigmentadas, de coloração esbranquiçada ou cor-de-palha. As aristas das espiguetas infectadas mostram-se arrepiadas. Os grãos podem se desenvolver apresentando aspecto enrugado e chocho, de aparência áspera e com coloração cor-de-rosa por causa da presença do micélio do fungo. Quando plaqueados em meio de cultura desenvolvem as colônias de coloração rosada ou avermelhada características de *F. graminearum*. O inóculo do fungo é constituído de ascósporos, provenientes principalmente dos peritécios formados em tecidos senescidos de trigo e de inúmeras gramíneas. Os ascósporos são transportados pelo vento atingindo o sítio de infecção, constituído pelas anteras, principalmente as presas; por isso, o período de suscetibilidade estende-se do início da antese ao início da maturação do trigo (Reis et al., 2001).

Os danos no rendimento de grãos, quantificados na Região Sul do Brasil de 1984 à 1994, foram em média de 5,4% (Reis et al., 1996b). A partir da década de 90, com a adoção e difusão do sistema de plantio direto em grandes áreas cultivadas, a giberela aumentou de intensidade, não somente no trigo, como em aveia (*Avena sativa* L.), em cevada (*Hordeum vulgare* L.) e em tritcale (*Triticum secalotricum* Mester) (Panisson, 2001). Na safra de 2002 no Rio Grande do Sul o dano médio causado pela giberela foi de 11,6% (Casa et al., 2004).

Na Argentina, no Canadá e nos Estados Unidos, fato semelhante foi observado, tanto em cereais de inverno como em milho (*Zea mays* L.), possivelmente em função do sistema de plantio direto (Parry et al., 1995), pois os restos culturais infectados, mantidos na superfície do solo, beneficiam os processos de esporulação, disseminação e inoculação do patógeno (Casa et al., 2004).

Segundo Parry et al. (1995), não existem cultivares de trigo imunes à fusariose da espiga sendo a maioria das cultivares susceptíveis e poucas moderadamente resistentes. O efeito do uso de cultivares resistentes baseia-se na redução da taxa de incremento da doença, o que resultaria em menores danos (Fry, 1982). Bai & Shaner (1994) indicam que a pesquisa para identificação de cultivares resistentes pode durar anos sem obter os resultados esperados. Estes autores comentam estudos realizados na China, onde se testaram mais de 17000 linhagens de trigo durante seis anos, encontrando só trinta e duas com aceitável grau de resistência.

Existem pelo menos cinco tipos de resistência ativa à giberela no trigo (Mesterházy, 1995). Tipo I evitando a infecção pelo fungo, a qual se assume como devida a fatores fisiológicos, Tipo II que se contrapõe à disseminação do patógeno dentro do hospedeiro, ambas descritas por Schroeder & Christensen (1963). Também é relatada a resistência de tipo III, verificada em alguns trigos europeus de inverno e provavelmente associada a micoproteínas (Mesterhazy, 1995; Doohan et al., 2000). O tipo de resistência IV envolve a habilidade de um cultivar para degradar a micotoxina DON (Miller et al., 1986; citados por Bai & Shaner 1996). Finalmente, o tipo V entende-se como a tolerância, isto é, a capacidade de uma cultivar de não diminuir o rendimento de grãos embora tenha sido infectada pelo patógeno (Mesterházy, 1995).

Para que os programas de melhoramento possam elevar o nível de resistência à giberela é fundamental encontrar fontes de resistência ao patógeno. As poucas fontes de resistência a

giberela provêm da China, do Brasil e do Japão, fazendo com que a base genética da resistência à giberela seja ainda reduzida (Gilchrist et al, 1998; Bai & Shaner, 1996). Além disso, as fontes identificadas demonstraram características agronômicas indesejáveis como o baixo rendimento, porte elevado e suscetibilidade a ferrugens.

### **1.1. *Fusarium graminearum***

*Fusarium graminearum* possui algumas características morfológicas como fiálides laterais curtas e conídios falciformes de 2,5-5 x 35-62 µm, com 3 a 7 septos. Os peritécios de *G. zae* são superficiais, gregários, de coloração púrpuro-escura a preto, com diâmetro de 150-350 µm. Possuem ascos clavados contendo 8 ascósporos hialinos. Estes medem de 3-5 x 17-25 µm e apresentam de 0 a 4 septos. O *Fusarium graminearum* cresce rapidamente em meio BDA e apresenta um denso micélio aéreo. A superfície inferior da colônia é usualmente carmim. Não apresenta microconídios e os macroconídios apresentam 3-7 septos, com a célula basal em forma de pé. A célula apical é cônica. Os conidióforos são monofiálides ramificadas ou não, os clamidósporos são raros em meio de cultura e quando ocorrem formam-se principalmente em macroconídios, mas também em micélio (Nelson et al., 1983). Os ascósporos de *Gibberella zae* formam-se em peritécios de cor púrpura escuro quase pretos, submersos em estroma no tecido do hospedeiro ou em seus restos culturais. Os ascósporos têm três septos, são hialinos e relativamente uniformes em tamanho (Sutton, 1982).

*F. graminearum* produz toxinas (Snijders & Perkowski, 1990; Tuite et al., 1990) que quando ingeridas por humanos e outros animais não ruminantes, induzem espasmos musculares e vômitos (Joffe, 1978; Hoerr et al., 1982; Long et al., 1982). As principais toxinas produzidas por membros do gênero *Fusarium* integram um grupo de substâncias denominadas Tricotecenas, dentre as quais podemos citar: a) deoxinivalenol (DON), também

conhecida como vomitoxina, com duas variantes mono e diacetilada, b) nivalenol (NIV) a qual é aproximadamente dez vezes mais nociva para o organismo animal que a DON, c) diacetoxiscirpenol (DAS), d) toxina T-2 e e) fusarenon-X (Pomeranz et al., 1990, Busso, 2005). A zearalenona (também conhecida com F-2) é produzida principalmente por *F. graminearum* em culturas de sorgo, cevada, trigo e milho. A zearalenona e seu derivados possuem efeito estrogênico em várias espécies animais causando infertilidade, edema vulvar, prolapso genital, hipertrofia mamária em mulheres e feminilização em homens com atrofia testicular e aumento do tamanho das mamas (Peraica, 2000).

Três das mais importantes culturas do mundo, trigo, arroz e milho, são suscetíveis a várias espécies de *Fusarium* incluindo o *F. graminearum*. O fungo pode infectar muitas partes das plantas durante o ciclo de vida destes hospedeiros e conseqüentemente causar uma gama de doenças. (Miedaner & Schilling, 1996).

Várias técnicas moleculares foram usadas para resolver dificuldades com a identificação de *F. graminearum* e prover informações sobre a estrutura de sua população. Uma combinação de informações morfológicas e moleculares permitiu a divisão do *F. graminearum* em dois grupos (grupo I e grupo II) e subsequente redesignação do grupo I do *F. graminearum* como uma espécie denominada de *F. pseudograminearum* (Aoki & O'Donnell, 1999). Isolados do grupo I são heterotáticos, isto é, colônias de origem monospórica, não formam peritécio em meio de cultivo e raramente produzem-nos na natureza. Isolados do grupo II produzem tanto podridão do colo como fusariose da espiga e formam peritécios facilmente em meio de cultivo e na natureza (Purss, 1971; Francis & Burgess, 1977). Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para amplificação específica foram projetados para diferenciar os isolados de *F. graminearum* daquelas espécies relacionadas de *Fusarium* (Nicholson et al., 1998).

Estudos feitos por Burguess et al. (1987) não demonstraram diferenças quanto à patogenicidade de ambos os grupos em espigas de trigo. O grupo II poderia ser dividido, baseado em técnicas moleculares, em dois subgrupos: A e B. Este último seria menos agressivo ao trigo e arroz, do que ao milho (Carter et al., 2000). Porém estudos sobre a patogenicidade em trigo de isolados de *F. graminearum* (Bai & Shaner, 1996; Mesterhazy, 1997; Gilchrist et al., 1998) revelaram diferenças significativas na sua agressividade.

Apesar de o fungo ser isolado em todas as principais regiões agrícolas do mundo, pouco se sabe sobre a estrutura populacional de isolados de *F. graminearum* de diferentes áreas geográficas; e se essas diferenças são relacionadas à patogenicidade ou qualquer outra característica (Carter et al., 2002). No Brasil, estudos de estrutura genética de populações e análises de diversidade são raros, tendo sido, recentemente, reportados estudos preliminares de caracterização molecular de isolados de trigo do Paraná (Angelotti et al., 2004; Busso, 2005).

O maior passo para o avanço no conhecimento de *F. graminearum*, foi a finalização do projeto de seqüenciamento do seu genoma e liberação das seqüências em maio de 2003, marcando o início de uma nova era no estudo deste patógeno (Goswami & Kistler, 2004). Diferentes estimativas sugerem que essa espécie contenha mais de 11.600 genes, fazendo desse o fungo com maior número de seqüências codificadoras descrito até hoje. Embora a funcionalidade de uma seqüência codificadora seja basicamente sugerida por similaridades a outras seqüências já disponíveis, a mutação dessas seqüências é a ferramenta ideal para estudos de genômica funcional.

## 2. VARIABILIDADE GENÉTICA X PATOGENICIDADE

A variação na virulência e agressividade em populações de fungos fitopatogênicos pode levar a quebra de resistência de seus hospedeiros. O estudo da diversidade genotípica é muito importante para alinhar a proteção das plantas às populações de patógenos existentes e potencialmente mutáveis (Akinsanmi et al., 2006).

Carter et al. (2002) analisaram 188 isolados de *F. graminearum*, originários do Noroeste da Europa, EUA e Nepal, quanto à diversidade genética e patogenicidade em trigo e milho. A diversidade dos 188 isolados foi analisada pelo “*polimorfismo de regiões amplificadas de seqüências caracterizadas*” (SCAR), sendo que 42 destes isolados também foram analisados por marcadores RAPD. Os resultados possibilitaram a divisão dos isolados em três grupos. Nos grupos A e B estão contidos os isolados do Nepal e no grupo C estão contidos os isolados da Europa e dos Estados Unidos. Os testes de patogenicidade em plantas de trigo e milho mostraram que os isolados do grupo C foram mais patogênicos que os outros dois grupos. Neste mesmo estudo, os isolados também foram classificados quimicamente com base em suas habilidades de produzirem as micotoxinas nivalenol (NIV) e deoxynivalenol (DON). Os isolados do grupo A produziram igualmente tanto a micotoxina NIV quanto a micotoxina DON, enquanto os isolados do grupo B produziram predominantemente NIV e os do grupo C produziram predominantemente DON. Estes resultados confirmam existência de grupos geneticamente distintos dentro de *F. graminearum* e demonstram que estes grupos têm diferentes propriedades biológicas, especialmente com respeito a sua patogenicidade para dois dos mais economicamente importantes, hospedeiros deste patógeno.

Outros estudos indicam que, equanto isolados de diferentes regiões são reunidos para formar um único “*pool*” populacional, grupos distintos são identificados em um único local.

Um estudo realizado por Walker et al. (2001) avaliou a variabilidade de isolados de *F. graminearum* causadores de giberela no Estado da Carolina do Norte, EUA, através de marcadores RAPD. A análise detectou um alto nível de diversidade genética entre os isolados para patogenicidade dentro de uma única parcela, em uma única lavoura, em uma única localidade e dentro do Estado da Carolina do Norte. Para o autor, isto sugere que a reprodução sexual está ocorrendo dentro do ciclo de sobrevivência da população de *F. graminearum*. Com isso, novos genótipos estão constantemente sendo produzidos e a diversidade pode permanecer alta, ainda que em uma área geográfica limitada. Para Bowden & Leslie (1996), os altos níveis de diversidade genética ocorridos em uma pequena área espacial, indicam várias infecções diferentes ocorridas a partir de diversas fontes de inóculo, e a ocorrência de múltiplos genótipos em uma pequena área pode prover oportunidades para altos níveis de recombinações sexuais, pois o *F. graminearum* sobrevive saprofiticamente em restos culturais através de sua forma perfeita ou sexual (*G. zeae*). Walker et al. (2001) encontraram alta diversidade genotípica e fenotípica em isolados de *F. graminearum* em uma pequena área, tanto no cultivo convencional quanto no plantio direto. Apesar do tipo de cultivo não ter influenciado a diversidade genética e fenotípica do fungo, este fator pode ter um impacto na densidade de inóculo pela criação de um grande reservatório de inóculo primário. O autor também indica que altos níveis de diversidade genotípica em *F. graminearum* podem ocorrer também em áreas onde a doença não tenha sido um problema severo.

Akinsanmi et al. (2006) estudaram a diversidade genética de isolados de *F. graminearum* e *F. pseudograminearum* de várias regiões da Austrália com o auxílio de marcadores AFLP. A análise estatística mostrou que 63 dos 149 locos AFLP foram significativamente ( $P < 0.05$ ) diferentes entre as duas espécies, sendo que 70 dos 72 isolados de *F. pseudograminearum* e 56 dos 59 isolados de *F. graminearum* tinham haplótipos distintos. Neste estudo o *F. graminearum* também apresentou uma alta diversidade genética



dentro de uma única lavoura de trigo. Apesar das duas espécies apresentarem alta diversidade genética, a correlação desta com a agressividade, só foi significativa para os isolados de *F. pseudograminearum*. Estudos realizados por Zeller et al., (2003) utilizando marcadores AFLP também encontraram diversidade genotípica em isolados do centroeste dos Estados Unidos. Neste estudo foi analisada a presença ou a ausência de alelos baseados no polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLPs) de 30 loci, dos quais 24 foram definidos geneticamente sobre um mapa de ligação de *G. zae*, a partir de mais de 500 isolados oriundos de sete Estados coletados durante as safras de 1998, 1999 e 2000.

Alguns estudos buscam analisar a diversidade entre isolados de *F. graminearum* a partir dos padrões na produção de micotocinas como a Deoxynivalenol (DON) e Nivalenol (NIV). Desjardin et al., (2004) analisaram uma grande população de campo (acima de 500 isolados) do Nepal, e identificaram três grupos que foram ambos geneticamente distintos e polimórficos para a produção de trichothecenos (DON e NIV).

Alguns trabalhos relatam a utilização de mais de um tipo de marcador ou técnica para analisar a diversidade dentro de uma população. Por exemplo, Toth et al., (2005) analisaram a variabilidade genética de 29 isolados de *F. graminearum* da Europa Central através da produção de micotoxinas, variação na agressividade, marcadores RAPD e IGS-RFLP. Todos os isolados demonstraram ser altamente patogênicos nos testes de agressividade in vitro. A análise filogenética do perfil do RAPD e do IGS-RFLP permitiu agrupar os isolados da Europa central dentro de 17 e 16 haplotipos, respectivamente. Quando as informações das duas análises foram combinadas, praticamente cada isolado analisado pôde ser diferenciados (27/29 haplotipos).

Apesar da reprodução sexual ter um papel importante na geração de variabilidade genética em *F. graminearum*, outros fatores podem estar relacionados. Em fungos filamentosos a variabilidade pode ser gerada por vários processos como, por exemplo,

mutações (pontuais, deleções, inversões, duplicações e translocações), ciclo parassexual, ciclo sexual e transferência horizontal de genes. Dos mecanismos conhecidos de geração de variabilidade, os elementos transponíveis apresentam papel fundamental (Pereira et al., 2006).

### 3. ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS

Os elementos transponíveis (ETs) podem ser definidos como seqüências de DNA moderadamente repetitivas que podem mover-se de um local a outro no genoma e desta maneira, ter um profundo impacto na estrutura e função dos genes, bem como na organização dos cromossomos na espécie (Daboussi, 1997).

Segundo Pereira et al. (2006), os elementos transponíveis ou transposons podem ser representados por cópias ativas ou inativas e, então, uma definição mais completa é aquela que considere esses dois tipos. Assim, esses elementos são seqüências de DNA moderadamente repetidas que, ao contrário do DNA satélite, não estão arranjadas em *tandem*, mas sim dispersas no genoma. As cópias ativas são capazes de se mover de um local para outro no genoma não possuindo homologia com a região de inserção, mas também não integrando de maneira totalmente aleatória. Esses elementos constituem um grupo bastante heterogêneo contendo características particulares que permitem estabelecer uma classificação.

Os ETs estão onipresentes em organismos procarióticos e eucarióticos, tanto em plantas como em animais. Em fungos eles foram identificados primeiramente na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Boeke, 1989), mas apenas recentemente em fungos filamentosos (Oliver, 1992; Dobinson & Hamer, 1993a). Apesar da extensiva investigação da genética molecular de algumas espécies usadas como modelos para genética de fungos, exemplificados pelos bem-estudados ascomicetos *Neurospora crassa* e *Aspergillus nidulans*, nenhuma evidência da atividade dos elementos transponíveis foi revelada o que pode ser consequência

de seleções contínuas para a estabilidade fenotípica destas duas espécies. Paradoxalmente, a maioria de nosso conhecimento de ETs em fungos, vem de estudos em espécies não domesticadas como patógenos de plantas, cepas industriais e de campo. A maioria destas espécies não apresenta o estágio sexual e geralmente exibe um alto nível de variação genética, os que atrae especulações de que contenham transposons ativos. Na década de 1990, houve um considerável interesse focalizado sobre estas diversas espécies que apresentam poucos estudos de caracterização genética. Estudos intensivos da genética molecular dessas espécies, pelo uso de ferramentas moleculares em sistemas modelos, permitiram a identificação de muitas famílias de ETs durante os últimos anos. A descoberta que os ETs são componentes comuns nos genomas de fungos, formando uma grande porção do genoma em algumas espécies, fez deles objetos de interesse devido aos efeitos que eles podem exercer sobre o genoma de seus hospedeiros. Os elementos transponíveis em fungos têm sido considerados causadores de mudanças genéticas espontâneas que tem o potencial de influenciar muitos aspectos na evolução do genoma de fungos. Embora poucos dados concretos foram publicados sobre o impacto das mudanças genéticas induzidas pelo transposons em populações naturais, muitos autores propõem que os ETs possuem um papel central na evolução dos genomas fúngicos (Daboussi & Capy 2003; Pereira et al., 2006).

A descoberta e isolamento dos elementos transponíveis em fungos filamentosos e outros organismos também propiciou a sua utilização como ferramenta genética. Suas propriedades permitiram o surgimento de novas técnicas aplicadas aos estudos de regulação de genes e variabilidade genética. Eles estão sendo utilizados como agentes mutagênicos, vetores para transformação, marcadores genéticos e como identificadores de genes e regiões regulatórias (Lai, 1994).

O que começou como um achado incomum por Bárbara McClintock no final dos anos de 1940, se tornou uma história fascinante e em andamento dos elementos genéticos móveis.

Apesar do aumento do número destas características genéticas descobertas em bactérias, plantas, animais e em fungos (revisado por Daboussi 1996; Saedler & Gierl 1996; Kempken & Kück 1998), muitas questões relativas aos elementos móveis têm que ainda serem resolvidas, em particular a função biológica destes elementos, bem como sua origem evolucionária (Kempken, 1999).

### 3.1. Classificação

Os ETs eucarióticos estão divididos dentro de duas classes principais pelos seus modos de transposição e organização estrutural (Finnegan, 1989). Os elementos da *Classe I* ou retroelementos transpõem-se pelo mecanismo de “cópia e colagem” pela transcrição reversa de um RNA intermediário. A *Classe II* dos ETs, também chamada de transposons de DNA, são flanqueados por duas repetições terminais invertidas (TIRs – *terminal inverted repeats*) e transpõem-se diretamente através da forma de DNA pelo mecanismo de “corte e colagem”. Ambas as classes estão subdivididas dentro de superfamílias distintas sobre bases de características estruturais, organização interna, tamanho do sítio de duplicação alvo (TSD – *target site duplication*) gerado acima da inserção, e similaridade de seqüências ao nível de DNA e proteínas. A *Classe I* pode ser subdividida dentro dos retrotransposons LTR, os quais são flanqueados por repetições terminais longas (LTR - *long terminal repeats*), compartilhando uma organização geral similar aos retrovírus, e os retroelementos sem LTR ou não-LTR (Daboussi, 1997). Os retrotransposons lembram os retrovírus, pois além de carregar as LTRs, também possuem regiões análogas à *gag* (que codifica as proteínas da cápsula viral) e *pol* (que codifica as enzimas transcriptase reversa, RNase H, integrase e protease). De acordo com a ordem dos genes na região *pol*, esses retrotransposons são divididos em elementos do grupo *gypsy/Ty3* (protease, transcriptase reversa, RNase H e integrase) e *copi/Ty1* (protease, integrase, transcriptase reversa e RNase H). Os

retroelementos não-LTR também podem ser subdivididos em *LINEs* e *SINEs* que recebem essa denominação por serem similares às *longs e shorts interspersed nuclear elements* encontrados em mamíferos. Os retroelementos *LINE-like*, além de não possuírem *LTRs*, usualmente possuem caudas poli-A, a região *gag* e parte da região *pol* (transcriptase reversa e RNase H), enquanto que os *SINE-like* não possuem as regiões *gag* e *pol* ou qualquer região codificadora mas contêm um promotor interno para a RNA polimerase III e terminais 3' ricos em adeninas (Pereira et al., 2006). Os elementos da *Classe II* além de possuírem pequenas repetições terminais invertidas, codificam a transposase, enzima que esta relacionada à transposição. A presença ou não de domínios específicos contendo três aminoácidos DDE (Asp, Asp e Glu) ou DDD (Asp, Asp e Asp) na sequência de aminoácidos da transposase é o critério para subdividir a *Classe II* em duas subclasses. O domínio constituído por esses três aminoácidos forma a região catalítica da enzima responsável pela clivagem das fitas de DNA (Doak et al., 1994), sendo localizado nos dois terços da extremidade C-terminal (Zhang et al., 2001). A *Subclasse I* é constituída pela superfamília *Tc1-mariner*, e a *Subclasse II* pelas superfamílias *hAT-like* (Daboussi & Capy, 2003; Pereira et al., 2006). Em fungos, a maioria dos elementos da *Classe II* é da família *Fot1/Pogo-like* ou pertencem à superfamília *Tc1-mariner*. A maioria dos elementos dessa superfamília apresenta características em comum com o transposon *Fot1* de *F. oxysporum*, o primeiro elemento *Pogo-like* descrito em fungos (Daboussi et al., 1992).

Segundo Pereira (2006), os diferentes mecanismos de transposição dos elementos da *Classe I e II* ainda não são muito bem esclarecidos e, embora alguns transposons de fungos contenham a maior parte da informação genética para sua própria transposição, o evento em si tem sido demonstrado apenas em alguns casos. Dos 56 elementos identificados até hoje em fungos fitopatogênicos, apenas 10 tiveram sua atividade demonstrada. Também é importante ressaltar que a classificação de elementos transponíveis tem caráter dinâmico uma vez que é

estabelecida de acordo com a identificação e caracterização de novos elementos. Assim, à medida que diferentes genomas eucarióticos são seqüenciados, novas famílias de elementos vêm sendo identificadas. Embora a maioria dessas novas famílias seja representante de grupos já descritos, novos grupos também são relatados. Por exemplo, um novo grupo de retroelemento eucariótico contendo seqüências que codificam transcriptase reversa foi descrito e denominado *Penelope-like* (Evgen's et al., 1997).

Os ETs de fungos foram identificados por uma variedade de estratégias, principalmente pela caracterização de seqüências repetitivas dispersadas ou marcando-os em um gene alvo. O gene da nitrato redutase foi particularmente útil para este propósito porque a resistência ao clorato pode selecionar mutantes que perderam a função deste gene (Daboussi, 1997). Outros elementos foram encontrados pela hibridização com heterólogos ou pela amplificação via PCR (*Polymerase Chain reaction*), com iniciadores (*primers*) degenerados derivados de domínios conservados (Daboussi, 1997). Finalmente, com o seqüenciamento genômico de várias espécies, houve um incremento na descoberta de novos elementos transponíveis (Cambaberi et al., 1998; Hua-Van et al., 2000). Em fungos filamentosos, vários elementos transponíveis foram isolados, estando presentes em Zigomicetos, Basidiomicetos e Ascomicetos. Alguns exemplos estão citados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Elementos transponíveis isolados de fungos filamentosos (baseado em Pereira et al., 2006 e Reis, 2002).

Hospedeiro	Elemento transponível	Classe	Grupo/família	Referência
<i>Ascobolus immersus</i>	<i>Mars1</i>	I	<i>LINE-like</i>	Goyon et al., 1996
	<i>Mars2, 3</i>	I	<i>Copia/Ty1</i>	Goyon et al., 1996/1996
	<i>Mars 4</i>	I	<i>Gypsy/Ty3</i>	Goyon et al., 1996
	<i>Tasco</i>	II	<i>hAT-like</i>	Goyon et al., 1996
	<i>Ascot*</i>	II	<i>hAT-like</i>	Colot et al., 1995
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Ant 1*</i>	II	<i>Ant1-like</i>	Glazyer et al., 1995
	<i>Tan</i>	II	<i>Pogo-like</i>	Nyssönen et al., 1996
	<i>Vader*</i>	II	<i>Pogo-like</i>	Amutan et al., 1996
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Boty</i>	I	<i>Gypsy/Ty3</i>	Diolez et al., 1995
	<i>Flipper*</i>	II	<i>Tc1-like</i>	Levis et al., 1997
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Foret 1</i>	I	<i>Gypsy/Ty3</i>	Julien et al., 1992
	<i>Skippy</i>	I	<i>Gypsy/Ty3</i>	Anaya & Roncero, 1995
	<i>Foxy*</i>	I	<i>SINE-like</i>	Mes et al., 2000
	<i>Folyt*</i>	II	<i>hAT-like</i>	Gómez-Gómez et al., 1999
	<i>Fot1* e 2*</i>	II	<i>Pogo-like</i>	Daboussi et al., 1992/1994
	<i>Fot3, 4</i>	II	<i>Pogo-like</i>	Hua-Van et al., 2000
	<i>Impala*</i>	II	<i>Ant1-like</i>	Langin et al., 1995
	<i>Hop*</i>	II	<i>Mutator-like</i>	Chalvet et al., 2003
	<i>Horne1,2 e 3</i>	II	<i>hAT-like</i>	Hua-Van et al., 2000
	<i>mimp</i>	II	<i>MITEs-like</i>	Hua-Van et al., 2000
<i>Magnaporthe grisea</i>	<i>Fosbury</i>	I	<i>Gypsy/Ty3</i>	Shull & Hamer, 1996
	<i>Maggy*</i>	I	<i>Gypsy/Ty3</i>	Farman et al., 1996a
	<i>Retro5</i>	I	<i>Copia/Ty1</i>	Dean et al., 2005
	<i>MGL*</i>	I	<i>LINE-like</i>	Nishimura et al., 2000
	<i>MGRS1</i>	I	<i>SINE-like</i>	Sone et al., 1993
	<i>Mg2929</i>	II	<i>Mutator-like</i>	Chalvet et al., 2003
	<i>Pot2</i>	II	<i>Pogo-like</i>	Kachroo et al., 1994
<i>Neurospora crassa</i>	<i>Occan</i>	II	<i>Pogo-like</i>	Kito et al., 2003
	<i>Dab 1</i>	I	<i>Gypsy/Ty3</i>	Bibbins et al., 1998
	<i>Punt</i>	II	<i>Tc1-like</i>	Margolin et al., 1998
<i>Phycomyces blakesleanus</i>	<i>Guest</i>	II	<i>MITE-like</i>	Yeadon & Catchside, 1995
	<i>Pri 1</i>	I	<i>Gypys/Ty3</i>	Ruiz-Pérez et a., 1996
<i>Tricholoma matsutake</i>	<i>mary1</i>	I	<i>Gypsy/Ty3</i>	Murata & Yamada, 2000
	<i>mary2</i>	I	<i>LINE-like</i>	Murata et al., 2001

(\*) Elementos já demonstrados serem ativos.

### 3.2. Regulação da transposição

Elementos transponíveis existem de duas formas funcionais: elementos autônomos que codificam as próprias enzimas responsáveis pela transposição, e elementos não-autônomos cujas proteínas para transposição são fornecidas por elementos autônomos. Embora os elementos transponíveis constituam um grupo bastante heterogêneo e neles existam particularidades, os mecanismos de transposição são fenômenos universais divididos em dois processos básicos: o conservativo, em que o elemento deixa o sítio original e insere-se em um novo sítio no genoma por meio de um mecanismo de corte e colagem, e o replicativo, em que uma cópia do elemento se insere em um novo sítio. Neste último, o elemento aumenta o número de cópias em cada evento de transposição, enquanto no modo conservativo o número de cópias é preservado podendo ocorrer aumento se, no momento da transposição, a molécula de DNA estiver em processo de replicação ou então pelo processo de conversão gênica (Pereira, 2006).

A maioria, mas nem todas as famílias de ETs, inclui elementos autônomos e não autônomos. Proteínas supridas pelos elementos autônomos, geralmente pertencentes à mesma família, podem transativar elementos não autônomos (Daboussi, 1997).

Vários trabalhos têm relatado que a frequência de transposição é influenciada por fatores bióticos ou abióticos que provocam algum tipo de estresse. A hipótese postulada por McClintock (1984), de que a transposição pode ser ativada por estresse ambiental, é baseada na idéia de que esse fenômeno contribui para o aumento da variabilidade genética, o que poderia promover a adaptação do organismo às mudanças ambientais. Em *Saccharomyces cerevisiae*, a transposição do retroelemento *Ty1* foi aumentada quando as células foram cultivadas sob estresse por baixa temperatura ou pequenas concentrações de nitrogênio (Paquim & Williamson, 1988; Morrillon et al., 2000). Já Ikeda et al. (2001) relataram que o retrotransposon MAGGY de *Magnaporthe grisea* é ativado por choque térmico, sulfato de



cobre e estresse oxidativo. Segundo Capy et al. (2000), este aumento da variabilidade genética pode ser testado de duas maneiras: (i) pela aplicação de um estresse em um organismo geneticamente controlado; e (ii) pela análise de populações naturais de uma mesma espécie vivendo em diferentes condições. O mesmo autor explica que um estresse pode induzir a atividade de um elemento de duas formas: através da indução de alguns elementos transponíveis pela presença de sítios para ativadores transcripcionais que são semelhantes aos sítios presentes em genes de defesa que são naturalmente ativados por estresse. Nesse caso, a ativação dos transposons é uma resposta primária ao estresse, e questões sobre a origem da semelhança entre os sítios de ativação de genes de defesa e transposons permanecem sem resposta. Outra explicação é que o estresse induziria uma desestabilização do genoma, levando ao mau funcionamento de muitos sistemas genéticos. Nesse caso, a indução seria mais um efeito secundário do que um efeito direto do estresse.

Estresses relacionados à história natural de fungos fitopatogênicos tem sido pouco estudados. O comportamento de elementos transponíveis em fungos fitopatogênicos durante a aplicação de fungicida, controle biológico ou diferenças de ativação durante a interação com hospedeiros resistentes e susceptíveis, que se tornaram questões interessantes, são raramente relatados (Pereira, 2006).

#### **4. VARIABILIDADE GENÉTICA CAUSADA POR ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS**

##### **4.1. Efeito mutagênico dos elementos transponíveis**

A habilidade dos ETs para induzir mutações depende de suas capacidades intrínsecas de transposição dentro de seu genoma hospedeiro. Alguns deles mostraram alterar genes e genomas de várias maneiras pela promoção de mudanças na expressão do gene, na sequência dos genes, e provavelmente na organização cromossômica (Daboussi, 1997).

Os elementos transponíveis têm um notável potencial para causar uma variedade de mudanças no genoma de seus hospedeiros. Pela transposição dentro ou próximo aos genes, os elementos da *Classe I* e da *Classe II* contribuem para sua inativação. Inserções podem também colocar um gene sob o controle de seqüências regulatórias dos ETs. Devido a sua habilidade de sair de um dado sítio, a *Classe II* dos transposons pode gerar um grande grau de variação na seqüência de DNA e no fenótipo. Além disso, os ETs tem a habilidade para rearranjar a informação genômica. O rearranjo do DNA pode ser local ou associado com modificações cromossômicas de larga escala. A extensão das mudanças genéticas associadas aos transposons em outras espécies, como por exemplo: *F. oxysporum*, *M. grisea* e *A. niger*, já foi relatada (Kidwell *et al.*, 2002).

Os elementos transponíveis foram encontrados na origem de numerosos tipos de rearranjos cromossômicos (Boeke, 1989), os quais podem explicar a extensiva variação cariotípica observada em várias plantas e patógenos humanos (Kistler & Miao, 1992). As diferenças tanto no tamanho como no número de cromossomos, envolvem translocações e grandes deleções. Um exemplo disto é a variação cariotípica encontrada em cepas de *F. oxysporum* originadas a partir do mesmo clone (Davière *et al.*, 1996). O mecanismo preciso para a variação observada é atualmente desconhecido. Entretanto, considerando as numerosas famílias de elementos transponíveis em algumas cepas, exemplificadas por *F. oxysporum* e *M. grisea*, cada família representada por muitas cópias altamente conservada (Daboussi & Langin, 1994), se fortalece a idéia de que as trocas ectópicas inter e intracromossomais entre aqueles elementos e subsequente rearranjo cromossomal poderia explicar a excepcional variação cariotípica observada. Informações sobre a distribuição dos ETs nos cromossomos do *F. oxysporum* bem como a reconstituição do mapa físico de um cromossomo polimórfico podem fornecer indícios de quais elementos repetidos estão envolvidos e com que freqüência (Daboussi, 1997).

#### 4.2. Variação mediada pela inserção

Diferentes tipos de ETs foram identificados por um fenótipo mutante após uma inserção dentro de um gene alvo como o da nitrato redutase (Daboussi & Langin, 1994), glutamato desidrogenase (Kinsey et al., 1989), ou genes envolvidos em um processo de desenvolvimento ou infeccioso, receptores de ferormônios (Fowler et al., 2000), cor de esporo (Colot et al, 1995), regulação da formação de conídios (Nishimura et al., 2000), ou um gene de avirulência (Kang et al, 2001). Na maioria dos casos, a inserção de um ET na região ou adjacente a região codificante, cria um fenótipo nulo porque o elemento bloqueia a transcrição ou altera os padrões de transcrição. Em *N. crassa*, um simples evento de transposição colocando o elemento *Tad* em uma posição logo acima do promotor da glutamato desidrogenase, criou um alelo instável. A reversão depende da metilação do DNA dentro e acima de *Tad*, indicando que a expressão do gene *am* é controlada epigeneticamente pelo estado de metilação do elemento *Tad* (Cambareri et al., 1996; Zhou et al., 2001).

A alteração da transcrição do gene alvo foi demonstrada em *F. oxysporum* com mutantes resultantes a partir da inserção do elemento *Fot1* em um íntron do gene da nitrato redutase (Daboussi & Langin, 1994). Em diferentes transcritos mutantes, todos foram observados ser menores que os transcritos do tipo selvagem. Estes transcritos truncados são todos quiméricos, indicando que os elementos *Fot1* contêm sinais de terminação e uma sequência que pode ser usada como um promotor alternativo. Imagina-se que algumas inserções de *Fot1* podem provavelmente impor novos padrões de expressão do gene, que pode ter efeitos profundos sobre a evolução no genoma hospedeiro (Daboussi, 1997).

### 4.3. Variações mediadas por excisões

Elementos que se movem pelo mecanismo de “corte e colagem” frequentemente produzem variações quando eles são excisados. O processo de excisão pode resultar na adição de poucos pares de bases que são chamados *footprints*. Este é o caso dos elementos *Fot1* e do *impala* de *Fusarium oxysporum*, os quais normalmente geram *footprints* de 4 pb (Migheli et al., 1999) ou 5 pb (Hua-Van et al., 2001b), quando eles são excisados a partir de regiões não codificantes. Quando inseridos dentro de regiões codificantes, tanto excisões precisas como *footprints* de 3 pb, levando à adição de um aminoácido na proteína já foram observados. Estes *footprints* contribuem para diversificação da sequência de nucleotídeos e também na criação de novos alelos funcionais. Por exemplo, o elemento *Ascot*, um transposon do tipo Ds-like, inserido dentro do gene responsável pela cor dos esporos de *A. immersus*, gera uma grande variação na sequência de DNA e no fenótipo. A variedade de fenótipos de coloração dos esporos observada indica que as mutações geradas por excisão têm um potencial pra influenciar muitos aspectos da expressão dos genes (Daboussi & Capy, 2003).

### 4.4. Rearranjos mediados por transposons

Em adição ao seu potencial na indução de variações genéticas pela transposição, os elementos transponíveis podem produzir uma série de rearranjos no genoma através de recombinações ectópicas entre os elementos dispersos, localizados sobre o mesmo ou diferentes cromossomos. Numerosos exemplos de rearranjos cromossomais como as deleções, duplicações, inversões e translocações mediados por ETs em *Drosophila* (Ladeveze et al., 1998), leveduras (Pérez-Ortín et al., 2002) e humanos (Lahn, 1999) foram documentados. Em fungos, a variação cariotípica é uma característica comum em isolados naturais, especialmente naqueles em que falta o ciclo sexual (Kistler et al., 1992). Análises do polimorfismo no comprimento de fragmentos de cromossomos forneceram evidências de translocações,

deleções de grandes fragmentos cromossômicos e muitas duplicações. A implicação dos ETs na instabilidade cariotípica foi investigada em algumas espécies, exemplificadas por *F. oxysporum* e *Magnapotha grisea*, nas quais numerosas famílias de ETs foram identificadas. Estes estudos mostraram que o alto nível de polimorfismo no comprimento do cromossomo estão relacionados com a alta densidade de ETs (Davière et al., 2001) e que a ocorrência de rearranjos cromossômicos estão frequentemente associados com o agrupamento de ETs nos cromossomos (Panaccione et al., 1996). Estes resultados sugerem que eles provavelmente resultam de recombinações ectópicas entre os ETs espalhados pelo genoma. A gama de mudanças cariotípicas observadas em algumas espécies durante a mitose (Davière et al., 2001) sem mudanças fenotípicas indica que muitas delas são, provavelmente, geneticamente neutras, ao menos sob condições de laboratório (Kistler et al., 1992). Entretanto, alguns rearranjos podem ser benéficos e podem ter um papel importante na evolução do hospedeiro, como reportado para cepas de leveduras de vinho (Pérez-Ortín et al., 2002). Desta maneira esses eventos poderiam levar à novas ligações gênicas que podem ser vantajosas para a adaptação a novos ambientes como, por exemplo, a translocação associada ao locus *Tox1* de *Cochliobolus heterostrophus* (Kodama et al., 1999) e ao surgimento de novos alelos virulentos em *M. grisea* devido ao rearranjo em regiões sub-teloméricas com seqüências repetidas agrupadas (Orbach et al., 2000).

## **5. ESTUDOS DE POPULAÇÕES PATOGÊNICAS UTILIZANDO ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS**

Além de geradores de variabilidade genética, transposons também podem ser utilizados como agentes mutagênicos, vetores para transformação e marcadores genéticos (Lai, 1994). Em fungos patogênicos, esses elementos têm sido explorados essencialmente para: (i) traçar o

perfil de populações de distintas áreas geográficas, auxiliando na compreensão da sua estrutura e epidemiologia; e (ii) desenvolver sistemas de inativação gênica por mutagênese insercional (Daboussi, 1997).

Para fungos patogênicos, um grande benefício do estudo de elementos transponíveis é o conhecimento da estrutura genética de populações naturais, especialmente aquelas compostas por espécies morfológicamente não-distinguíveis e com capacidade de infectar diferentes hospedeiros. Com esse propósito, tem sido estudado o padrão cromossomal e a distribuição de elementos transponíveis (Daboussi, 1997). O retrotransposon *fosbury* de *M. grisea* possui uma distribuição hospedeiro-específica conservada em isolados de arroz (Shull & Hamer, 1996), e seqüências repetitivas de DNA foram utilizadas para estudos epidemiológicos com o patógeno humano *Aspergillus fumigatus* (Neuvéglise et al., 1996).

### **5.1. Ferramentas para a Análise da Estrutura da População e Epidemiologia**

Pouco é conhecido sobre a estrutura genética das populações naturais de fungos fitopatogênicos, o que inclui formas indistinguíveis morfológicamente que infectam diferentes plantas hospedeiras. A partir de um ponto de vista epidemiológico, isto é importante para compreender o quanto as populações de hospedeiros específicas estão organizadas e o quão rapidamente elas estão mudando. Para este fim, a conservação e a dispersão dos ETs nestes fungos tem provado serem valiosas como marcadores no estudo da biologia das populações de patógenos de plantas e animais. A análise filogenética e da distribuição de ETs dentro dos maiores grupos de fungos, Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota, sugere que eles são provavelmente antigos componentes do genoma fúngico e são verticalmente transmitidos. Claro que isto não exclui ocasionais transferências horizontais. É também interessante que algumas famílias de ETs, exemplificados pelas superfamílias *Pogo* e *Ty3/gypsy*, estão amplamente representadas nos diferentes grupos. Uma análise detalhada da distribuição de

diferentes tipos de ETs foi feita em uma larga gama de fungos, particularmente em espécies que não apresentam o estágio sexual e consistem de uma população clonal. Frequentemente são observadas distribuições fragmentadas e variações no número de cópia dos elementos. Estas variações provavelmente refletem a existência de forças diferentes e opostas, as quais incluem competição entre elementos, eliminação, auto-regulação dos elementos e regulação do hospedeiro. Estas características, juntas com a existência de um grande polimorfismo ao nível de DNA, foram usadas para desenvolver novas ferramentas genéticas para investigar a estrutura populacional e a epidemiologia da patogenicidade das cepas patogênicas (Daboussi & Capy, 2003).

#### **5.1.1. Acompanhamento de populações fúngicas com transposons**

Em virtude dos ETs poderem marcar genótipos específicos que tenham um ancestral comum, eles são utilizados para distinguir populações geneticamente divergentes (Debeaupuis et al., 1997; Dobinson et al., 1993b; Kachroo et al., 1994; Mouyna et al., 1996; Shull & Hamer, 1996). Em *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis* (um patógeno da palmeira) o transposon palm foi usado para identificar subpopulações do patógeno, demonstrando que o recente surgimento da doença na América do Sul provavelmente ocorreu pela introdução de um isolado africano (Mouyna et al., 1996). Este estudo também demonstrou que a presença do elemento *palm* em todos os isolados patogênicos, e sua ausência em todos isolados não patogênicos, indicando que populações podem ser marcadas por transposons (Mouyna et al., 1996).

Os elementos transponíveis são frequentemente restritos a cepas específicas ou populações de fungos. Por esta razão, em adição a métodos como o RAPD e RFLP, os transposons podem ser usados como ferramentas de diagnóstico de cepas específicas. Esta aplicação é de interesse da indústria farmacêutica como um meio adicional para caracterizar a produção de cepas valiosas, e em patologia de plantas para identificar espécies patogênicas.

Em *T. inflatum*, o elemento *Restless* está presente em aproximadamente 15 cópias, as quais resultam em um padrão de hibridização muito específico que é detectado somente em poucas cepas, sugerindo que eles são provavelmente da mesma origem (Kempken et al. 1998). Além disso, um outro elemento repetido está exclusivamente presente em cópias múltiplas na cepa ATCC34921 (Kempken et al. 1995). Extensas análises da população de *Pyricularia grisea*, usando diferentes ETs, promoveu a introspecção dentro das formas específicas do hospedeiro, demonstrando a organização clonal das populações infectadas de arroz e a possibilidade de novas linhagens dos patógenos da cultura poderiam emergir como linhagens independentes (Dobinson et al., 1993b., Kachroo et al., 1994; Shull & Hamer, 1996).

### 5.1.2. Diagnóstico baseado em PCR

Para prevenir a introdução de formas patogênicas dentro de regiões livres de doenças, uma técnica de detecção sensível é necessária para produzir plantas certificadas livres de patógenos. Uma ferramenta de diagnóstico baseado em PCR foi desenvolvida para a detecção de um patógeno da palmeira (Fernandez et al., 1998) e raças de *F. oxysporum* responsáveis pela murcha do cravo (Chalvet et al., 2003). Esta estratégia é baseada em *fingerprinting* de uma coleção de cepas usando diferentes transposons e na clonagem e sequenciamento de regiões que flanqueiam alguns locais de inserções de transposons. Aqueles que apareceram estar correlacionados a uma raça ou forma patogênica específica foram usados para desenhar um conjunto de iniciadores (*primers*) específicos para a rápida identificação destes patógenos.

A descoberta de uma inesperada relação genética, ao examinar o transposon da família *impala* dentro do complexo *F. oxysporum*, foi verificada pela presença de alta similaridade dos elementos mostrando características únicas (deleções internas, alto padrão de transição de CG para TA) ou sua presença na mesma localização genômica em várias cepas com diferentes hospedeiros específicos (Hua-Van et al., 1998; 2001b). Este resultado mostrou que cepas podem ser mais intimamente relacionadas do que assumido a partir de seus hospedeiros



específicos. Isto também sugere que a mudança na patogenicidade é relativamente freqüente e promove questões sobre as bases genéticas de tal versatilidade (Daboussi & Capy, 2003).

### 5.1.3. Inativação gênica por elementos transponíveis

A outra perspectiva na utilização de transposons é estabelecer um protocolo de inativação gênica por mutagênese insercional mediante a etiquetagem por transposon (*transposon tagging*).

Para o estabelecimento de protocolos de inativação gênica mediado por transposons, o elemento que foi isolado é utilizado para criar uma inserção em um gene de interesse não clonado e, então, utilizado como uma etiqueta molecular para identificar esse gene, envolvendo três procedimentos: (i) integração do transposons em um gene alvo; (ii) triagem por um fenótipo mutante de interesse e demonstração que a mutação é resultado da inserção do elemento; (ii) identificação e clonagem do gene alvo. Essa técnica apresenta duas principais vantagens sobre as técnicas tradicionais de mutagênese. Primeiro, as mutações induzidas por esse método fornecem a possibilidade de eventual clonagem do gene, que é mais complicada com mutações induzidas por irradiação ou agentes químicos. Segundo, o gene alvo pode ser clonado sem o prévio conhecimento do seu produto protéico, sendo especialmente importante para genes envolvidos em processos de desenvolvimento (por exemplo, o processo de patogênese em fungos fitopatogênicos), pois esses genes são difíceis de serem isolados visto que não há conhecimento de quando são expressos (Lai, 1994). Entretanto, as desvantagens associadas a esse método são as múltiplas maneiras dos transposons induzirem mutações, o número de transposons introduzidos no genoma e a freqüente instabilidade das mutações induzidas por esses elementos (Pereira, 2006).

Na maioria dos sistemas, os transposons utilizados pertencem a *Classe II*, pois além de serem menores, apresentam o mecanismo de transposição de corte e colagem que dificulta o aumento do número de cópias no genoma. Em Fungos, o elemento *Restless* foi utilizado por

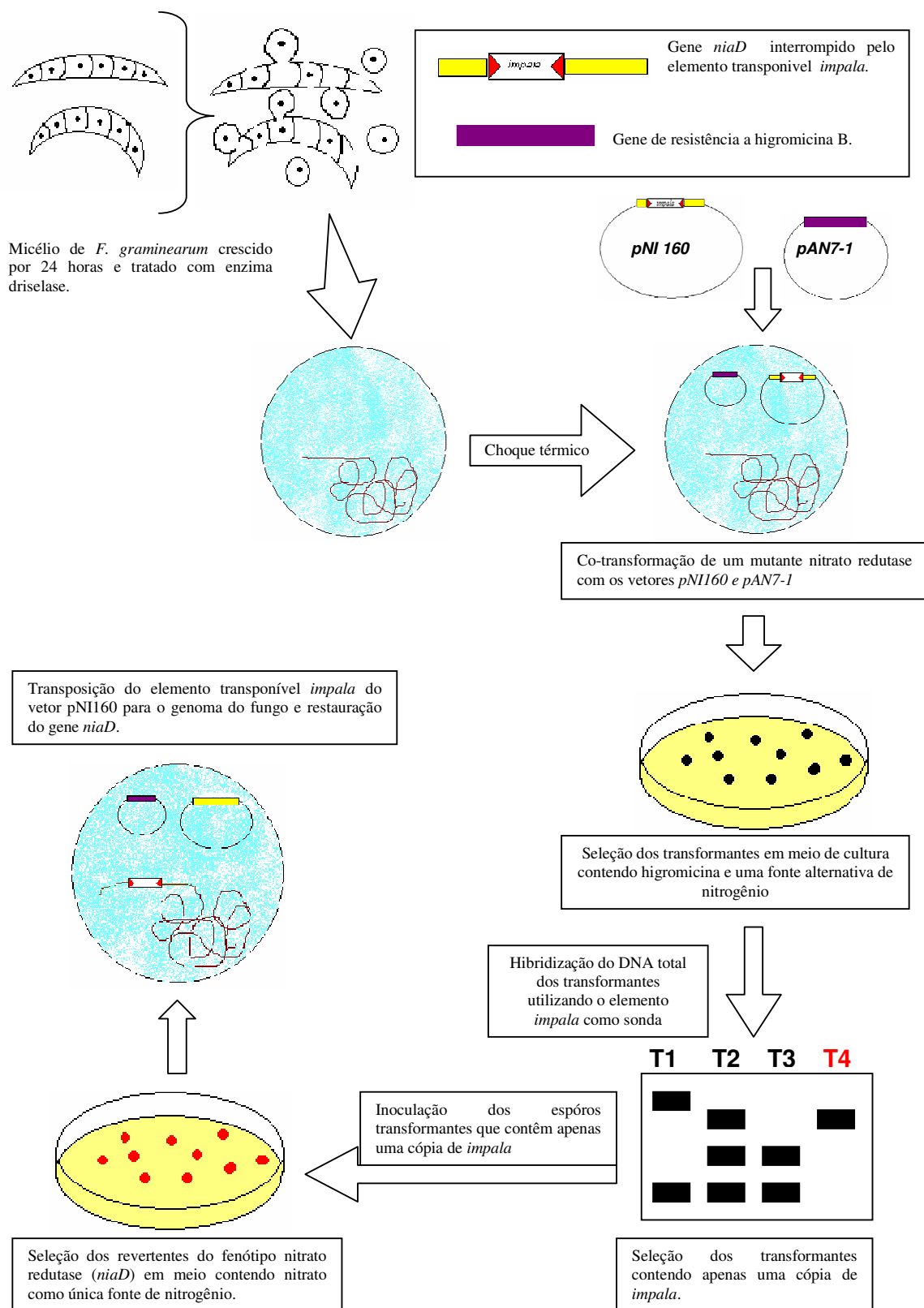
Kempken & Kück (2000) para isolar o primeiro gene fúngico por sistema de mutagênese insercional por transposons, sendo isolado um gene relacionado ao metabolismo do nitrogênio em *Topocladium inflatum*. A transposição do elemento *Restless* também foi demonstrada em espécies heterólogas como *Botrytis cinerea*, *Neurospora crassa* e *Sordaria macrospora* (Kempken & Kück, 2000). Os elementos *Fot1* de *F. oxysporum* e *MAGGY* de *M. grisea* também são capazes de transpor em espécies heterólogas (Nakayashiki et al., 1999; Hua-Van et al., 2001a; Nicosia et al., 2001). Entretanto, o elemento mais promissor para utilização em sistemas de inativação gênica em fungos filamentosos é o transposon *impala* de *F. oxysporum* (Langin et al., 1995), que apresenta apenas 1.280 pb contra 4.097 pb do elemento *Restless*. Como representante da família *Tc1-mariner*, esse elemento possui, além de pequeno tamanho, um mecanismo de transposição conhecido e é independente de fatores específicos do hospedeiro para transpor (Daboussi & Langin, 1994). Vetores carregando o transposon *impala* inserido no gene da nitrato redutase de *A. nidulans* são facilmente utilizados para estudos de transposição e inativação gênica, visto que a excisão desse elemento promove a funcionalidade do gene da nitrato redutase que pode ser verificada pela capacidade da célula de crescer em meio de cultura contendo nitrato como única fonte de nitrogênio (Figura 1). Esses vetores, chamados de *pNII60* e *pNIL160*, já foram utilizados com sucesso em espécies como *A. nidulans* (Nicosia et al. 2001), *M. grisea* (Villalba et al., 2001), *F. moniliforme* (Hua-Van et al., 2001a) e *P. griseoroseum* (Queiroz & Daboussi, 2003).

O gene da nitrato reutase é ideal para a utilização em protocolos de inativação gênica, devido a fácil obtenção de mutantes espontâneos por seleção positiva via resistência ao clorato. Essa seleção positiva, que favorece o crescimento do mutante em relação ao selvagem, é baseada na “similaridade” entre a molécula de nitrato e seu análogo tóxico, o clorato. Da mesma forma que o nitrato, o clorato presente no meio de cultura é transportado para o meio intracelular pela permease do nitrato e é reduzido a clorito pela ação da enzima

nitrato redutase. Entretanto, diferentemente do nitrito, o clorito é um composto tóxico que promove a morte da célula. O micélio capaz de crescer no meio com clorato é parte da colônia mutante que neste momento é resistente ao clorato, mas não necessariamente é mutante para a enzima nitrato redutase. Mutações em, pelo menos, cinco genes podem levar ao fenótipo de resistência ao clorato: (i) mutação no gene da permease do nitrato (*crnA*), que incapacite a célula de absorver o clorato do meio extracelular; (ii) mutação no gene do regulador específico da assimilação de nitrato (*nirA*), que impossibilite a célula de expressar a enzima nitrato redutase; (iii) mutação no gene regulador geral da assimilação de nitrogênio (*área*), que também impossibilite a célula de expressar a enzima nitrato redutase; (iv) mutação em algum gene envolvido na biosíntese do cofator molibdênio (*cnxA-J*), que, não estando presente, torna ineficazes a enzima nitrato redutase e outras enzima dependentes desse cofator; e (v) mutação no próprio gene da nitrato redutase (*niaD*), impossibilitando a célula de sintetizar essa enzima (Cove, 1976; Cove, 1979). Dessa forma, após a obtenção das colônias resistentes ao clorato, é necessário fazer uma discriminação do fenótipo mutante por meio de um fácil teste de crescimento em meio mínimo contendo as seguintes fontes de nitrogênio: nitrato, nitrito, hipoxantina, glutamato e amônio. O crescimento ou não nessas fontes é, então, correlacionado com a mutação em um dos cinco possíveis genes acima relacionados. O não crescimento em nitrato e crescimento em todas as outras fontes indica que a mutação é no gene da nitrato redutase. Como em todas as espécies de fungos filamentosos estudadas até o momento, apenas uma cópia funcional do gene da nitrato redutase está presente, mutantes nitrato redutase são reportados com alta frequência (Pereira et al., 2003).

Sistemas de inativação gênica mediada por transposons utilizados em fungos fitopatogênicos estão basicamente sendo relatados para o isolamento e identificação de genes envolvidos no processo de patogenicidade. A identificação desses genes possui grande potencial para revelar os determinantes da patogenicidade que podem ser a base para o

desenvolvimento de controles de doenças mais eficientes e duráveis. Em *M. grisea*, a análise de um revertente que apresentava ausência de patogenicidade revelou a inserção de *impala* em um gene essencial para a penetração do fungo na folha da planta hospedeira (Villalba et al., 2001). A habilidade de *impala* inativar genes de patogenicidade também foi testada em *F. oxysporum f. sp. Melonis* (Migheli et al., 2000). A triagem de 746 revertentes para o fenótipo nitrato redutase positivo revelou uma alta proporção de mutantes (3,5%) defectivos no processo de patogênese. Dessa forma, embora uma grande quantidade de mutantes deva ser obtida para identificar certo número de mutantes não-patogênicos, a mutagênese por transposon é um método viável para investigação de genes envolvidos no processo de patogênese (Pereira et al., 2006).



**Figura 1.** Esquema da co-transformação de *F. graminearum* com o vetores *pNI160* (contendo o elemento *impala* inserido no gene *niaD*) e *pAN7.1* (contendo o gene de resistência a higromicina B) e a obtenção dos fenótipos revertentes.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERG, B. On the mechanism of the toxic action of chlorates and some related substances upon young wheat plants. **Kungl. Lantbrukshögskolans Ann.** 15:37-107. 1947.

AKINSANMI, O. A.; BACKHOUSE, B.; SIMPFENDORFER, S. & CHAKRABORTY, S. Genetic diversity of Australian *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum*. **Plant Pathology**. 55:494-504. 2006.

AMUTAN, M.; NYSSONEN, E.; STUBBS, J.; DIAZ-TORRES, M. R.; DUNN-COLEMAN, N. Identification and cloning of a mobile transposon from *Aspergillus niger* var. *awamori*. **Current Genetics**, 29: 468-473, 1996.

ANAYA, N. & RONCERO, M.I.G. Stress-induced rearrangement of *Fusarium* retrotransposon sequences. **Molecular General Genetics**, 253: 89-94, 1996.

ANGELOTTI, F.; TESSMAN, D.J.; VIDA, J.B.; ALVES, T.C.A.; SOUTO, E.R.; HARAKAVA, R. Variabilidade genética e patogênica de isolados de *Fusarium graminearum* do trigo e triticle do sul do Brasil. In: **XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. Gramado/RS. Anais XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, v 28 (suplemento), p. S200. 2004

AOKI, T.; O'DONNELL, K. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. Nov., formally recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. **Mycologia** 91:597-609. 1999.

APONYI, I.; NAGY, G.; PRINCZIGER, G.; KAJATI, I. Fusarium infection of wheat seeds in Hungary between 1970 and 1997. **Cereal Research Communications**, 26(3):253-259. 1998.

BAI, G.H.; SHANER, G. Variation in *Fusarium graminearum* and cultivar resistance to wheat scab. **Plant Disease** 80:975-979. 1996.

BAI, G.H.; SHANER, G. Scab of wheat: Prospects for control. **Plant Disease**. 78:760-766. 1996

BIBBINS, M.; CUMMINGS, N.J.; CONNERTON, F. *DABII*: a degenerate retrotransposon-like element from *Neurospora crassa*. **Mol. Gen. Genet.** 258:431-436. 1998.

BOEKE, J.D., Transposable elements in *Saccharomyces cerevisiae*, pp. 335-374. in: Mobile DNA, edited by BERG, D.E.; HOWE, M.M. **American Society for Microbiology**, Washington, DC. 1989.

BOWDEN R.L. & LESLIE, J.F. Sexual recombination in *Gibberella zeae*. **Phytopathology** 82:182-188. 1999.

BOWDEN R.L. & LESLIE, J.F. diversity and sexuality in *Gibberella zeae*. *Fusarium Head Scab: Global Status and Future Prospects*. 1996. In: DUBIN, H.J.; GILCHRIST, L.; REEVES, J. & McNAB, A. editors, CIMMYT, Mexico pp. 35-39.

CADDICK, M.X.; PETERS, D.; PLATT, A. Nitrogen regulation in fungi. **Antonie van Leeuwenhoek** 64:169-177. 1994.

CAMBARERI, E.B.; AISNER, R.; CARBON, J. Structure of the chromosome VII centromere region in *Neurospora crassa*: degenerate transposons and simple repeats. **Mol. Cell Biol.** 18:5465-77. 1998.

CAMBARERI, E.B.; FOSS, H.M.; ROUNTREE, M.R.; SELKER, E.U.; KINSEY, J.A. Epigenetic control of a transposon-inactivated gene in *Neurospora* is dependent on DNA methylation. **Genetics** 143:137-46. 1996.

CAPY, P.; GASPERI G.; BIÉMONT C.; BAZIN, C. Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? **Heredity** 85:101-106. 2000.

CARTER, J.P.; REZANOOR, H.N.; HOLDEN, D.; DESJARDINS, A.E.; PLATTNER, R.D.; NICHOLSON, P. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 573–583, 2002.

CARTER, J.P.; REZANOOR, H.N.; DESJARDINS, A.E. & NICHOLSON, P. Variation in *Fusarium graminearum* isolates from Nepal associated with their host origin. **Plant Pathology** 49:452-460. 2000.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; BLUM, M.M.C.; BOGO, A.; SCHEER, O.; ZANATA, T. Danos causados pela infecção de *Gibberella zeae* em trigo. **Fitopatologia Brasileira** 29:289-293. 2004.

CHALVET, F. ; GRIMALDI, P.; KAPER, F.; LANGIN, T.; DABOUSSI, M. J. *Hop*, an active mutator-like element in the genome of the fungus *Fusarium oxysporum*. **Mol. Biol. Evol.** 20:1362-1375, 2003.

CLEAR, R.M. & PATRICK, S.K. *Fusarium* head blight pathogens isolated from *Fusarium*-damaged kernel of wheat in western Canada, 1993 to 1998. **Canadian Journal of Plant Pathology** 22:51-60. 2000.

COLOT, V.; ROSSIGNOL, J.L. Isolation of the *Ascobolus immersus* spore color gene b2 and study in single cells of gene silencing by methylation induced premeiotically. **Genetics** 141:1299–314. 1995.

DABOUSSI, M. J., LANGIN, T., BRYGOO, Y. *FotI*, a new family of fungal transposable elements. **Molecular General Genetics**, 232: 12-16, 1992.

DABOUSSI, M.J.; LANGIN, T. Transposable elements in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. **Genetica**, v. 93, p. 49-59, 1994.

DABOUSSI, M.J. Fungal transposable elements: generators of diversity and genetic tools. **Journal of Genetics**, v. 75, p. 325-339, 1996.

DABOUSSI, M.J. Fungal transposable elements and genome evolution. **Genetica** v. 100, p. 253-260, 1997.



DABOUSSI, M.J.; CAPY, P. Transposable elements in filamentous fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 275-299, 2003.

DAVIÈRE, J.M.; LANGIN, T.; MAURER, P.; GERLINGER, C.; DABOUSSI, M.J. Chromosomal rearrangements and dispersed repetitive sequences in *Fusarium oxysporum*, p. 141. In **Abstracts of the 3<sup>rd</sup> European Conference on Fungal Genetics**, Münster, Germany. 1996.

DAVIÈRE, J.M.; LANGIN, T.; DABOUSSI, M.J.; Potential role of transposable elements in the rapid reorganization of the *Fusarium oxysporum* genome. **Fungal Genetics and Biology**, v. 34, p. 177-192, 2001.

DEAN et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434:980-986, 2005.

DEBEAUPUIS, J.P.; SARFATI, J.; CHAZALET, V.; LATGÉ, J.P. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. **Infect. Immun.** 65:3080-85. 1997.

DESCHAMPS, F.; LANGIN, T.; MAURER, P.; GERLINGER, C.; FELENBOK, B.; DABOUSSI, M.J. Specific expression of the *Fusarium* transposon *Fot1* and effects on target gene transcription. **Mol. Microbiol.** 31:1373-83. 1999.

DESJARDINS, A. E.; JAROSZ, A. M.; PLATTNER, R. D.; ALEXANDER, N. J.; BROWN, D. W.; JURGENSON, J. E. Patterns of Trichothecene Production, Genetic Variability, and Virulence to Wheat of *Fusarium graminearum* from Smallholder Farms in Nepal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52:6341-6345. 2004.

DILL MACKY, R. & JONES, R.K The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. **Plant Disease** 84:71-76. 2000.

DIOLEZ, A.; MARCHES, F.; FORTINI, D. and BRYGOO, Y. *Boty*, a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Applied and Environmental Microbiology**, 61: 103-108, 1995.

DOAK, T.G.; DOERDER, F.P.; JAHN, C.C.; HERRICK, G. A proposed superfamily of transposase genes: transposon-like elements in ciliated protozoa and a common "D35E" motif. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91:942-946. 1994.

DOBINSON, K.F.; HAMER, J.E. The ebb and flow of a fungal genome. **Trends in Microbiol.** 1: 348-352. 1993.

DOBINSON, K.F.; HARRIS, R.E.; HAMER, J.E. *Grasshopper*, a long terminal repeat (LTR) retroelement in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 6:114-26. 1993b.

DOOHAN, F.M.; MENTEWAB, A. & NICHOLSON, P. Antifungal activity toward *Fusarium culmorum* in soluble wheat extracts. **Phytopathology** 90:666-671. 2000.

EVGEN'S, M.B, ZELENTSOVA H, SHOSTAK, N.; KOZITSINA, M.; BARSKYI, V.; LANKENAU, D.H.; CORCES, V.G. Penelope, a new family of transposable elements and its possible role in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94:196-201. 1997.

FARMAN, M.L.; TOSA, Y.; NITTA, N. and LEONG, S.A. Maggy, a retrotransposon in the genome of the rice blast fungus *Magnaphorte grisea*. **Molecular General Genetics**, 251: 665-674, 1996a.

FERNANDEZ, D.; OINTEN, M.; TANTAOUI, A.; GEIGER, J.P.; DABOUSSI, M.J.; LANGIN, T. *Fot1* insertions in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* genome provide diagnostic PCR targets for detection of the date palm pathogen. **Appl. Environ. Microbiol.** 64:633-36. 1998.

FINNEGAN, D.J. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. **Trends Genetics**, v. 5, p. 103-107, 1989.

FOWLER, T.J.; MITTON, M.F. *Scooter*, a new active transposon in *Schizophyllum commune*, has disrupted two genes regulating signal transduction. **Genetics** 156:1585-94. 2000.

FRANCIS, R.G. & BURGUES, L.W. Characteristics of two populations of *Fusarium roseum* “*graminearum*” in eastern Australia. **Transaction of the British Mycological society** 68(3):421-427. 1977.

FRY, W.E. Principles of plant disease management. New York, **Academic Press**. 1982.

GALAGAN et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature** 422:859-868, 2003.

GILCHRIST, L.; VELASQUEZ, C.; LOPEZ, R.M.; CROSSA, J. & VARGAS, M. Pathogenicity and virulence of eight *Fusarium graminearum* isolates originating in four regions of México. **México CIMMYT**. 1998?a.

GLAYZER, D.C.; ROBERTS, I.N.; ARCHER, D.B.; OLIVER, R.P. The isolation of *Ant1*, a transposable element from *Aspergillus niger*. **Molecular General Genetics**, 249: 432-438, 1995.

GOMEZ-GOMEZ, E.; ANAYA, N.; RONCERO, M. I. G.; HERA, C. *Folyt1*, a new member of the hAT Family, is active in the genome of the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. **Fungal Genetics and Biology**, 27: 67-76, 1999.

GOSWAMI, R.S.; KISTLER, H.C. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, p. 515-525, 2004.

GOYON, C.; ROSSIGNOL, J. L.; FAUGERON, G. Native DNA repeats and methylation in *Ascobolus*. **Nucleic Acids Research**, 24: 3348-3356, 1996.

GRIFFIN, D. H. Fungal Physiology, WILEY-LISS, Nova York, N.Y. 1994.

HOERR, R.J.; CARLTON, W.W.; YAGAN, B. & JOFFE, A.Z. Mycotoxicosis produced in broiler chickens by multiple doses of either T-2 toxin or diacetoxyscirpenol. **Avian Pathology** 11:369-383. 1982.

HUA-VAN, A.; PAMPHILE, J.A.; LANGIN, T.; DABOUSSI, M.J. Transposition of autonomous and engineered *impala* Transposons in *Fusarium oxysporum* and a related species. **Mol Genet**. 264:724-31. 2001a.

HUA-VAN, A.; LANGIN, T.; DABOUSSI, M.J. Evolutionary history of the *impala* transposon in *Fusarium oxysporum*. **Mol. Biol. Evol.** 18:1959–69. 2001b.

HUA-VAN, A.; DAVIÉRE, J.M.; LANGIN, T.; DABOUSSI, M.J. Genome organization in *Fusarium oxysporum*: clusters of class II transposons. **Curr. Genet.** 37:339–47. 2000.

HUA-VAN, A.; HÉRICOURT, F.; CAPY, P.; DABOUSSI, M.J.; LANGIN, T. Three highly divergent subfamilies of the *impala* transposable element coexist in the genome of the fungus *Fusarium oxysporum*. **Mol. Gen. Genet.** 259:354–62. 1998.

IKEDA, K.; NAKAYASHIKI, H.; TAKAGI, M.; TOSA, Y.; MAYAMA, S. Heat shock, copper sulfate and oxidative stress active the retrotransposon *MAGGY* resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 266, p. 318-325, 2001.

INGRAM, P. R.; HOMER, N. Z. M.; SMITH, R. A.; PITT, A. R.; WILSON, C. G.; OLEJNIK, O.; SPICKETT, C. M. The interaction of sodium chlorite with phospholipids and glutathione: a comparasion of effects in vitro, in mammalian and in microbial cells. **Arch. Biochem. Biophys.** 410:121-133. 2003.

JOFFE, A. *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichoides* as principal causes of alimentary toxic aleukia. In: Wyllie, T. D. & Morehouse, L.G. (Ed.). *Handbook of Mycotoxins and Mycotoxinoses*. New York. Marcel Dekker. 3:21-86. 1978.

JULIEN, J.; POIRIER-HAMON, S. and BRYGOO, Y. *Foret-1*, a reverse transcriptase-like sequence in the filamentous fungus *Fusarium oxysporum*. **Nucleic Acids Research**, 20: 3933-3937, 1992.

KACHROO, P.; LEONG, S.A.; CHATTOO, B.B. *Pot2*, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Mol. Gen. Genet.** 245:339–48. 1994.

KANG, S.; LEBRUN, M.H.; FARRAL, L.; VALENT, B. Gain of virulence caused by insertion of a *Pot3* transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 14:671–74. 2001.

KEMPKEN, F.; KÜCK, U. Tagging of a nitrogen pathway-specific regular gene in *Tolypocladium inflatum* by the transposon *Restless*. **Mol. Gen. Genet.** 263:302-308. 2000.

KEMPKEN, F. Fungal Transposons: from mobile elements towards molecular tools. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 52:756-760. 1999.

KEMPKEN, F.; KÜCK, U. Transposons in filamentous fungi - facts and perspectives. **Bioessays**, v. 20, p. 652-659, 1998.

KEMPKEN, F.; SCHREINER, C.; SCHÖRGENDORFER, K.; KÜCK, U. A unique repeated DNA sequence in the cyclosporin-producing strain of *Trypocladium inflatum* (ATCC 34921). **Exp Mycol** 19:305-313. 1995.

KIDWELL, M.G.; LISCH, D.R. Transposable elements as sources of genomic variation. ASM Press, Washington, DC. 21:59-90. 2002.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia**: volume2: Doenças de Plantas Cultivadas. São Paulo, SP. Ed. Agronômica Ceres Ltda. p: 725-735. 1997.

KINSEY, J.A.; HELBER, J. Isolation of a transposable element from *Neurospora crassa*. **Proc. Natl. Acad. Sci.USA** 86:1929-33. 1989.

KISTLER, H.C.; MIAO, V.P. New modes of genetic change in filamentous fungi. **Annu. Rev. Phytopathol.** 30:131-152. 1992.

KITO, H.; TAKAHASHI, Y.; SATO, J.; FUKIYA, S.; SONE, T.; TOMITA, F. *Occan*, a novel transposon in the *FotI* family, is ubiquitously found in several *Magnaporthe grisea* isolates. **Curr. Genet.** 42:322-331. 2003.

KODAMA, M.; ROSE, M.S.; YANG, G.; YUN, S.H.; YODER, O.C.; TURGEON, B.G. The translocation-associated *Tox1* locus of *Cochliobolus heterostrophus* is two genetic elements on two different chromosomes. **Genetics** 151:585-96. 1999.

LÁDAY, M.; JUHÁSZ, Á.; MULÈ, G.; MORETTI, A.; SZÉCSI, Á.; LOGRIECO, A. Mitochondrial DNA diversity and lineage determination of European isolates of *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*). **European Journal of Plant pathology**. 110:545-550, 2004.

LADEVEZE, V.; AULARD, S.; CHAMINADE, N.; PERIQUET, G.; LEMEUNIER, F. *Hobo* transposons causing chromosomal breakpoints. **Proc. R. Soc. London Sci. Ser. B** 265:1157-59. 1998.

LAHN, B.T.; PAGE, D.C. Four evolutionary strata on the human X chromosome. **Science** 286:964-67. 1999.

LAI, C. Genetic applications of transposable elements in eukaryotes. **Genome**, v. 37, p. 519-525, 1994.

LANGIN, T.; CAPY, P.; DABOUSSI, M.J. The transposable element *impala*, a fungal member of the *Tc1-mariner* superfamily. **Molecular and General Genetics**, v. 246, p. 19-28, 1995.

LEVIS, C., FORTINI, D., BRYGOO, Y. *Flipper*, a mobile *Fot1*-like transposable element in *Botrytis cinera*. **Molecular General Genetics**, 254: 674-680, 1997.

LONG, G.G.; DIEKMAN, M.; TUIITE, J.F.; SHANNON, G.M. & VESONDER, R.F. Effects of *Fusarium roseum* corn culture containing zearalenone on early pregnancy in swine. **American Journal of Veterinary Research** 43:1599-1603. 1982.

MARGOLIN, B. S.; GARETT-ENGELE, P. W.; STEVENS, J. N.; FRITZ, D. Y.; GARETT-ENGELE, C. METZENBERG, R. L.; SELKER, E. U. A methylated *Neurospora* 5S rRNA contains a transposable element inactivated by repeat-induced point mutation. **Genetics** 149:1787-1797. 1998.

MARZLUF, G. A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in fungi. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 61:17-32. 1997.

McCLINTOCK, B. The significance of responses of the genome to challenge. **Science**, v. 226, p. 792-801, 1984.

McMULLEN, M.; JONES, R.; GALLENBERG, D. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. **Plant Disease**, v. 81, p. 1340:1348, 1997.

MES, J.J.; HARING, M.A.; CORNELISSEN, B.J.C. Foxy: an active family of short interspersed nuclear elements from *Fusarium oxysporum*. *Mol. Gen. Genet.* 263:271-280. 2000.

MESTERHAZY, A. Breeding of resistance to fusarium head blight of wheat. In Dubin, H.J.; Gilchrist, L.; Reeves, J.; McNab, a. eds. *Fusarium Head Blight: global status and future prospects*. Mexico. **CIMMYT**. 1997.

MESTERHAZY, A. Types and components of resistance to fusarium head blight of wheat. **Plant Breeding** 114:377-386. 1995.

MIEDANER, T.; SCHILLING, A.G. Genetic variation of aggressiveness in individual field populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* tested on young plants of winter rye. **European Journal of Plant Pathology** 102:823-830. 1996.

MIGHELI, Q.; STEINBERG, C.; DAVIÈRE, J.M.; OLIVAIN, C.; GERLINGER, C.; GAUTHERON, N.; ALABOUVETTE, C.; DABOUSSI, M.J. Recovery of mutants impaired in pathogenicity after transposition of impala in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis*. **Phytopathology** 90:1279-1284. 2000.

MIGHELI, Q.; LAUGÉ, R.; DAVIÈRE, J.M.; GERLINGER, C.; KAPER, F.; LANGIN, T.; DABOUSSI, M.J. Transposition of the autonomous *Fot1* element in the filamentous fungus *Fusarium oxysporum*. **Genetics**, v. 151:1005-1013. 1999.

MILLER, J. D.; ARNISON, P. G. Degradation of deoxynivalenol suspension cultures of the *Fusarium* head blight resistant wheat cultivar Frontana. **Canadian Journal of Plant Pathology** 8:147-150. 1986.

MORRILLON, A.; SPRINGER, M.; LESAGE, P. Activation of *Kss1* invasive-filamentous growth pathway induces *Ty1* transcription and retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, p. 5766-5776, 2000.

MOUYNA, I.; RENARD, J.L.; BRYGOO, Y. DNA polymorphism among *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaedis* populations from oil palm, using a repeated and dispersed sequence "Palm." **Curr. Genet.** 30:174–80. 1996.

MURATA, H.; MIYAZAKI, Y.; BABASAKI, K.; The long terminal repeat (LTR) sequence of *marY1*, a retroelement from the ectomycorrhizal homobasidiomycete *Tricholoma matsutake*, is highly conserved in various higher fungi. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 65:2297-2300. 2001.

MURATA, H.; YAMADA, A. *marY1*, a member of the *gypsy* group of long terminal repeat retroelements from the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake*. **Applied Environmental Microbiology**, 66: 3642-3645, 2000.

NAKAYASHIKI, H.; KIYOTOMI, K.; TOSA, Y.; MAYAMA, S.; Transposition of the retrotransposon *MAGGY* in heterologous species of filamentous fungi. **Genetics** 153:693-703. 1999.

NELSON, P.E.; TOUSOUN, T.A. & MARASAS, W.F. *Fusarium species*. An illustrated manual for identification. London. **The Pennsylvania State University Press**. 1983.

NEUVÉGLISE, C.; SARFATI, J.; LATGÉ, J.P.; PARIS, S. *Afut1*, a retrotransposon-like element from *Aspergillus fumigatus*. **Nucleic Acids Research**, v. 34:1428-1434. 1996.

NICHOLSON, P.; SIMPSON, D.R.; WESTON, G.; REZANOOR, H.N.; LEES, A.K.; PARRY, D.W.; JOYCE, D. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 53:17-37. 1998.

NICOSIA, M.G.L.D.; BROCARD-MASSON, C; DEMAIS, S.; HUA-VAN, A.; DABOUSSI, M.J.; SCAZZOCCHIO, C. Heterologous transposition in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, v. 39, p. 1330-1344. 2001.

NISHIMURA, M.; HAYASHI, N.; JWA, N.S.; LAU, G.W.; HAMER, J.E.; HASEBE, A. Insertion of the LINE retrotransposon MGL causes a conidiophore pattern mutation in *Magnaporthe grisea*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 13:892–94. 2000.



NYSSÖNEN, E., AMUTAN, M., ENFIELD, L., STUBBS, J., DUNN-COLEMAN, N. S. The transposable element *tan1* of *Aspergillus niger* var. *awamori*, a new member of the *Fot-1* family. **Molecular General Genetics**, 253: 50-56, 1996.

O'DONELL, K.; WARD, T. J.; GEISER, D. M.; KISTLER, H. C.; AOKI, T. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. **Fungal Genetics and Biology**. 41:600-623, 2004.

OLIVER, R.P. Transposons in filamentous fungi, pp. 3-11. 1992. In: **Molecular Biology of filamentous fungi**, edited by: STAHL, U., TUDZYNSKI, P. Proceedings of the EMBO-Workshop, Berlin 1991.

ORBACH, M.J.; FARRALL, L.; SWEIGARD, J.A.; CHUMLEY, F.G.; VALENT, B. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. **Plant Cell** 12:2019-32. 2000.

PANACCIONE, D.G.; PITKIN, J.W.; WALTON, J.D. Annis SL. Transposon-like sequences at the *TOX2* locus of the plant pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. **Gene** 176:103-9. 1996.

PANISSON, E. Giberela em trigo: intensidade, danos e controle químico. (Dissertação de mestrado) Passo Fundo, RS, Universidade de Passo Fundo. 2001.

PAQUIM, C.E.; WILLIAMSON, V.M. Effect of temperature on Ty transposition. In: **Eukaryotes transposable elements as mutagenic agents**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, p. 235-240, 1988.

PARRY, D.W.; JENKINSON, P. & McLEOD, L. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals – a review. **Plant Pathology** 44:207-238. 1995.

PERAICA, M.; RADIĆ, B.; LUCIĆ, A.; PAVLOVIĆ, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 9, p. 754-766, 2000.

PEREIRA, J.F.; ARAÚJO, E.F.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; QUEIROZ, M.V. Elementos transponíveis em fungos fitopatogênicos. **Revisão anual de patologia de plantas**, 14:303-362, 2006.

PEREIRA, J.F.; LIMA, J.O.; ROCHA, R.B.; MEDINA, P.X.L.; ARAÚJO, E.F.; QUEIROZ, M.V. Nitrato redutase em fungos filamentosos. **Biotechnolog. Cienc. Desenvol.** 31:74-85. 2003.

PÉREZ-ORTIN, J.E.; QUEROL, A.; PLUIG, S.; BARRIO, E. Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. **Genome Res.** 12:1533-39. 2002.

POMERANZ, Y.; BECHTEL, D.B.; SAUER, D. B. & SEITZ, L.M. Fusarium head blight (scab) in cereal grains. **Advanced Cereal Science Technology** 10:373-433. 1990.

PURSS, G.S. Pathogenic specialization in *Fusarium graminearum*. **Australian Journal of Agricultural Research** 22:553-561. 1971.

QUEIROZ, M.V.; DABOUSSI, M.J. *Impala*, a transposon from *Fusarium oxysporum*, is active in the genome of *Penicillium griseoroseum*. **FEMS Microbiology Letters**, 218:317-321. 2003.

REIS, E.M.; CASA, R.T.; MEDEIRA, C.A. **Diagnose, patometria e controle de doenças de cereais de inverno**. Londrina, PR. ES Comunicação S/C Ltda. 2001.

REIS, E.M.; BLUM, M.M.C. & CASA, R.T. Controle químico de *Gibberella zeae* em trigo, um problema de deposição de fungicidas em anteras. **Summa Phytopathologica** 22:39-42. 1996a.

REIS, E.M.; BLUM, M.M.C.; CASA, R.T.; MEDEIROS, C.A. Grain losses caused by the infection of wheat heads by *Gibberella zeae* in southern Brazil, from 1984 to 1994. **Summa Phytopathologica**, v. 22, p. 134-137, 1996b.

REIS, E.M. Caracterização da população de *Fusarium graminearum* ocorrente no Sul do Brasil. **Fitopatologia Brasileira** 11:527-533. 1986.

REIS, K. C. P. Mutagênese insercional em *P. griseoroseum* mediada pelo transposon *impala* de *F. oxysporum*. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa - UFV. 2002.

RIVADENEIRA, M. Variabilidade de *Fusarium spp.* Agente Etiológico de giberela em trigo e identificação de fontes de resistência a fusariose da espiga em trigos sintéticos. Dissertação, Mestrado em Agronomia/Fitopatologia. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Passo Fundo. 2001.

RUIZ-PÉREZ, V.L. MURILLO, F.J.; TORRES-MARTINEZ, S. *Prt1*, an unusual retrotransposon-like sequence in fungus *Phycomyces blakesleeana*. **Mol. Gen. Genet.** 253:324-333. 1996.

SAEDLER, H.; GIERL, A. Transposable elements. **Springer**, Berlin Heidelberg New York. 1996.

SCHOROEDER, H.W. & CHRISTENSEN, J.J. Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. **Phytopathology** 53:831-838. 1963.

SHULL, V.; HAMER, J.E. Genetic differentiation in the rice blast fungus revealed by the distribution of the *fosbury* retrotransposon. **Fungal Genetics and Biology**, v. 20, p. 59-69, 1996.

SNIJDERS, C.H.A. & PERKOWSKI, J. Effects of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels. **Phytopathology** 80:566-570. 1990.

SONE, T.; SUTO, M.; TOMITA, F. Host species-specific repetitive DNA sequence in the genome of *Magnaporthe grisea*, the rice blast fungus. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 57:1228-1230. 1993.

SUTTON, J.C. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology** 4:195-209. 1982.

TÓTH, B.; MESTERHÁZY, A.; HORVÁTH, Z.; BARTÓK, T.; VARGA, M.; VARGA, JÁNOS. Genetic variability of central European isolates of the *Fusarium graminearum* species complex. **European Journal of Plant Pathology**. 112:35-45. 2005.

TUITE, J.; SHANER, G. & EVERSON, J. Wheat scab in soft red winter wheat in Indiana in 1986 and its relation to some quality measurements. **Plant Disease** 74:959-962. 1990.

VILLALBA, F.; LEBRUN, M.H.; HUA-VAN, A.; DABOUSSI, M.J.; GROSJEAN-COURMOYER, M.C. Transposon *Impala*, a novel tool for gene tagging in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 14:08-15. 2001.

YEADON, P. J., CATCHESIDE, D. E. A. Guest: a 98 bp inverted repeat transposable element in *Neurospora crassa*. **Molecular General Genetics**, 247: 105-109, 1995.

WALKER, S.L.; LEATH, S.; HAGLER, W.M.; MURPHY, J.P. Variation among isolates of *Fusarium graminearum* associated with *fusarium* head blight in North Carolina. **Plant Disease** 85:404-410. 2001.

WIESE, M.V. Compendium of wheat diseases. 2<sup>nd</sup> edition. St. Paul. Minnesota. **APS**. 1987.

WINDELS, C.E. Economic and social impacts of Fusarium Head Blight changing farms and rural communities in northern great plains. **Phytopathology** 90(1): 17-21. 2000.

WÖSTEMEYER, J.; KREIBICH, A. Repetitive DNA elements in fungi (mycota): impact on genomic architecture and evolution. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 5:814-82. 2002.

ZELLER, K. A.; BOWDEN, R. L.; LESLIE, J.F. Population differential and recombination in wheat scab population of *Gibberella zeae* from the United States. **Molecular Ecology**. 13:563-571. 2004.

ZHANG, L.; DAWSON, A.; FINNEGAN, D.J. DNA-binding activity and subunit interaction of the mariner transposase. **Nucleic Acids Res.** 29:3566-3575. 2001.

ZHOU, Y.; CAMBARERI, E.B.; KINSEY, J.A. DNA methylation inhibits expression and transposition of the *Neurospora Tad* retrotransposon. **Mol. Genet. Genomics** 265:748-54. 2001.

## **CAPÍTULO I**

**DETECÇÃO DE ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS EM *Fusarium graminearum*,  
AGENTE CAUSAL DA GIBERELA DO TRIGO.**

## RESUMO

O fungo *Fusarium graminearum* (teleomorfo *Gibberella zeae*) é o agente etiológico da giberela do trigo, atualmente uma das principais doenças em cereais de inverno no Brasil. Vários estudos demonstram uma grande diversidade genética em isolados de *F. graminearum* provenientes de diferentes áreas geográficas, como também em isolados de uma mesma localidade. Em fungos filamentosos como o *F. graminearum*, uma das principais fontes de mutações, capazes de gerar alta variabilidade genética, são os elementos transponíveis ou transposons. Essas mutações algumas vezes estão envolvidas com a quebra de resistência, fenômeno importante para o surgimento de epidemias. Com o objetivo de detectar putativas seqüências de elementos transponíveis no genoma deste patógeno, foram construídos oligonucleotídeos específicos para amplificação, via PCR, de seqüências características destes elementos transponíveis. Foram utilizados 14 isolados de *F. graminearum*, provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo e um total de 10 pares de oligonucleotídeos foram construídos (6 pares para genes que codificam a enzima transposase, 3 pares para genes que codificam a enzima transcriptase reversa e 1 par para um gene que codifica a proteína GAG). Dos 10 pares de oligonucleotídeos utilizados, o par que amplificaria uma região de transcriptase reversa similar ao mesmo gene de *Magnaporthe grisea* não amplificou nenhum fragmento nos isolados utilizados, e o par que amplificaria uma região de transposase similar ao mesmo gene de *Metarhizium anisopliae* originou muitos fragmentos de diferentes tamanhos não condizentes com o tamanho esperado de 683 pb. Dos oito pares de oligonucleotídeos restantes, cinco amplificaram as regiões esperadas para a transposase (regiões de 715 pb similar a uma transposase de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, 306 pb similar a uma transposase de *Aspergillus awamori*, 556 pb similar a uma transposase de *A. niger*, 339 pb similar a uma transposase de *Arabidopsis thaliana* e 554 pb similar a uma transposase de *Cochliobolus carbonum*), dois amplificaram as regiões de transcriptase reversa (regiões de 161 pb similar a uma transcriptase reversa de *A. thaliana* e 752 pb similar a uma transcriptase reversa de *Caenorhabditis elegans*) e um amplificou um fragmento de tamanho esperado de 581 pb similar ao gene *gag* de *F. oxysporum*. A amplificação ocorreu, mesmo que para diferentes pares de oligonucleotídeos, em todos os 14 isolados analisados, confirmando a presença de seqüências putativas de elementos transponíveis em isolados de *F. graminearum* provenientes de diferentes regiões do Brasil, além de demonstrar uma diversidade de classes de putativos elementos, uma vez que cada seqüência é característica de um determinado grupo de elementos transponíveis.

**Palavras chave:** *Fusarium graminearum*, trigo, transposons, variabilidade genética.

## ABSTRACT

The fungi *Fusarium graminearum* (teleomorph *Gibberella zeae*) is the etiological agent of scab wheat, one of the most important cereal's winter diseases in South Brazil. Some studies demonstrate a high genetic diversity in *F. graminearum* from different geographic areas, as well as in isolates at the same locality. In filamentous fungi, as the *F. graminearum*, one of the main mutation's causes is the transposable elements or transposons which are capable to generate different types of mutations. In some cases, these mutations are involved with the resistance break, an important phenomenon for the occurrence of epidemics. The objectives of this study were to detect putative transposable elements sequences in the *F. graminearum* genome, as well as to develop and to analyze adequate procedures for co-transformation of brazilin isolates of this fungi with the vectors *pNII60*, which carry the transposon *impala* and *pAN7.1*, which code to hygromycin B resistance. To detect putative sequences of transposable elements in the *F. graminearum* genome, specific oligonucleotides were constructed and 14 isolates, originated from the States of Rio Grande do Sul, Paraná and São Paulo were used. A total of 10 oligonucleotides pairs were constructed (6 oligonucleotides pairs were specific to transposase, 3 to transcriptase reverse and 1 to gene that code for GAG protein). Considering these 10 oligonucleotides pairs, the one that would amplify a transcriptase reverse region similar to a *Magnaporthe grisea* reverse transcriptase did not amplify any fragment in the isolates total DNA, and the pair that would amplify a transposase region similar to *Metarhizium anisopliae* originated many fragments of different sizes that do not show relation with 683 bp expected size fragment. Considering the eight oligonucleotides pairs remained, five of them amplified the expected fragments for transposase (715 bp region similar to *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* transposase, 306 bp similar to *Aspergillus awamori* transposase, 556 bp similar to *A. niger* transposase, 339 bp similar to *Arabidopsis thaliana* transposase and 554 bp similar to *Cochliobolus carbonum* transposase), two of them amplified the transcriptase reverse fragments (161 bp similar to *A. thaliana* reverse transcriptase and the 752 bp similar to *Caenorhabditis elegans* reverse transcriptase) and one oligonucleotide pair amplified an 581 bp expected size fragment similar to *F. oxysporum* *gag* gene. The amplification occurred, even for different oligonucleotides pairs, in all 14 analyzed isolates confirming the presence of transposable elements putative sequences in Brazilian isolates of *F. graminearum*. This also shows a diversity of groups of these putative elements, considering that some of the sequence amplified is characteristic of a transposable element specific group.

**Keywords:** *Fusarium graminearum*, wheat, transposons, genetic variability.

## 1. INTRODUÇÃO

O fungo *Fusarium graminearum* (teleomorfo *Gibberella zeae*) é o agente etiológico da giberela do trigo, atualmente uma das principais doenças em cereais de inverno no Brasil. Apesar deste fungo ter sido encontrado em todas as principais regiões agrícolas do mundo, pouco se sabe sobre a estrutura populacional de isolados de *F. graminearum* de diferentes áreas geográficas (Carter et al., 2002). Estudos ao redor do mundo, utilizando-se de vários tipos de marcadores morfológicos e moleculares, demonstram uma grande diversidade genética em isolados de *F. graminearum* provenientes de diferentes áreas geográficas, como também em isolados de uma mesma localidade (Akisanmi et al., 2006; Láday et al., 2004; O'Donnell et al., 2004; Gilbert et al., 2001; Walker et al., 2001; Carter et al. 2000).

Apesar da reprodução sexual ter um papel importante na geração de variabilidade genética em *F. graminearum*, outros fatores podem estar relacionados. Em fungos filamentosos como o *F. graminearum*, uma das principais fontes de mutações, capazes de gerar alta variabilidade genética, são os elementos transponíveis ou transposons (Daboussi & Capy, 2003). Essas mutações algumas vezes estão envolvidas com a quebra de resistência, fenômeno importante para o surgimento de epidemias.

Os elementos transponíveis podem ser definidos como seqüências de DNA moderadamente repetitivas que podem mover-se de um local a outro no genoma e desta maneira, ter um profundo impacto na estrutura e função dos genes, bem como na organização dos cromossomos na espécie (Daboussi, 1997). De acordo com o mecanismo de transposição,



os elementos transponíveis são agrupados em duas classes, *Classe I* que transpõe por meio de um RNA intermediário pela ação da enzima transcriptase reversa, e *Classe II* necessita da atividade da enzima transposase (Finnegan, 1989). A *Classe I* é subdividida em duas subclasses, a *Subclasse I* que contém os retroelementos com LTR (*Long Terminal Repeats*) e que são comumente chamados de retrotransposons, e as *Subclasse II* que contém os retroelementos que não apresentam LTR. Os retrotransposons lembram os retrovírus, pois além de carregar as LTR, também possuem regiões análogas à *gag* (que codifica as proteínas da cápsula viral) e *pol* que codifica as enzimas transcriptase reversa, RNase H, integrase e protease, que de acordo com a ordem dos genes nesta região, são classificados em diferentes grupos. Os elementos da *Classe II* possuem pequenas repetições terminais invertidas e codificam a transposase, enzima relacionada com a transposição. (Finnegan, 1989). Os transposons podem ser utilizados para o conhecimento da estrutura genética de populações naturais (Daboussi, 1997), fator interessante para revelar as modificações que diferentes populações de *F. graminearum* podem sofrer e os diferentes tipos de indivíduos que estão surgindo.

O genoma de *F. graminearum* foi recentemente seqüenciado, e está acessível através do site <http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fusarium/index.html>. A disponibilidade desta ferramenta facilita a busca por seqüências que apresentam similaridade com regiões características de elementos transponíveis de outros organismos, como por exemplo, a transposase, a transcriptase reversa e o gene *gag* entre outros.

No Brasil, estudos de estrutura genética de populações de *F. graminearum* e análises de diversidade são raros, tendo sido recentemente reportados estudos preliminares de caracterização molecular de isolados oriundos de trigo no Estado do Paraná (Angelotti et al., 2004; Busso 2005). Baseado na falta de estudos moleculares de *F. graminearum* no Brasil, o objetivo deste trabalho foi construir oligonucleotídeos específicos para diferentes tipos de

elementos transponíveis em *F. graminearum* e utilizá-los para detecção destes elementos em diferentes isolados brasileiros deste patógeno.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Isolados utilizados

Para o estudo da presença e distribuição de elementos transponíveis em *F. graminearum* foram utilizados 14 isolados monospóricos de diferentes regiões do Brasil, obtidos no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Trigo. Esses isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA [Batata Dextrose Agar - 140g de batata, 10g de açúcar, 15g de ágar e 1000 mL de água destilada] e conservados a 4°C. As informações relacionadas a data de coleta, local, espécies e cultivar onde foram coletados cada isolado estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Isolados de *F. graminearum* utilizados neste trabalho.

Isolado	Data isolamento	Espécie	Cultivar	Cidade de origem
1	2005	trigo	CD 108	Cascavel/PR
2	2005	trigo	CD 108	Cascavel/PR
3	2005	trigo	JPF78191	Londrina/PR
4	2005	trigo	PF 015542-A	Londrina/PR
5	2005	trigo	PF040007	Cândido Mota/SP
6	2005	trigo	Aliança	Cândido Mota/SP
7	2005	trigo	LD 0221	Londrina/PR
8	2005	trigo	IWT04012	Londrina/PR
9	2003	trigo	BR 18 Terena	São Borja/RS
10	2003	trigo	BRS Angico	São Luiz Gonzaga/RS
11	2003	trigo	BR 23	São Borja/RS
12	2003	trigo	Parcela 347782	Santa Rosa/RS
13	2003	trigo	BR 18 Terena	Santa Rosa/RS
14	2003	trigo	Parcela 347765	Santa Rosa/RS

## 2.2. Construção dos oligonucleotídeos

As seqüências de elementos transponíveis de *F. graminearum* foram selecionadas no banco de dados do projeto genoma do fungo ([www.broad.mit.edu/annotation/fungi/index.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/index.html)) pela similaridade com as enzimas transcriptase reversa, transposase e GAG. As análises de similaridade foram feitas com o programa *Blast* (disponível em [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). Os oligonucleotídeos foram construídos utilizando-se o programa Primer3 disponível em <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3.cgi> (Rozen & Skaletsky, 2000), a partir das seqüências selecionadas que apresentaram menores e-value quando alinhadas com seqüências de transposons de outros organismos. Os oligonucleotídeos utilizados estão listados na Tabela 2, juntamente com informações relacionadas a região amplificada, tamanho do fragmento esperado, microorganismo que apresenta similaridade, seqüência dos nucleotídeos e temperatura de anelamento.

## 2.3. Obtenção de massa micelial

Para obtenção de massa micelial para extração de DNA, cinco discos de 4,5 mm de diâmetro foram retirados de placas contendo o micélio fúngico crescido em meio BDA e transferidos para Erlenmeyers de 250 ml contendo 100 mL de meio de batata (BD) enriquecido [140g de ágar de batata, 10 g de açúcar, 2 g de extrato de levedura, 2 g de peptona, 0,01 g de FeSO<sub>4</sub> e 0,01 g de ZnSO<sub>4</sub>, 0,1 g de sulfato de estreptomicina, pH 6,8]. Os Erlenmeyers foram incubados a 25 °C de temperatura sob agitação de 120 rpm, por um período de 5 dias. Os micélios produzidos foram filtrados com o auxílio de gaze, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C.

## 2.4. Extração de DNA

A extração do DNA total dos isolados foi realizada conforme metodologia descrita por Specht et al. (1982). Para o processo de extração, o micélio armazenado foi triturado em nitrogênio líquido com auxílio de cadinho e pistilo, até obter-se um pó fino que foi transferido para tubos de 1,5 mL até completar cerca de 1/3 do tubo. Em cada tubo foi adicionado 500 µL de tampão de extração pré-aquecido a 70 °C [Tris-HCl 200 mM pH 8.0; NaCl 250 mM, EDTA 50 mM; SDS 2%] sendo os tubos levados ao banho-maria a 70 °C por 30 minutos. Após este período foi adicionado 400 µL de acetato de potássio 5M e incubado em banho de gelo por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, onde foi adicionado 500 µL de fenol-clorofórmio álcool-isoamílico (25 : 24 : 1) e invertido suavemente por 5 minutos alterando temperatura ambiente e gelo. As amostras foram centrifugadas novamente a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. A parte superior foi retirada evitando-se a parte branca contendo proteínas e transferida para novo tubo de 1,5 mL, onde foi adicionado igual volume de isopropanol (aproximadamente 800-900 µL) e invertido suavemente. As amostras foram deixadas em repouso em temperatura ambiente por 10 minutos (nesta etapa o material pode ser armazenado a -20 °C para continuar a extração posteriormente). Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O isopropanol foi descartado com cuidado para não se perder o precipitado do fundo do tubo, o mesmo foi lavado com 100 a 150 µL de etanol 70%. Após a lavagem, as amostras foram levadas novamente a centrífuga para dar um “spin” a fim de retirar o excesso do etanol e deixar o precipitado secar. O precipitado foi ressuscitado em 25 µL de água milli-Q ou TE [Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0] misturado com RNase A (10 mg.mL<sup>-1</sup>), e incubado por 60 minutos a 37 °C.

A Quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e as amostra diluídas a  $25 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ , para serem utilizadas nas reações de amplificação por PCR.

## 2.5. Reação de PCR

As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador PTC-100 (MJ Research) em um volume final de  $25 \mu\text{L}$ , contendo tampão da enzima 1X,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, dNTP 0,2 mM cada, oligonucleotídeos 5  $\mu\text{M}$  cada, *Taq* DNA polimerase uma unidade, e DNA 50 ng. Os programas utilizados para amplificação possuíam um passo de desnaturação inicial de 3 minutos a  $94^\circ\text{C}$ , 40 ciclos de  $94^\circ\text{C}$  por 45 segundos,  $50^\circ\text{C}$ ,  $55^\circ\text{C}$ , ou  $59^\circ\text{C}$  (dependendo das características dos oligonucleotídeos) por 45 segundos e  $72^\circ\text{C}$  por 60 segundos, e uma extensão final de 3 minutos a  $72^\circ\text{C}$ . Antes da amplificação dos DNAs com os oligonucleotídeos construídos neste estudo, a qualidade do DNA extraído foi verificada pela amplificação da região ITS do rDNA. Os produtos das amplificações foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

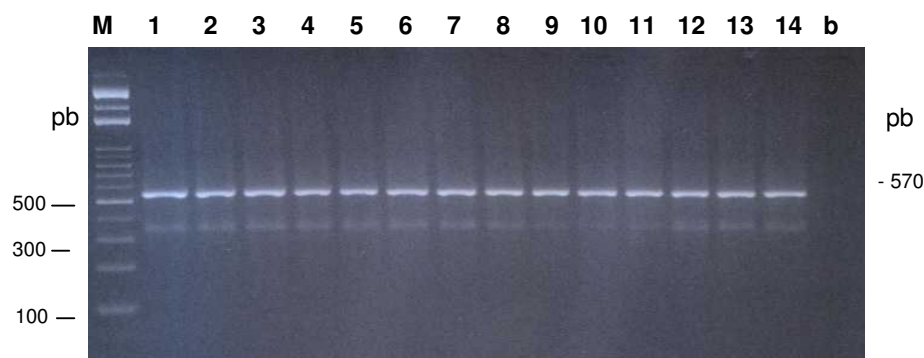
**Tabela 2.** Lista de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) selecionados, genes, espécie com quem apresentam similaridade na sequência do gene, número de pares de bases esperado na amplificação da região alvo, sequências dos pares de oligonucleotídeos e temperatura de anelamento.

<b>Primers</b>	<b>Genes</b>	<b>Espécies com quem apresenta similaridade na sequência alvo</b>	<b>Número de pares de bases esperado</b>	<b>Left</b>	<b>Right</b>	<b>Tm (°C)</b>
TFoxy	Transposase	<i>Fusarium oxysporum f. sp. ciceris</i>	715	TCGAGAGAAGGCTTTTCAGC	ATCGAGCGGCTGAGTAATGT	59
Tanig	Transposase	<i>Aspergillus niger</i>	556	TGCTTGACGGACTTTGTCAC	ACCTCCGTTCTGTAGCAGA	55
Tatha	Transposase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	369	GCAGTGGCCACCTAAATGTT	TGGCATTTGGAACACCTTTT	55
Tmani	Transposase	<i>Metarhizium anisopliae</i>	683	AGCTGTCCAGCGAGATGAAT	AGCTGACGAGGCCACTTTTA	55
Taawa	Transposase	<i>Aspergillus awamori</i>	306	TGAGTGGTTTCTCGGCTTCT	GAACAGCTTTTTCCTCCTCAA	55
Tccar	Transposase	<i>Cochliobolus carbonum</i>	554	TCGGCAAGAACTGGGTAGAC	TTTCATCAATTCCGGTGTTGA	55
RTcele	Transcriptase reversa	<i>Caenorhabditis elegans</i>	752	TTCACCACCACCACTCGTTA	ACAAGAACCGTGCCGTTATC	59
RTmgris	Transcriptase reversa	<i>Magnaporthe grisea</i>	318	GAAAGCAGCGTCTTCACTCC	AAGATGTGGTCCGGTGCTT	59
RTatha	Transcriptase reversa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	161	CAGGCCATGTCGTTATGTTG	TTGGCCATTCTCTGTTTGA	55
Gfoxy	GAG	<i>Fusarium oxysporum</i>	581	GAGAAATTCTTAAGCCTAACC	AGGGAAATTCAGTTATTTT	55

### 3. RESULTADOS

Durante a busca de seqüências no banco de dados do projeto genoma de *F. graminearum* foi observado, ainda na seleção das seqüências que, centenas de seqüências, principalmente de transposase e transcriptase reversa, foram obtidas pela similaridade com os mesmos genes em outros organismos, inclusive em muitos geneticamente distantes ao *F. graminearum*. Das centenas de seqüências disponíveis, foram selecionadas inicialmente 50 destas que apresentaram maior similaridade com o *F. graminearum*. Um total de 10 pares de oligonucleotídeos foram construídos, sendo 6 para amplificação de transposases, 3 para amplificação de transcriptase reversa e um para o gene da GAG.

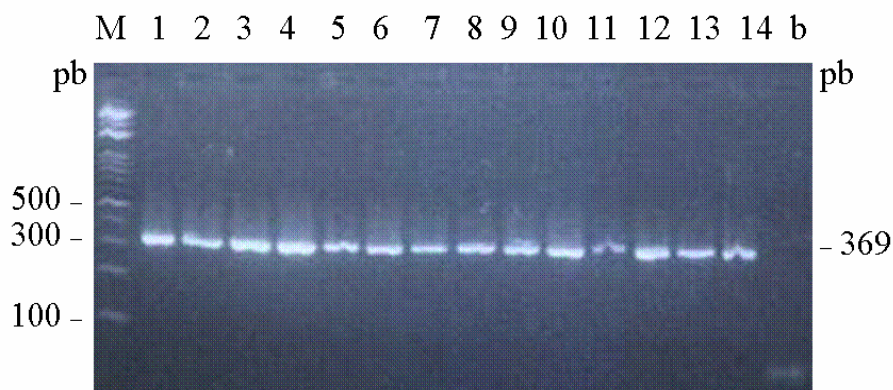
A qualidade do DNA extraído foi avaliada pela amplificação da região ITS do rDNA. A amplificação de um fragmento de 570 pb, tamanho semelhante ao relatado para a região ITS de *F. graminearum* segundo Schilling et al. (1996), em todos os isolados, indica a boa qualidade do DNA extraído.



**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da amplificação da região ITS do rDNA como controle da qualidade do DNAs dos isolados. Números 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica marcador de tamanho (Ladder 100 pb). “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho dos fragmentos amplificados.

Para detectar presença de putativos elementos transponíveis da *Classe II* (transposons de DNA) no genoma de *F. graminearum*, 6 pares de oligonucleotídeos (*primers*) foram construídos com base na similaridade encontrada entre regiões do genoma deste fungo, com o gene da transposase (característico da *Classe II*) de outros microorganismos.

Os oligonucleotídeos *Tatha 1* e *Tatha 2* amplificaram um fragmento de tamanho esperado de 369 pb, contendo parte da transposase em todos os isolados testados (Figura 2), indicando a ubiquidade do putativo elemento que carrega esta sequência em *F. graminearum*. Esta região apresenta similaridade com o gene de uma transposase de *Arabidopsis thaliana*.



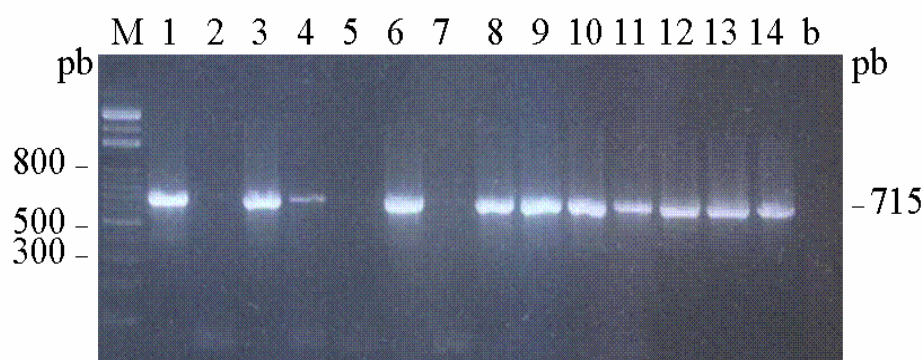
**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação originados a partir dos diferentes oligonucleotídeos construídos neste trabalho. Amplificação de uma região de 369 pb com similaridade ao gene que codifica uma transposase de *Arabidopsis thaliana*. Números de 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica o marcador de tamanho (Ladder 100pb) e “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho dos fragmentos amplificados.

Utilizando os oligonucleotídeos *Tfoxy 1* e 2, um fragmento de DNA de tamanho esperado (715 pb) contendo parte da transposase foi amplificado em todos isolados com exceção dos isolados 2, 5 e 7, indicando que o putativo elemento está presente na maioria dos isolados de *F. graminearum* analisados (Figura 3). A região amplificada de 715 pb tem similaridade ao gene que codifica uma transposase de *F. oxysporum f. sp. ciceris*.

A ausência de amplificação em três isolados e a amplificação de um fragmento com menor intensidade no isolado 4, pode ser indício de diferentes números de cópias deste

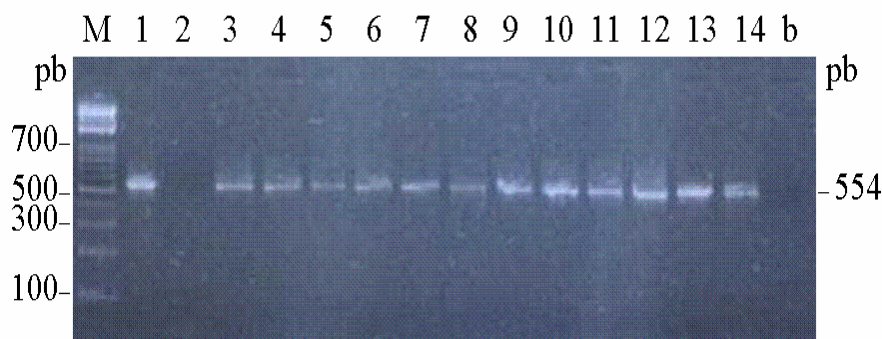


putativo elemento, além da simples ausência deste elemento. Enquanto a amplificação ocorreu em todos os isolados oriundos do Rio Grande do Sul (9 a 14), região onde ocorre maior incidência da doença, os isolados de Cascavel (1 e 2), Londrina (3, 4, 7 e 8) e Cândido Mota/SP (5 e 6) tiveram resultados contrastantes, onde metade apresentou a amplificação do fragmento e outra metade não.



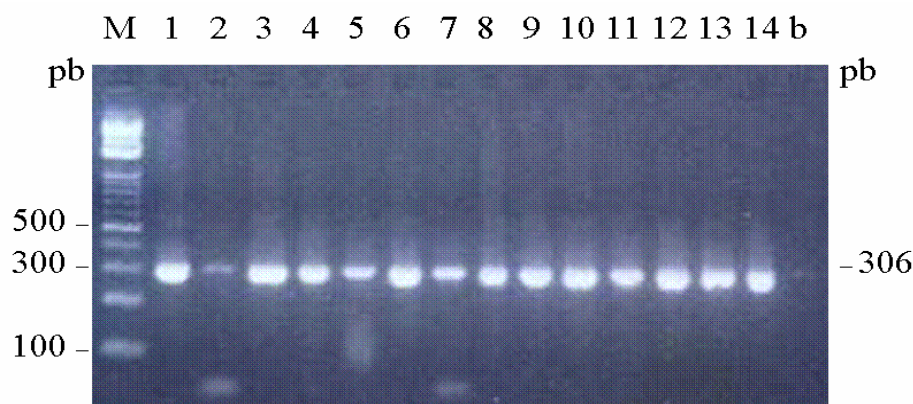
**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação originados a partir dos diferentes oligonucleotídeos construídos neste trabalho. Amplificação de uma região de 715 pb com similaridade ao gene que codifica uma transposase de *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*. Números de 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica o marcador de tamanho (Ladder 100pb) e “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho dos fragmentos amplificados.

Utilizando os oligonucleotídeos *Tccar 1* e *2*, um fragmento de DNA de tamanho esperado (554 pb) contendo parte da transposase, similar ao mesmo gene de *Cochliobolus carbonum*, foi amplificado em todos os isolados testados com exceção do isolado 2 (Figura 4), indicando que este fragmento pode ser um putativo elemento presente na maioria dos isolados de *F. graminearum* analisados.



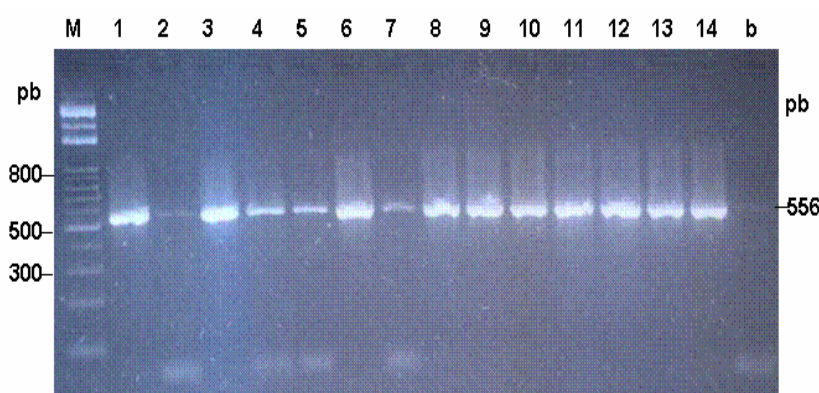
**Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação originados a partir dos diferentes oligonucleotídeos construídos neste trabalho. Amplificação de uma região de 554 pb com similaridade ao gene que codifica uma transposase de *Cochliobolus carbonum*. Números de 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica o marcador de tamanho (Ladder 100pb) e “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho dos fragmentos amplificados.

Os oligonucleotídeos *Taawa 1* e 2 amplificaram um fragmento de DNA de tamanho esperado de 306 pb contendo parte da transposase similar ao mesmo gene de *Aspergillus awamori* em todos os isolados testados (Figura 5), indicando a ubiquidade do putativo elemento que carrega esta sequência em *F. graminearum*. Também foi verificada algumas diferenças na intensidade das bandas visualizadas no gel de agarose 1,5%, que podem indicar diferenças no número de cópias dos isolados.



**Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação originados a partir dos diferentes oligonucleotídeos construídos neste trabalho. Amplificação de uma região de 306 pb com similaridade ao gene que codifica uma transposase de *Aspergillus awamori*. Números de 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica o marcador de tamanho (Ladder 100pb) e “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho dos fragmentos amplificados.

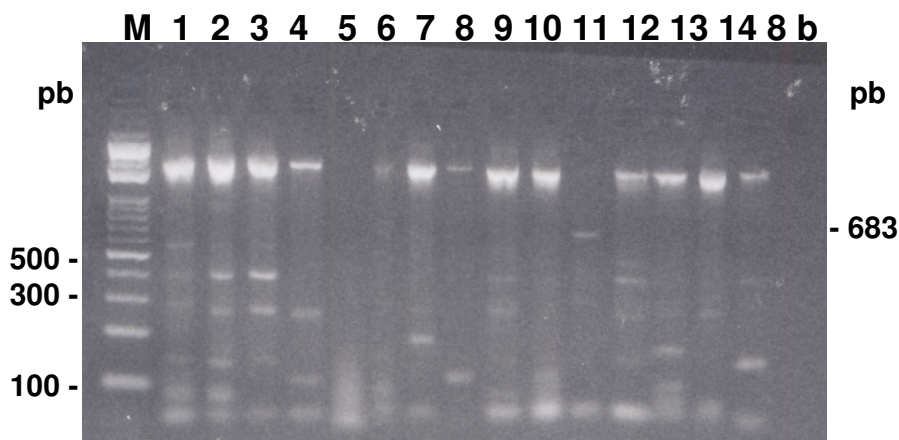
Os oligonucleotídeos *Tanig 1* e 2 amplificaram um fragmento de DNA de 556 pb contendo parte da transposase similar a uma transposase de *A. nidulans* em todos os isolados (Figura 6), indicando a ubiquidade do putativo elemento que carrega esta sequência em *F. graminearum*. A exemplo de outros pares de oligonucleotídeos como o *Taawa* e *Tfoxy*, este também apresentou bandas de mesmo tamanho com diferentes intensidade, o que pode indicar diferenças no número de cópias do elemento putativo entre os isolados.



**Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação originados a partir dos diferentes oligonucleotídeos construídos neste trabalho. Amplificação de uma região de 556 pb com similaridade ao gene que codifica uma transposase de *Aspergillus niger*. Números de 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica o marcador de tamanho (Ladder 100pb) e “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho dos fragmentos amplificados.

O par de oligonucleotídeos *Tmani* que foi construído para amplificar uma região de 683 pb similar ao gene que codifica uma transposase de *Metarhizium anisopliae*, não originou nenhum fragmento quando utilizada a temperatura de anelamento de 59°C considerada ideal para as características deste *primer*. Uma segunda reação de PCR foi realizada com os mesmos isolados e oligonucleotídeos, mudando apenas a temperatura de anelamento para 55°C. A eletroforese da segunda reação mostrou muitos fragmentos de diferentes tamanhos não condizentes com o tamanho esperado de 683 pb. A presença de muitos fragmentos de tamanho não esperado pode ter sido causado por dois motivos: i) a troca de temperatura influenciou no anelamento dos *primers*, ocasionando vários anelamentos inespecíficos, os

quais geraram um grande número de fragmentos; ii) a troca de temperatura propiciou um melhor anelamento dos primers e o grande número de fragmentos observados deve-se a mutações ocorridas no putativo elemento, ocasionando a amplificação de várias cópias com diferentes tamanhos.

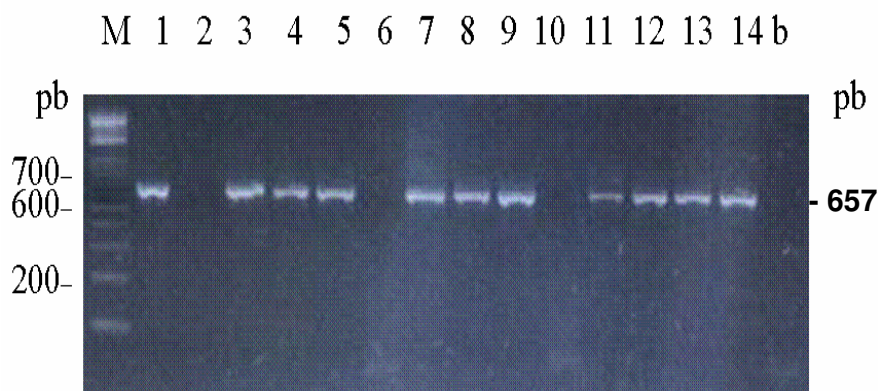


**Figura 7.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação originados a partir dos diferentes oligonucleotídeos construídos neste trabalho. Foi observada a amplificação de fragmentos de diversos tamanhos não condizentes ao tamanho esperado do fragmento de 683 pb similar ao gene que codifica uma transposase de *Metarhizium anisopliae*. Números de 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica o marcador de tamanho (Ladder 100pb) e “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho do fragmento esperado.

Para detectar a presença de putativos elementos da *Classe I* (retroelementos), 4 pares de oligonucleotídeos foram utilizados, um para amplificar uma região análoga à *gag* (que em retrovírus codifica a proteína da cápsula viral) e 3 pares para amplificar o gene da transcriptase reversa, que está inserida na região *pol*, a qual possui mais três genes (RNase H, integrase e protease).

O par de oligonucleotídeos *Gfoxy 1* e 2 amplificou um fragmento de DNA de tamanho esperado de 657 pb contendo parte da região *gag* similar ao mesmo gene de *F. oxysporum*, em todos os isolados testados, com exceção dos isolados 2, 6 e 10 (Figura 8). A ausência deste fragmento em alguns isolados pode indicar que este elemento putativo não está presente em

todos os isolados ou ainda, que mutações na sequência deste elemento possa ter impedido a amplificação desta região.

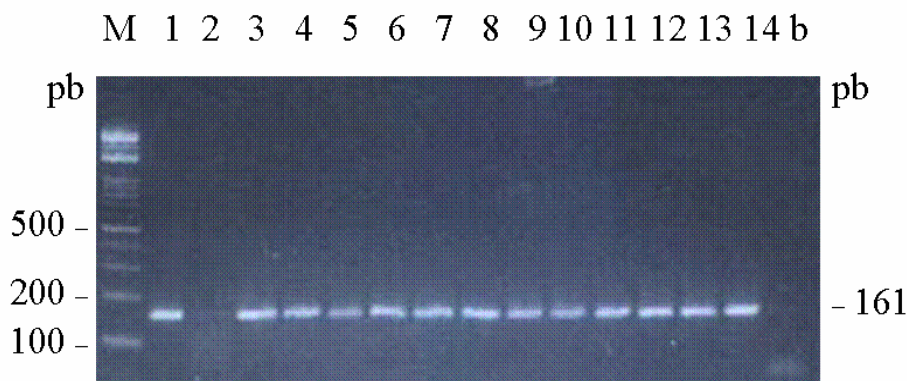


**Figura 8.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação originados a partir dos diferentes oligonucleotídeos contruídos neste trabalho. Amplificação de uma região de 657 pb com similaridade ao gene que codifica a proteína GAG de *Fusarium oxysporum*. Números de 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica o marcador de tamanho (Ladder 100pb) e “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho dos fragmentos amplificados.

O gene que codifica a proteína GAG é característico da *Classe I* dos elementos transponíveis, porém, não está presente em todos os tipos de retroelementos. Por este motivo, também utilizamos oligonucleotídeos para amplificação do gene da transcriptase reversa que está presente em um grupo maior de retroelementos.

Utilizando os oligonucleotídeos *RTatha 1* e 2, um fragmento de tamanho esperado de 161 pb contendo parte da transcriptase reversa similar ao mesmo gene de *Arabidopsis thaliana*, foi amplificado em todos isolados testados, com exceção do isolado 2 (Figura 9), indicando a presença do putativo elemento da *Classe I* na maioria dos isolados de *F. graminearum*.

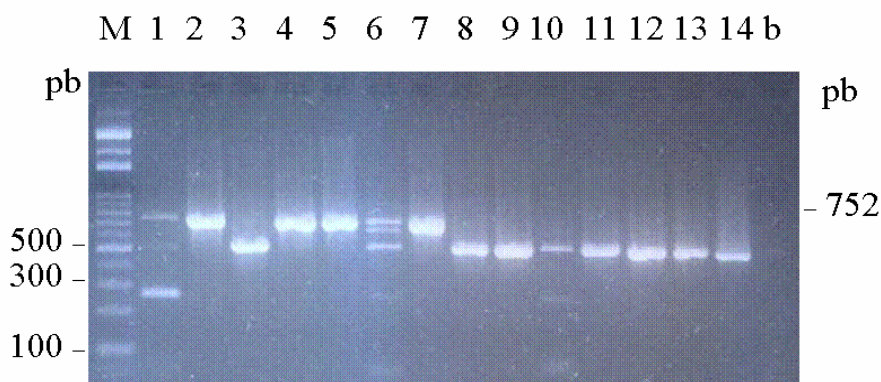




**Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação originados a partir dos diferentes oligonucleotídeos construídos neste trabalho. Amplificação de uma região de 161 pb com similaridade ao gene que codifica uma transcriptase reversa de *Arabidopsis thaliana*. Números de 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica o marcador de tamanho (Ladder 100pb) e “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho dos fragmentos amplificados.

Os oligonucleotídeos *RTcele 1* e *2* amplificaram fragmentos de diversos tamanhos e intensidade, incluindo o fragmento esperado de 752 pb esperado (Figura 10). A amplificação em todos os isolados analisados indica a ubiquidade do putativo elemento em *F. graminearum*.

Os isolados do Rio Grande do Sul apresentaram um único fragmento de igual tamanho para todos, variando muito pouco na intensidade das bandas. O restante dos isolados do Paraná e São Paulo apresentaram fragmentos de diferentes tamanhos e intensidade.



**Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação originados a partir dos diferentes oligonucleotídeos construídos neste trabalho. Amplificação de uma região de 752 pb com similaridade ao gene que codifica uma transcriptase reversa de *Caenorhabditis elegans*. Números de 1 a 14 indicam os isolados utilizados (Tabela 1). “M” indica o marcador de tamanho (Ladder 100pb) e “b” controle negativo. À esquerda alguns fragmentos do marcador e à direita o tamanho dos fragmentos amplificados.

#### 4. DISCUSSÃO

Durante a busca de seqüências no banco de dados do projeto genoma de *F. graminearum* foi observado, ainda na seleção das seqüências que, centenas de seqüências, principalmente de transposase e transcriptase reversa, foram obtidas pela similaridade com os mesmos genes em outros organismos, inclusive em muitos geneticamente distantes ao *F. graminearum*. Sabemos que em alguns fungos filamentosos os transposons representam uma porcentagem maior do genoma onde, por exemplo, correspondem a 14% do genoma de *Ascobolus immersus* (Goyon et al., 1996), 10% do genoma de *Neurospora crassa* (Galagan et al., 2003) e 9,7% do genoma de *Magnaporthe grisea* (Dean et al., 2005). Porém, segundo Wöstemeyer & Kreibich (2002), ascomicetos (caso do *F. graminearum*) e basidiomicetos raramente contém mais do que 5% de DNA repetitivo, enquanto que os zigomicetos que pertencem a um ramo filogeneticamente mais antigo contem mais de 30%. Entretanto, esses dados, apesar de gerados por cinética de reassociação, tendem a serem subestimado se as seqüências repetitivas forem pequenas, caso de muitos transposons (Hood, 2005).

A análise dos resultados de todas as amplificações mostrou que esta ocorreu, mesmo que para diferentes pares de oligonucleotídeos, em todos os 14 isolados analisados, confirmando a presença de seqüências de putativos elementos transponíveis em isolados de *F. graminearum* de diferentes regiões do Brasil.

Em relação a transposase que é uma região característica dos elementos da *Classe II*, dos 6 pares de oligonucleotídeos testados, 5 amplificaram os fragmentos de tamanho esperado. Os pares de oligonucleotídeos *Tatha*, *Taawa* e *Tanig* que amplificaram fragmentos similares a transposase de *Arabidopsis thaliana* (369 pb), *Aspergillus awamori* (306 pb) e

*Aspergillus niger* (556 pb) respectivamente, foram observados em todos os isolados testados, indicando a ubiquidade dos putativos elementos em isolados pertencentes a diferentes áreas geográficas, sugerindo que estas seqüências são provavelmente antigos residentes do genoma dos isolados de *F. graminearum* analisados.

O resultado da amplificação de um fragmento de 554 pb através dos primers *Tccar 1* e *2* e de um fragmento de 715 pb através dos primers *TFoxy 1* e *2* similares ao gene da transposase de *C. carbonum* e *F. oxysporum f.sp. ciceris* respectivamente, sugere que estas seqüências são provavelmente, antigos residentes do genoma de *F. graminearum*. Porém, a não amplificação em alguns isolados (isolado 2 para *Tccar* e isolados 2, 5 e 7 para *TFoxy*) e a diferença na intensidade entre alguns fragmentos, podem ser indícios de mutações nas seqüências, ou ainda a ausência ou perda dos elementos putativos nestes isolados.

Uma das espécies mais próximas ao *F. graminearum* e que apresenta um grande número de elementos transponíveis, tanto da *Classe I* quanto da *Classe II*, é o *F. oxysporum*. Este fungo apresenta muitos transposons ativos como, por exemplo, *Fot1* (Daboussi et al., 1992), *Fot2* (Daboussi & Langin, 1994), *Hop* (Chalvet et al., 2003) *Folyt1* (Gómez-Gómez et al., 1999) e o transposon *impala* (Langin et al., 1995) muito utilizado em mutagenese insercional, além de mais uma dezena de outros elementos inativos. A recente identificação de elementos do tipo *Fot1* em diferentes ascomicetos sugere que ele é um componente antigo deste filo (para uma revisão veja Daboussi et al., 1996; e Kempken & Kuck 1998). Daboussi et al. (2002) estudaram a evolução e distribuição do transposon *Fot1* (família Pogo da *Classe II*) no gênero *Fusarium* através de hibridizações deste transposon com o DNA de 16 espécies de *Fusarium* e também através de reações de PCR para amplificação de seqüências putativas de *Fot1*. O estudo revelou que as seqüências homólogas a *Fot1* não estão restritas ao *F. oxysporum*, onde 5 das 16 espécies analisadas neste estudo mostraram evidências da hibridização com o transposon. Porém, estas hibridizações ocorreram em espécies mais



distantes do *F. oxysporum*, enquanto que para as outras espécies mais relacionadas, incluindo dois isolados de *F. graminearum*, nenhum elemento foi identificado, seja por hibridização ou via PCR. Para os autores, este resultado indica que algumas espécies podem estar livres do elemento *Fot1* ou podem conter elementos muito divergentes.

Estes resultados reforçam a hipótese de que a não amplificação do fragmento de tamanho esperado de 715 pb similar a transposase de *F. oxysporum* nos isolados 2, 5 e 7 pelo par de oligonucleotídeos *Tfoxy*, podem ser um indício de que estes isolados contenham elementos divergentes ou não apresentem o putativo elemento. Isto indica que diferenças nas seqüências ou mesmo a ausência ou presença de um elemento putativo, pode variar não apenas de espécie para espécie, como também em diferentes isolados de uma mesma espécie.

A amplificação de fragmentos de DNA com similaridade a transposase de diversos microorganismos, obtida para a maioria dos *primers* utilizados, indica que o genoma de isolados brasileiros de *F. graminearum* possuem uma diversificada quantidade de elementos da *Classe II*, que pelo seu mecanismo de transposição de “corte e colagem” podem estar influenciando na geração de variabilidade neste fungo.

Para observar a presença de elementos putativos da *Classe I*, oligonucleotídeos que amplificam regiões distintas dos retroelementos foram construídos. O par de oligonucleotídeos *Gfoxy* 1 e 2 amplificou um fragmento de DNA de tamanho esperado de 657 pb contendo parte da região *gag* similar ao mesmo gene de *F. oxysporum*, em todos os isolados testados, com exceção dos isolados 2, 6 e 10.

A amplificação de um fragmento de 161 pb similar a transcriptase reversa de *Arabidopsis thaliana* em todos os isolados testados com exceção do isolado 2 e a amplificação de fragmentos de diversos tamanhos a partir dos oligonucleotídeos *RTcele* 1 e 2 com similaridade ao transcriptase reversa de *Caenorhabditis elegans* também em todos os isolados testados, é uma indicação que estas seqüências são provavelmente antigos residentes

do genoma dos isolados de *F. graminearum* analisados. Fragmentos de diversos tamanhos obtidos a partir da reação de PCR com o par de oligonucleotídeos *RTcele* nos isolados analisados, sugerem que este elemento tenha sofrido modificações que originaram cópias com diferentes seqüências.

As seqüências putativas da transposase e da transcriptase reversa que foram amplificadas em todos os isolados testados pertencentes a diferentes áreas geográficas, indicam que provavelmente estas seqüências são antigos residentes do genoma dos isolados de *F. graminearum* analisados e, portanto, estes elementos podem ter sofrido modificações que originaram cópias com diferentes seqüências. Diferenças no número de cópias, teoricamente, são esperadas com maior freqüência nos elementos da *Classe I* (retroelementos) devido ao seu tipo de transposição “cópia e colagem”. Porém, para verificar a hipótese de diferenças no número de cópias, estudos com PCR quantitativo (PCR em tempo real) devem ser realizados. Outros estudos como, por exemplo, a clivagem do produto amplificado por PCR e o seqüenciamento que podem revelar diferentes fragmentos de restrição e diferentes seqüências entre os isolados.

A amplificação dos fragmentos que apresentam similaridade com as enzimas transposase, transcriptase reversa e *GAG* também demonstra uma diversidade de tipos de elementos transponíveis putativos, tanto da *Classe I* quanto da *Classe II*, presentes no genoma de *F. graminearum* de diferentes regiões do Brasil.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

A amplificação ocorreu, mesmo que para diferentes pares de oligonucleotídeos, em todos os 14 isolados analisados, confirmando a presença de seqüências putativas de elementos transponíveis em isolados de *F. graminearum* de diferentes regiões do Brasil.

A amplificação dos fragmentos que apresentam similaridade com as enzimas transposase, transcriptase reversa e *GAG* demonstra uma diversidade de tipos de elementos putativos no genoma de *F. graminearum*. Por possuir um genoma maior que o normalmente encontrado em fungos filamentosos e apresentar diferentes tipos de elementos, este fungo apresenta potencial para possíveis descobertas de elementos transponíveis de diversas classes, subclasses e famílias.

Apesar de não podermos confirmar que a variabilidade encontrada neste fungo esteja relacionada aos elementos transponíveis, o fato de encontrar uma variedade de putativos elementos no seu genoma reforça a hipótese de que a reprodução sexual pode não ser o único mecanismo de variabilidade deste fungo, e que os elementos transponíveis podem contribuir com uma significativa parcela desta variabilidade, principalmente em ambientes estressantes ao desenvolvimento do fungo.

A ubiquidade de algumas seqüências de transposase e transcriptase reversa nos isolados de *F. graminearum*, sugere que estes elementos são provavelmente antigos residentes do genoma destes isolados. A amplificação de fragmentos com similaridade a regiões de diversos microorganismos, alguns geneticamente distantes do *F. graminearum*, reforça esta hipótese, sugerindo também que estas seqüências, possivelmente foram adquiridas por um ancestral comum entre estes organismos e então herdadas verticalmente pelos seus

descendentes. Como antigos residentes no genoma de *F. graminearum*, estes elementos transponíveis podem ter sofrido modificações que originaram cópias com diferentes seqüências, o que explicaria a ausência de amplificação em alguns isolados ou as diferenças no tamanho e intensidade entre os isolados obtidos em alguns pares de oligonucleotídeos.

Porém para se confirmar algumas hipóteses e aumentar nosso conhecimento sobre estas seqüências, estudos adicionais devem ser realizados. A clivagem do produto amplificado por PCR com enzimas de restrição e o seqüenciamento, podem revelar diferentes fragmentos e diferenças nas seqüências destes elementos putativos.

A clivagem do DNA dos isolados e posterior hibridização com o produto da amplificação utilizado como sonda, pode vir a detectar diferenças entre os isolados das diferentes áreas geográficas. Portanto, estes elementos putativos possivelmente podem servir como marcadores moleculares para diferenciar isolados de regiões distintas ou isolados com diferenças relacionadas a patogenicidade.

Este trabalho é pioneiro no Brasil na utilização dos elementos transponíveis como ferramenta molecular para o estudo da população de *F. graminearum*, o principal patógeno da cultura do trigo da maior região produtora desta cultura no País.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELOTTI, F.; TESSMAN, D.J.; VIDA, J.B.; ALVES, T.C.A.; SOUTO, E.R.; HARAKAVA, R. Variabilidade genética e patogênica de isolados de *Fusarium graminearum* do trigo e triticales do sul do Brasil. In: **XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 2004, Gramado/RS. Anais XXXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, v 28 (suplemento), p. S200.

BUSSO, C. Caracterização genética de isolados patogênicos de *Pyricularia grisea* e *Fusarium graminearum* do Trigo (*Triticum aestivum*) e do Triticale (*X. tritico-secale*) no Estado do Paraná. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil, 2005.

CARTER, J.P.; REZANOOR, H.N.; HOLDEN, D.; DESJARDINS, A.E.; PLATTNER, R.D.; NICHOLSON, P. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. **European Journal of Plant Pathology**, 108:573–583, 2002.

CHALVET, F. ; GRIMALDI, P.; KAPER, F.; LANGIN, T.; DABOUSSI, M. J. *Hop*, an active mutator-like element in the genome of the fungus *Fusarium oxysporum*. **Mol. Biol. Evol.** 20:1362-1375, 2003.

DABOUSSI, M.J.; CAPY, P. Transposable elements in filamentous fungi. *Annual Review of Microbiology*, v. 57, p. 275-299, 2003.

DABOUSSI, M.J. Fungal transposable elements and genome evolution. **Genetica**. 100:253-260, 1997.

DABOUSSI, M.J. Fungal transposable elements: generators of diversity and genetic tools. **Journal of Genetics**. 75:325-339, 1996.

DABOUSSI, M.J.; LANGIN, T. Transposable elements in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. **Genetica**, 93:49-59, 1994.

DABOUSSI, M. J., LANGIN, T., BRYGOO, Y. *Fot1*, a new family of fungal transposable elements. **Molecular General Genetics**, 232: 12-16, 1992.

DEAN et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Nature**. 434:980-986, 2005.

FINNEGAN, D.J. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. **Trends Genetics**, v. 5, p. 103-107, 1989.

GALAGAN et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature**. 422:859-868, 2003.

GOMEZ-GOMEZ, E.; ANAYA, N.; RONCERO, M. I. G.; HERA, C. *Folyt1*, a new member of the hAT Family, is active in the genome of the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. **Fungal Genetics and Biology**. 27: 67-76, 1999.

GOYON, C.; ROSSIGNOL, J. L.; FAUGERON, G. Native DNA repeats and methylation in *Ascobolus*. **Nucleic Acids Research**. 24: 3348-3356, 1996.

HOOD, M. E. Repetitive DNA in the automictic fungus *Microbotryum violaceum*. **Genetica**. 124:1-10, 2005.

KEMPKEN, F.; KÜCK, U. Transposons in filamentous fungi - facts and perspectives. **Bioessays**. v. 20, p. 652-659, 1998.

LÁDAY, M.; JUHÁSZ, Á.; MULÈ, G.; MORETTI, A.; SZÉCSI, Á.; LOGRIECO, A. Mitochondrial DNA diversity and lineage determination of European isolates of *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*). **European Journal of Plant pathology**. 110:545-550, 2004.

LANGIN, T.; CAPY, P.; DABOUSSI, M.J. The transposable element *impala*, a fungal member of the *Tc1-mariner* superfamily. **Molecular and General Genetics**, 246:19-28, 1995.

O'DONELL, K.; WARD, T. J.; GEISER, D. M.; KISTLER, H. C.; AOKI, T. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. **Fungal Genetics and Biology**. 41:600-623, 2004.

PEREIRA, J.F.; ARAÚJO, E.F.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; QUEIROZ, M.V. Elementos transponíveis em fungos fitopatogênicos. **Revisão anual de patologia de plantas**, 14:303-362, 2006.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J.; Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ, **Human Press**, p. 365-386; 2000 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>).

SCHILLING, A.G. Characterization and Differentiation of the Cereal Pathogens *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* by PCR-based Molecular Markers. Stuttgart, Germany: U.E. Grauer. 1996.

SPECHT, C.A.; DIRUSSO, C.C.; NOVOTNY, C.P.; ULLRICH, R.C. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Analytical Biochemistry**. 119:158-163, 1982.

TÓTH, B.; MESTERHÁZY, A.; HORVÁTH, Z.; BARTÓK, T.; VARGA, M.; VARGA, JÁNOS. Genetic variability of central European isolates of the *Fusarium graminearum* species complex. **European Journal of Plant Pathology**. 112:35-45. 2005.

## **CAPÍTULO II**

**DESENVOLVIMENTO PARCIAL DE UM PROTOCOLO DE INATIVAÇÃO  
GÊNICA MEDIADA PELO TRANSPOSON *Impala* EM *Fusarium graminearum*.**



## RESUMO

Atualmente, a obtenção de mutantes de fungos filamentosos através de mutagênese insercional utilizando elementos transponíveis é um procedimento rotineiro usado para vários fins biotecnológicos. Porém, para obter os melhores resultados, é necessário otimizar alguns procedimentos, para cada espécie de fungo a ser estudada. O fungo *Fusarium graminearum* é o agente patogênico causador da doença conhecida como fusariose da espiga ou giberela do trigo que vem causando grandes prejuízos a triticultura, principalmente na região Sul do Brasil. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e analisar procedimentos e métodos adequados para a co-transformação de isolados brasileiros deste fungo com os plasmídios *pNII60*, que carrega o transposon *impala*, e o plasmídio *pAN7-I*, no qual está inserido o gene de resistência a higromicina B, visto que até o presente, nenhum trabalho de obtenção de mutantes utilizando transposons para *F. graminearum* foi desenvolvido no País. Para o desenvolvimento deste protocolo, foram selecionados os isolados F02 e F12 patogênicos a cultivar BR18-Terena. Um teste para avaliação do meio de cultura para seleção dos mutantes resistentes ao clorato, demonstrou que o meio descrito por Cove (1979) é o mais indicado para os isolados selecionados. Um total de 15 mutantes resistentes ao clorato foi obtido, dos quais 5 foram identificados como mutantes para o gene nitrato redutase, 8 mutantes para um regulador específico e 2 mutantes para permease. Diferenças quanto ao número de mutantes selecionados pelo número de placas inoculadas, número de mutantes nitrato redutase e produção de macroconídios, indicam que a escolha do isolado pode influenciar na obtenção de mutantes e na produção de protoplastos. Testes com diferentes concentrações de higromicina revelaram que doses acima de 30  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  são suficientes para o controle do crescimento do fungo. Dois mutantes nitrato redutase (M01 e M194) foram selecionados para a protoplastização e co-transformação, com base na menor produção de micélio residual em meio contendo clorato. Apenas um transformante foi obtido sendo denominado T3, mostrando a viabilidade do protocolo, mas também, que mais estudos devem ser realizados para se aumentar o número de transformantes. Se confirmada, através de hibridização, a transformação de T3 com uma única cópia do elemento *impala*, este poderá além de confirmar a capacidade de transposição deste elemento em *F. graminearum*, também servir em estudos de expressão gênica, principalmente àqueles genes envolvidos no processo de patogenicidade.

**Palavras chave:** Mutagênese insercional, trigo, transposon, *impala*, *fusarium graminearum*

## ABSTRACT

The selection of filamentous fungi mutants through insertion mutagenesis by transposable elements is a routine procedure used to different biotechnological purposes. However, to obtain best results it is necessary to optimize some procedures to each fungal species. The fungi *Fusarium graminearum* (teleomorph *Gibberella zeae*) is the etiological agent of scab wheat disease which causes a great damage to wheat production, mainly in South of Brazil. The goal of this work was to develop and analyze adequate procedures and methods for co-transformation brazilian isolates of *F. graminearum* with vectors *pNII60*, that carry the *impala* transposon, and *pAN7-1* that code to hygromycin B resistance. To develop the genic inactivation protocol, we select the isolates F02 and F12 which are pathogenic for BR18-Terena cultivar. To evaluate the better medium for selection of chlorate resistant mutants, it was analyzed two different medium. This analysis showed that medium describe by Cove (1979) is more indicate for selected the chlorate resistant mutants. A total of 15 chlorate resistant mutants were obtained, being five identified as nitrate reductase mutants (*niaD*), eight specific regulator mutants (*nirA*) and two permease mutants. Differences related to the number of mutants obtained and number inoculated plates, number of nitrate reductase mutants and macroconides production indicate that the choice of the isolate can influence the isolation of mutants and in protoplast production. Analysis with different hygromycin B concentrations revealed that doses up to  $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$  were enough to control the fungal growth. Two nitrate reductase mutants (M01 and M194) were select to protoplastization and co-transformation, once these two mutants in relation to others produce lower concentration of residual mycelium. Only one transformant were obtained and it was denominated T3, what shows that the transformation protocol needs to be modified to increase the number of transformants. If hybridization experiments confirm the transformation of T3 with only one copy of the *impala* element, it will be confirmed the transposition ability of *impala* in *F. graminearum*, and it will be useful in genetic inactivation studies, especially to genes involved in pathogenicity process.

**Keywords:** insertional mutagenesis, *Fusarium graminearum*, wheat, transposon, *impala*.

## 1. INTRODUÇÃO

Entre as doenças mais severas que atacam o trigo, encontra-se a fusariose da espiga também conhecida como giberela. Esta doença é causada por várias espécies do gênero *Fusarium* assim como por seus respectivos teleomorfos. Porém, no sul do País, o principal agente causador da doença é o fungo homotático *Fusarium graminearum* (teleomorfo *Gibberella zeae*) (Rivadeneira, 2001).

O genoma de *F. graminearum* foi recentemente seqüenciado (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fusarium/index.html>) e um dos passos mais importantes neste momento pós-genômico é o estabelecimento de ferramentas que permitam o estudo funcional dos genes. Uma ferramenta que permite este estudo é a inativação gênica por transposons, de forma que reveste-se de grande importância o estabelecimento de um protocolo de inativação gênica que possibilite a realização de estudos que buscam a identificação e isolamento de genes envolvidos na interação patógeno-planta, permitindo o avanço em estudos de relação estrutura-função gênica, via análise genômica funcional.

Os transposons, ou elementos transponíveis, podem ser definidos como seqüências de DNA moderadamente repetitivas que podem mover-se de um local a outro no genoma e, desta maneira, ter um profundo impacto na estrutura e função dos genes, bem como na organização dos cromossomos na espécie (Daboussi, 1997). Dentre os elementos transponíveis autônomos já identificados, alguns são muito pertinentes para o uso como ferramentas genéticas. Um dos exemplos é o elemento *impala* de *F. oxysporum* (Langin et al. 1995). Esse elemento tem 1280 nucleotídeos e é constituído por uma região central com uma única seqüência aberta de

leitura, sem íntrons, que codifica uma transposase com 340 aminoácidos, flanqueado por repetições terminais invertidas de 27 pares de bases (Langin et al., 1995). O elemento transpõe-se pelo mecanismo conservativo, tendo como sítio-alvo o dinucleotídeo TA (Hua-Van et al., 2001).

Vetores carregando o transposon *impala* inserido no gene da nitrato redutase de *A. nidulans* são facilmente utilizados para estudos de transposição e inativação gênica, visto que a excisão desse elemento promove a funcionalidade do gene da nitrato redutase que pode ser verificada pela capacidade da célula de crescer em meio de cultura contendo nitrato como única fonte de nitrogênio para tanto, estes vetores devem ser introduzidos em mutantes incapazes de crescer em meio com nitrato como única fonte de nitrogênio. Os vetores chamados *pNI160* e *pNIL160*, que carregam o elemento *impala*, já foram utilizados com sucesso em várias espécies de fungos demonstrando que este elemento é capaz de transpor em hospedeiros heterólogos como o *Fusarium moliniforme* (Hua-Van et al., 2001), *M. grisea* (Villalba et al., 2001), *Aspergillus nidulans* (Nicosia et al. 2001) e *P. griseoroseum* (Queiroz & Daboussi, 2003).

Sistemas de transformação heteróloga baseados na resistência a higromicina B usando o plasmídeo *pAN7-1* também têm sido usados com sucesso para um grande número de fungos (Punt & van den Hondel, 1992). O plasmídeo *pAN7-1* contém o gene da fosfotransferase higromicina B (*hph*) de *Escherichia coli* ligado a um promotor e um terminador de *A. nidulans*. Este plasmídeo já foi utilizado com sucesso por Wiebe et al (1997), na transformação da cepa A3/5 de *F. graminearum*, utilizada na produção da mico-proteína Quorn<sup>®</sup>.

Apesar da transformação de fungos filamentosos já ser um procedimento de rotina utilizado em estudos de expressão gênica, ainda permanece necessário otimizar os procedimentos de transformação para cada espécie de fungo individual a ser estudada

(Fincham, 1989). Em particular a produção de protoplasto varia grandemente de espécie para espécie (Tschen & Li, 1994) e sem uma produção eficiente de protoplastos, sistemas de transformação mais difíceis laboratorialmente devem ser implementados.

O objetivo deste trabalho foi o de desenvolver algumas etapas importantes de um protocolo de inativação gênica para o *F. graminearum* baseado na literatura descrita por Wiebe et al. (1997), utilizando a co-transformação dos plasmídeos *pNII60* e *pAN7.1* em mutantes para o gene da nitrato redutase.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Teste de patogenicidade

Os isolados F02 e F12 de *F. graminearum* foram testados quanto ao processo de patogenicidade na cultivar BR18-Terena suscetível a giberela do trigo.

Para a inoculação, 100 mL de suspensão de macroconídios foi preparada para cada isolado separadamente, com concentração  $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  de solução Tween 80 (0,05 %) e pulverizada nas espigas em estágio de floração com o auxílio de pulverizador manual. Trinta minutos após a inoculação, as plantas foram submetidas a molhameto com neblina artificial por 72 horas (2 minutos a cada 28 minutos) a uma temperatura média de  $20^\circ\text{C} \pm 4^\circ\text{C}$ . Os sintomas foram observados 5 dias após a inoculação.

### 2.2 Isolados e meios de cultura

Os dois isolados monospóricos de *F. graminearum* (F02 e F12) patogênicos a cultivar BR 18 Terena, foram utilizados para seleção de mutantes espontâneos resistentes ao clorato. Estes isolados foram inoculados em meio BDA [Batata Dextrose Agar - 140g de batata, 10g

de açúcar, 15g de ágar e 1000 mL de água destilada], incubados por 5 dias a 25 °C e posteriormente, estocados a 4 °C para melhor conservação do fungo.

### 2.3 Seleção dos mutantes

O primeiro passo para o estabelecimento do protocolo de inativação gênica é a seleção de mutantes espontâneos para o gene nitrato redutase (*niaD*), a qual foi baseada na resistência ao clorato descrito por Unkless et al. (1989).

Com o auxílio de cortadores de disco de 4,5 mm de diâmetro, os fungos foram repicados do meio BDA para dois diferentes meios de cultura contendo clorato. O primeiro baseado no meio descrito por Cove (1979) e o segundo, descrito por McCallum (2001).

O meio descrito por Cove (1979) é composto por um meio mínimo de Pontecorvo et al. (1953) acrescido de clorato de potássio 470 mM e glutamato de sódio 10 mM [ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5g, KCl 0,5g,  $\text{MgSO}_4$  0,5g,  $\text{FeSO}_4$  0,01g,  $\text{ZnSO}_4$  0,01g, glicose 10g, ágar 15g, Glutamato de sódio 10mM e Clorato de potássio 470mM por litro de água, pH 6,8]. O meio descrito por McCallum (2001) utiliza um meio basal (Brooker et al., 1991) acrescido de clorato de potássio, nitrato de sódio e asparagina [30g de sacarose, 1,0g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,0g de  $\text{MgSO}_4$ ; 0,5g de KCl; 0.01g de  $\text{FeSO}_4$ ; 20g de ágar; 15g de  $\text{KClO}_3$ ; 1,6g de asparagina; 3g de  $\text{NaNO}_3$ ; pH: 6,8 ]. Ao todo foram inoculadas 250 placas com meio mínimo mais clorato, sendo 40 placas com meio de McCallum e 210 com o meio de Cove.

### 2.4 Cultura monospórica dos mutantes

Para cada mutante, foi retirado um disco de 30 mm de diâmetro do micélio e colocado em um tubo falcon com aproximadamente 15 mL de água autoclavada. Os tubos foram agitados em vórtex e a suspensão de esporos foi vertida em placas de Petri contendo meio ágar-água (15g de ágar em 1 litro de água). As placas foram incubadas a 25 °C por 16 a 20

horas para germinação dos esporos. Após este período os esporos foram resgatados com o auxílio de uma lupa e agulhas autoclavadas e então, inoculados em meio BDA a 25 °C por 7 a 10 dias.

### **2.5 Teste para identificação de mutantes nitrato redutase**

As colônias que apresentaram resistência ao clorato foram caracterizadas pela habilidade de crescimento em diferentes fontes de nitrogênio (Cove, 1979).

As colônias resistentes ao clorato foram inoculadas em meio mínimo (Pontecorvo et al., 1953) contendo 10 mM das seguintes fontes de nitrogênio: nitrato de sódio, nitrito de sódio, cloreto de amônio, hipoxantina e glutamato de sódio. As placas foram incubadas a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas por 7 a 10 dias. Foram considerados mutantes para o gene nitrato redutase, somente aquelas colônias que apresentaram fenótipo de crescimento em nitrito, hipoxantina, glutamato, amônio e não crescimento em nitrato, como única fonte de nitrogênio. Os mutantes nitrato redutase foram identificados e separados.

### **2.6 Teste de estabilidade**

Os mutantes nitrato redutase foram repicados para meio BDA e incubados a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas por 4 dias. Após este período, eles foram repicados novamente para uma nova placa de Petri com meio BDA e incubados com as mesmas condições e período de tempo, anteriormente descritos. Esse processo foi repetido cinco vezes, quando então os mutantes foram repicados novamente para o meio mínimo contendo clorato, para verificar a manutenção ou não do fenótipo mutante nitrato redutase.

## 2.7 Teste de resistência a higromicina B

O isolado selvagem F02 de *F. graminearum* foi testado quanto a sua resistência a diferentes concentrações de higromicina B. Foram realizados dois testes onde o isolado foi inoculado em placas de Petri com meio BDA contendo diferentes concentrações de higromicina e incubados a 25 °C por 7 dias. No primeiro teste as concentrações de higromicina variaram de 0 a 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (0, 50, 100, 150, 200 e 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e no segundo, variaram de 0 a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )

## 2.8 Plasmídios

Para a co-transfomação foram utilizados os plasmídios *pAN7.1* e *pNII60*. O plasmídio *pAN7.1* contém o gene *hph* (*hygromycin B phosphotransferase*) de *Escherichia coli* ligado a um promotor e terminador de *A. nidulans*. O plasmídeo *pNII60* carrega uma cópia do elemento *impala* inserido em um promotor de 1.3 kb do gene *niaD* (nitrato redutase) de *A. nidulans* (Villalba et al., 2001).

Os plasmídios foram isolados a partir de *E. coli* usando o processo de lise alcalina, descrito por Sambrook et al. (1989) com modificações.

## 2.9 Protoplastização e transformação

A produção de protoplastos foi realizada conforme metodologia descrita por Wiebe et al. (1997), com algumas modificações.

Uma suspensão de macroconídios a  $2,4 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  foi preparada a partir dos mutantes nitrato redutase M01 e M194 de *F. graminearum* recém cultivados em solução de tween 80 a 0,05%. Um determinado volume da suspensão foi obtido, para que se adicionasse 1 a  $2 \times 10^6$  de esporos em um Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio completo líquido,



utilizando como fonte de nitrogênio glutamato de sódio e incubados a 25 °C/150 rpm por 24 horas. Após este período, o micélio foi filtrado em papel Whatman 3 mm com o auxílio de bomba de vácuo, lavado com solução de NH<sub>4</sub>Cl 1M, transferido para Erlenmeyers de 50 mL esterilizados e pesados.

Ao micélio foi adicionada a solução de lise (estabilizador NH<sub>4</sub>Cl 1M + enzima driselase a 2% p/v da solução), em um volume apropriado para que se obtivesse 10 a 30 mg de massa micelial por mL de solução de lise. O micélio, com a solução de lise foi incubado a 30 °C/60 rpm por 3 a 4 horas e a verificação da produção dos protoplastos foi feita em câmara de Newbauer. Os protoplastos foram filtrados em seringas estéreis contendo gaze, e o volume filtrado foi colocado em um tubo Falcon de 50 mL. O volume da solução foi dividido em tubos de 2 mL, centrifugados a 3000 g por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado em capela de fluxo laminar. Os protoplastos foram lavados duas vezes em estabilizador osmótico GTC (glicose 1M, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, Tris pH 8.0 10 mM) e centrifugados a 3000 g por 5 minutos a 4°C, após cada lavagem. A concentração de protoplastos foi determinada através de contagem em câmara de Newbauer. Os protoplastos foram ressuspensos em um determinado volume de GTC para obter uma concentração final de aproximadamente  $10^7 \times 0,1 \text{ mL}^{-1}$ .

Para a co-transformação, 10 µg de DNA plasmidial de cada vetor (*pNII60* e *pAN7.1*) foi adicionado a 200 µL da solução de protoplastos, misturando-se a solução cuidadosamente com a micropipeta. Os protoplastos foram incubados em gelo por 30 minutos. Um volume de 1,2 mL de solução PEG + GTC (PEG 4000 60% em GTC 1M) foi adicionada em três etapas (0,2 mL + 0,2 mL + 0,8 mL) misturando-se cuidadosamente com a micropipeta e levados novamente ao gelo por mais 30 minutos.

Os protoplastos foram plaqueados, pelo método pour-plate, em meio completo contendo glutamato como única fonte de nitrogênio e sacarose 1M como estabilizador

osmótico. Após 3 horas, foi vertido 10 mL de meio completo contendo higromicina B ( $175 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para se obter uma concentração final de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sobre as placas contendo os protoplastos.

### 3. RESULTADOS

Para confirmar a patogenicidade dos isolados F02 e F12 de *F. graminearum* na cultivar BR18-Terena, foi realizado um teste de patogenicidade onde os dois isolados foram inoculados nesta cultivar altamente suscetível a giberela, sob condições adequadas para desenvolvimento dos fungos. O resultado demonstrou, através dos sintomas característicos da doença observada nas plantas inoculadas, que os dois isolados são patogênicos a esta cultivar (Figura 1).



**Figura 1.** A) Sintoma inicial do desenvolvimento da doença observados na cultivar BR18 Terena, atacando uma espigada individualmente; B) Espiga apresentando os sintomas característicos da doença: aristas arripiadas e espiguetas despigmentadas.

Após a comprovação de que estes isolados eram patogênicos ao cultivar BR18 Terena, seguiu-se com a etapa de obtenção de mutantes resistentes ao clorato. Com o objetivo de avaliar o meio de cultura mais adequado para seleção de mutantes espontâneos resistentes ao clorato nos isolados brasileiros de *F. graminearum*, dois meios foram testados. O primeiro descrito por Cove (1979) utiliza meio mínimo (Pontecorvo et al., 1953) acrescido de clorato de potássio 470 mM e glutamina 10 mM, e o segundo descrito por McCallum (2001) utiliza meio basal (Brooker et al. 1991) mais clorato de potássio (1,5%), sulfato de sódio e asparagina.

Foram inoculadas 40 placas de Petri de cada meio com o isolado F02 de *F. graminearum* e em ambos, o fungo apresentou um crescimento inicial residual, provavelmente pela difusão dos nutrientes contidos no disco de BDA em que estavam sendo cultivados, para o novo meio de cultura em que foram repicados. Porém, houve diferenças em relação ao crescimento inicial para os dois métodos utilizados. No meio descrito por Cove (1979), os fungos apresentaram um crescimento inicial rasteiro, alaranjado, sem a presença de micélios aéreos e a identificação dos mutantes resistentes ao clorato foi realizada através da visualização de áreas com crescimento diferenciado, onde ocorreu o crescimento de micélio aéreo e de coloração avermelhada, mais próxima a cor natural de *F. graminearum* em meio BDA (Figura 2A). Apesar de no método descrito por McCallum (2001), também ocorrer um crescimento inicial, este apresentou um rápido desenvolvimento do fungo, com crescimento de micélios aéreos finos e de coloração esbranquiçada a rósea. Este maior crescimento ocorreu ao redor do disco de BDA com o micélio do fungo usado para inoculação. Porém, nenhuma área de crescimento diferenciado foi observada. Os micélios crescidos neste meio foram posteriormente repicados para o meio de Cove (1979), o qual apresenta uma maior concentração de clorato, mas nenhum foi capaz de manter o crescimento. Uma possível explicação para esse maior desenvolvimento inicial de *F. graminearum* no meio de

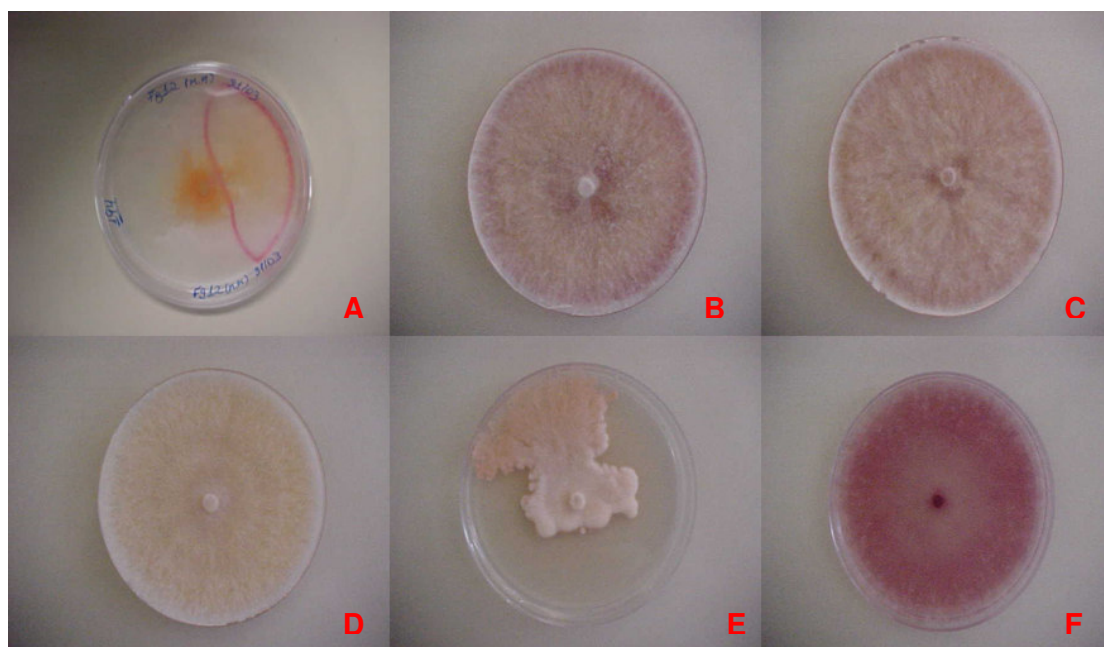
McCallum, pode ser devido a sua menor concentração de clorato em relação ao meio descrito por Cove (1979), fazendo com que o fungo aproveitasse melhor os nutrientes ainda disponíveis no disco com meio BDA e tivesse um crescimento inicial mais vigoroso e rápido. Entretanto, após alguns dias (5 a 7) este crescimento cessa e nenhuma região com crescimento diferenciado foi observada. Nenhum mutante resistente ao clorato foi observado para o isolado testado nas 40 placas contendo o meio descrito por McCallum (2001). Por apresentar melhores resultados nestas condições, o meio descrito por Cove (1979) foi o escolhido para continuar a seleção dos mutantes resistentes ao clorato.

Um total de 210 placas contendo meio de Cove (1979) foram inoculadas com *F. graminearum*, sendo 160 placas inoculadas com o isolado F02 e 50 placas com o isolado F12, ambos patogênicos a cultivar de trigo BR 18 Terena. A partir deste meio, foram selecionados 15 mutantes com fenótipo de resistência ao clorato. O isolado F12 mostrou ser mais promissor para obtenção de mutantes resistentes ao clorato, pois foram obtidos 7 mutantes em 50 placas inoculadas, enquanto que do isolado F02 foram selecionados 8 mutantes em 160 placas inoculadas. Os mutantes M01, M46, M72, M96, M119, M141, M165 e M170 são provenientes do isolado F02 e os mutantes M192, M194, M198, M204, M205, M209 e M211 são provenientes do isolado F12.

Nesse momento, as colônias mutantes que crescem no meio de cultura, são resistentes ao clorato, mas não necessariamente são mutantes para a enzima nitrato redutase, pois pelo menos cinco genes podem levar ao fenótipo de resistência ao clorato. Dessa forma, após a obtenção das colônias resistentes ao clorato, foi necessário fazer uma discriminação do fenótipo mutante por meio de um teste de crescimento em meio mínimo contendo as seguintes fontes de nitrogênio: nitrato, nitrito, hipoxantina, glutamato e amônio (Figura 2). O crescimento ou não nessas fontes é então correlacionado com a mutação em um dos cinco possíveis genes (Pereira et al., 2003), sendo consideradas mutantes para o gene nitrato

redutase somente aquelas colônias que não apresentaram crescimento em meio mínimo mais nitrato como única fonte de nitrogênio e que se desenvolveram normalmente nos demais meios.

Das 15 colônias resistentes ao clorato, somente 5 foram caracterizadas como mutantes para o gene nitrato redutase (Tabela 1). As colônias M01, M46, M72 e M165, obtidas a partir do isolado F02 e a colônia M194 obtida a partir do isolado F12 foram consideradas mutantes nitrato redutase, pois não apresentaram crescimento em meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio, mas apresentaram crescimento nos demais meios com outras fontes de nitrogênio.



**Figura 2.** Teste para identificação de mutantes nitrato redutase caracterizados pela habilidade de crescimento em diferentes fontes de nitrogênio. A) Isolado F12 crescendo em meio mínimo mais clorato (Cove, 1979), denominado de M194. Pode-se observar a área de crescimento diferenciado demarcado com um círculo vermelho. B) Mutante M194 crescendo em meio mínimo (MM) mais cloreto de amônio (nota-se o crescimento aéreo dos micélios). C) Mutante M194 crescendo em MM mais glutamato. D) Mutante M194 crescendo em MM mais nitrito. E) Mutante M194 crescendo em MM mais hipoxantina. F) Mutante M194 inoculado em MM mais nitrato, não foi observado crescimento de micélio aéreo neste meio (a coloração avermelhada é devido a um crescimento residual do micélio do mutante).

**Tabela 1.** Teste para a identificação de mutantes nitrato redutase com diferentes fontes de nitrogênio.

Mutantes resistentes ao clorato	Fontes de nitrogênio				
	Nitrato	Nitrito	Amônio	Hipoxantina	glutamato
M01*	-	+	+	+	+
M46*	-	+	+	+	+
M72*	-	+	+	+	+
M96	-	-	+	+	+
M119	-	-	+	+	+
M141	-	-	+	+	+
M165*	-	+	+	+	+
M170	-	-	+	+	+
M192	-	-	+	+	+
M194*	-	+	+	+	+
M198	-	-	+	+	+
M204	+	+	+	+	+
M205	+	+	+	+	+
M209	-	-	+	+	+
M211	-	-	+	+	+

- não crescimento

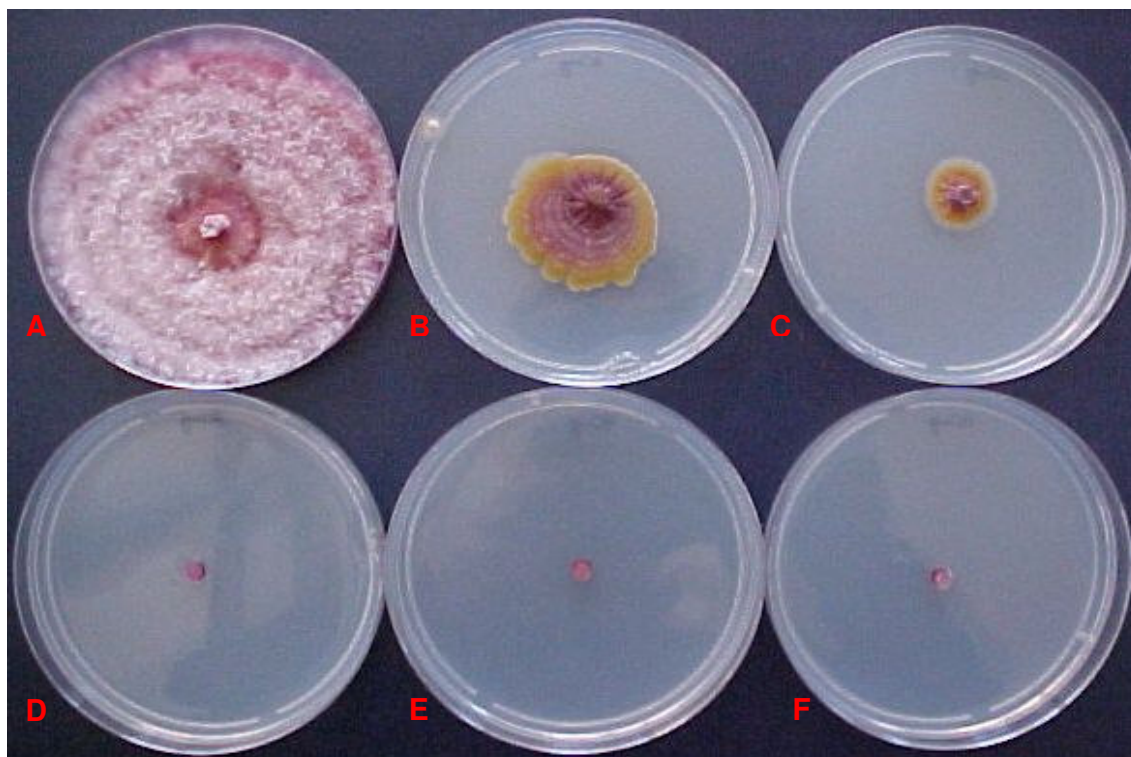
+ crescimento

\* mutantes nitrato redutase

Para testar se a mutação no gene da nitrato redutase poderia ser revertida, um teste de estabilidade foi realizado com os cinco mutantes nitrato redutase, inoculando-os em meio BDA várias vezes e voltando a colocá-los novamente em meio contendo clorato. Todos os cinco mutantes mantiveram o fenótipo de resistência ao clorato após 5 repicagens em meio não seletivo para a mutação.

Como a seleção inicial dos transformantes será realizada através do gene de resistência a higromicina contido no plasmídeo *pAN7-1*, foi preciso estabelecer a dose de antibiótico necessária para o controle de *F. graminearum*. Para isso, foram realizados dois testes. No primeiro, o isolado F02 foi inoculado em placas de Petri com meio BDA, contendo diferentes concentrações de higromicina (0, 50, 100, 150, 200 e 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Neste teste, somente a placa controle (sem higromicina) apresentou crescimento do fungo, enquanto que para as demais doses, não foi observado nenhum tipo de crescimento, demonstrando que as doses de

higromicinas estavam muito altas e que um segundo teste com doses menores do antibiótico deveria ser realizado. O segundo teste foi realizado da mesma maneira que o primeiro, alterando apenas as concentrações de higromicina (0, 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Na placa de controle (sem higromicina), o crescimento do fungo foi normal, descartando eventuais problemas no meio de cultura ou nas condições de crescimento. Para as placas contendo 10 e 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de higromicina, o crescimento do fungo foi bastante debilitado, porém houve uma pequena área de crescimento ao redor do local de inoculação. Para as demais concentrações não houve nenhum crescimento fúngico, indicando que doses acima de 30  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de higromicina, são suficientes para evitar o crescimento de *F. graminearum* em meio BDA. A Figura 3 mostra a foto das placas de Petri com meio BDA com diferentes concentrações de higromicina do segundo teste, inoculadas com o isolado F02 de *F. graminearum*.



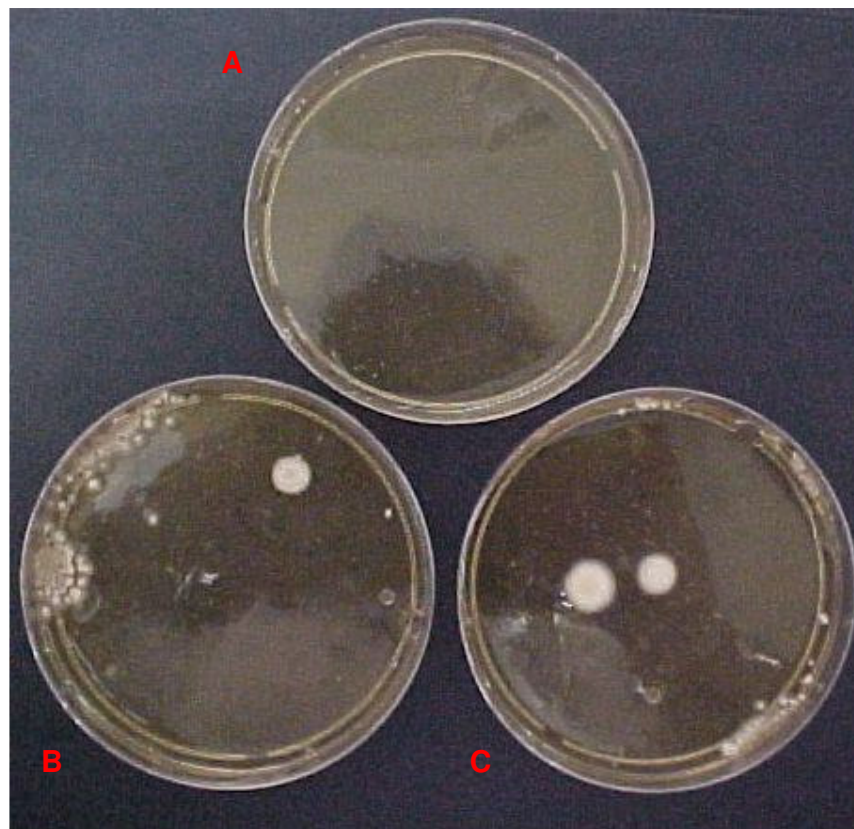
**Figura 3.** Teste de resistência de *F. graminearum* a diferentes concentrações de higromicina. A) meio BDA sem higromicina (controle); B) meio BDA com 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de higromicina; C) meio BDA com 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de higromicina; D) meio BDA com 30  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de higromicina; E) meio BDA com 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de higromicina; F) meio BDA com 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de higromicina.

Para a produção de protoplastos e co-transformação, foram escolhidos os mutantes M01 e M194, devido a um menor crescimento residual em meio contendo nitrato contendo nitrato como única fonte de nitrogênio. Uma suspensão de conídios dos mutantes foi adicionado ao MC líquido e incubado a 25 °C/150 rpm por 24 horas, o micélio foi então filtrado e tratado com solução de driselase 2% e incubados a 30°C sob agitação constante de 60 rpm por 3-4 horas. Os protoplastos foram filtrados e a contagem feita em câmara de Newbauer. A concentração máxima obtida de protoplastos de  $1,2 \times 10^7 \text{.mL}^{-1}$ , também ficou abaixo das alcançadas por Wiebe et al (1997) que variaram de  $5 \times 10^8 \text{.mL}^{-1}$  a  $2 \times 10^9 \text{.mL}^{-1}$ , mesmo utilizando a concentração de driselase a 2% recomendada pelo autor. Para aumentar a concentração de protoplastos para a transformação, a solução de protoplastos foi centrifugada e ressuspendida em um volume menor de solução para obter uma concentração mínima de  $10^7 \times 0,1 \text{mL}^{-1}$ .

Para a transformação, os protoplastos foram tratados com solução de PEG/CaCl<sub>2</sub> e 20 µg de DNA plasmidial (10 µg de cada plasmídio - pNI160 e pAN7.1) foi adicionado. Os protoplastos foram incubados em gelo por 30 minutos e após este período plaqueados em meio completo contendo glutamato como única fonte de nitrogênio e sacarose 1M como estabilizador osmótico. Após 3 horas, foi vertido sobre as placas 10 mL de meio completo com higromicina (agente de seleção). Apesar do teste de higromicina com o isolado F02 de *F. graminearum*, demonstrar que concentrações acima de  $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$  serem suficientes para impedir o desenvolvimento do fungo, utilizou-se uma dose de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para ter uma segurança maior para os resultados obtidos. Para os protoplastos do mutante M01 foram obtidos 3 possíveis transformantes (Figura 4), mas quando transferidos para novo meio, somente um mostrou capacidade de crescer em meio contendo higromicina, sendo denominado de T03. Para os protoplastos do mutante M194, foi obtido um número maior de



possíveis transformantes, contudo ao serem repicados para um novo meio seletivo, nenhum conseguiu se desenvolver.



**Figura 4.** Protoplastos plaqueados pelo método “pour-plate” em meio completo contendo glutamato como única fonte de nitrogênio, sacarose 1M como estabilizador osmótico e higromicina ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de meio). As placas “B” e “C” apresentam pontos de crescimento vigoroso, que foram repicados, cada um, para placas isoladas contendo o mesmo meio.

#### 4. DISCUSSÃO

O teste para escolha do meio de seleção de mutantes resistentes ao clorato demonstrou que o meio de cultura descrito por Cove (1979) foi mais adequado que o descrito por McCallum (2001), para o isolado F02 de *F. graminearum*. Embora ambos os meios permitirem um crescimento inicial do fungo, este foi diferenciado entre os dois. No primeiro, o fungo teve um crescimento inicial rasteiro, alaranjado, sem a presença de micélios aéreos e a identificação dos mutantes resistentes ao clorato foi realizada através da visualização de

áreas com crescimento diferenciado, com o aparecimento de micélios aéreos de coloração avermelhada, mais próxima a cor natural de *F. graminearum* em meio BDA (Figura 2A). Apesar de no método descrito por McCallum (2001) também ocorrer um crescimento inicial, neste o fungo apresentou um rápido desenvolvimento nos primeiros dias com o surgimento de micélios aéreos finos e de coloração esbranquiçada a rósea, que se concentrou ao redor do ponto de inoculação. Contudo, nenhuma área com crescimento diferenciado foi observada e, após alguns dias (5 a 7), o fungo cessou seu desenvolvimento. Como o isolado foi cultivado em meio BDA e as repicagens para os outros dois meios de seleção contendo clorato, foram feitas através do corte de discos de 0,45mm de diâmetro, estes podem estar servindo como fontes de nutrientes nos primeiros dias após a inoculação. Estes discos de BDA, que contém o micélio do fungo para repicagem, podem servir tanto como fonte direta de nutrientes, como indiretamente através da difusão de seus nutrientes para o novo meio.

O fato do fungo ter um desenvolvimento inicial mais vigoroso no meio descrito por McCallum do que aquele descrito por Cove, pode ser explicado pela menor concentração de clorato no primeiro meio em relação ao segundo, fazendo com que o fungo aproveite melhor os nutrientes ainda disponíveis no disco de BDA. Entretanto, esse crescimento inicial mais vigoroso não apresentou, aparentemente, nenhuma vantagem na seleção de mutantes, visto que após o término destes nutrientes “residuais”, o fungo paralisou seu crescimento e nenhuma área com crescimento diferenciado que indicaria um possível mutante, foi observada. Para ter certeza de que aqueles micélios aéreos encontrados no meio de McCallum não foram originados de mutantes resistentes ao clorato, eles foram repicados para o meio de Cove que contém uma maior concentração de clorato, mas nenhum foi capaz de manter o crescimento, não sendo considerados portanto, mutantes resistentes ao clorato. Por apresentar melhores resultados nestas condições, o meio descrito por Cove (1979) foi o escolhido para continuar a seleção dos mutantes resistentes ao clorato.

As diferenças encontradas entre os dois isolados escolhidos, sendo a seleção de 1 mutante para cada 20 placas inoculadas com o isolado F02 e de 1 mutante para cada 7 placas inoculadas com o isolado F12, sugerem que este último seria o isolado mais indicado para a obtenção de grande número de mutantes resistentes ao clorato. Porém, o teste com diferentes fontes de nitrogênio, revelou que enquanto 50% dos mutantes resistentes ao clorato selecionados pelo isolado F02 eram mutantes para o gene nitrato redutase, essa porcentagem caiu para 14% no isolado F12. Dos 8 mutantes resistentes ao clorato selecionados através do isolado F02, 4 foram determinados como mutantes para o gene nitrato redutase e os outros 4 foram determinados como mutantes para um regulador específico. A partir do isolado F12 foram selecionados 7 mutantes resistentes ao clorato, sendo que apenas 1 foi considerado mutante para o gene nitrato redutase, 4 mutantes para um regulador específico e 2 mutantes para a permease.

Algumas hipóteses também podem explicar as diferenças no número de conídios e de protoplastos obtidos neste trabalho em relação ao desenvolvido por Wiebe (1997). Primeira, a própria diversidade genética encontrada em *F. graminearum* pode ser uma das causas das diferenças encontradas em relação à quantidade de conídios produzidos por diferentes isolados. Segunda, o protocolo desenvolvido por Wiebe (1997) foi elaborado utilizando como modelo uma cepa industrial de *F. graminearum*, denominada de A3/5, utilizada para a produção da mico-proteína Quorn<sup>®</sup>. Trata-se, portanto, de uma cepa selecionada para fins industriais, que apresenta grande facilidade de cultivo submerso, além de possuir um alto padrão de crescimento.

Estas diferenças encontradas em relação a produção de macroconídios, porcentagem e tipos de mutantes selecionados, reforçam os resultados obtidos em outros trabalhos sobre a diversidade entre isolados de *F. graminearum*. Vários estudos de compatibilidade vegetativa neste e em outros fungos (Bowden & Leslie, 1992; MacCallum et al., 2001; Takehara et al.,

2003) são realizados for, utilizando mutantes resistentes ao clorato para agrupar isolados em diferentes GCV's, conforme o tipo de gene mutado. Estudos de compatibilidade vegetativa em *F. graminearum* também já foram realizados no Brasil, utilizando-se mutantes resistentes ao clorato (Busso, 2005).

Apenas um transformante foi obtido sendo denominado T3, mostrando a viabilidade do protocolo, mas também, que mais estudos devem ser realizados para se aumentar o número de protoplastos e transformantes. Se confirmada, através de hibridização, a transformação de T3 com uma única cópia do elemento *impala*, este poderá, além de confirmar a capacidade de transposição deste elemento em *F. graminearum*, servir também em estudos de expressão gênica, principalmente àqueles relacionados a genes envolvidos nos processos de patogenicidade.

Em relação ao baixo número de transformantes, uma possível explicação pode estar relacionada ao tempo de regeneração dos protoplastos em meio completo sem a adição da higromicina. Um período de 3 horas de incubação pode ser insuficiente para que ocorra a regeneração e um crescimento mais vigoroso dos protoplastos, que não resistem à adição do antibiótico. Um período de 18 horas de incubação até a adição da higromicina, também testado por Wiebe et al., (1997) apresentou bons resultados, mas podem-se ter problemas no isolamento de transformantes devido ao crescimento mais vigoroso.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

O meio para seleção para de mutantes resistentes ao clorato, descrito por Cove (1979), demonstrou ser o mais eficiente para os isolados de *F. graminearum* testados.

Doses acima de 30  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de higromicina B são suficientes para o controle do crescimento e desenvolvimento do isolado F02 de *F. graminearum*.

Para o desenvolvimento completo do protocolo ainda é necessário realizar mais estudos, principalmente para se elevar o número de protoplastos e transformantes obtidos.

Se confirmada, através de hibridização, a transformação de T3 com uma única cópia do elemento *impala*, este poderá ser cultivado em meio de cultura contendo nitrato como única fonte de nitrogênio, a fim de verificar a capacidade de transposição do elemento *impala* e a obtenção de revertentes.

A obtenção de revertentes de *F. graminearum* pode oferecer oportunidades de estudos relacionados a mutagênese insercional, principalmente àqueles relacionados a genes envolvidos nos processos de patogenicidade, genes relacionados a produção de micoproteínas (NIV e DON), entre outros.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOWDEN, R. L., & LESLIE, J. F. Nitrate-nonutilizing mutants of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) and their use in determining vegetative compatibility. **Exp. Mycol.** 16:308-315. 1992.

BROOKER, N. L., LESLIE, J. F., DICKMAN, M. B. Nitrate non-utilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. **Phytopathology**, 81:672-677. 1991.

COVE, D. J. Genet studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. **Biological Review** 54:291-327. 1979.

DABOUSSI, M. J. Fungal transposable elements and genome evolution. **Genetica** 100:253-260. 1997.

FINCHAM, J. R. S. Transformation in fungi. **Microbiological Reviews** 53:148-170. 1989.

HUA-VAN, A.; PAMPHILE, J. A.; LANGIN, T.; DABOUSSI, M. J. Transposition of autonomous and engineered *impala* transposons in *Fusarium oxysporum* and a related species. **Current Genetics**, v. 264, p. 724-731, 2001.

LANGIN, T., CAPY, P., DABOUSSI, M. J. The transposable element *impala*, a fungal member of the Tc1-mariner superfamily. **Mol. Gen. Genet.** 246:19-28. 1995.

McCALLUM, B. D., TEKAUZ, A., GILBERT, J. Vegetative compatibility among *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) isolates from barley spikes in southern Manitoba. **Can. J. Plant. Pathol.** 23:83-87. 2001.

NICOSIA, M.G.L.D.; BROCARD-MASSON, C.; DEMAIS, S.; HUA-VAN, A., DABOUSSI, M.J.; SCAZZOCCHIO, C. Heterologous transposition in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, v. 39, p. 1330-1344, 2001.

PEREIRA, J. F., LIMA, J. O., ROCHA, R. B., MEDINA, P. X. L., ARAÚJO, E. F., QUEIROZ, M. V. Nitrato redutase em fungos filamentosos. **Biotechnol. Cienc. Desenvol.** 31:74-85. 2003.

PONTECORVO, G., ROPER, J. A., HEMMONS, L. M., MacDONALD, K. D., BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics** 5:141-238. 1953.

PUNT, P. J. & VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance markers. **Methods in Enzymology** 216:447-457. 1992.

QUEIROZ, M. V., DABOUSSI, M. J. *Impala*, a transposon from *Fusarium oxysporum*, is active in the genome of *Penicillium griseoroseum*. **FEMS Microbiol. Lett.** 218:317-321. 2003.

RIVADENEIRA, M. Variabilidade de *Fusarium* spp. Agente Etiológico de Giberela em Trigo e Identificação de Fontes de Resistência à Fusariose da Espiga em Trigos Sintéticos. Dissertação de Mestrado em Agronomia, Universidade de Passo Fundo – UPF. 71p. 2001.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., and MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, **Cold Spring Harbor**, NY. 1989.

TAKEHARA, T., KUNIYASU, K., MORI, M., HAGIWARA, H. Use of a nitrate-nonutilizing mutant and selective media to examine population dynamics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Spinaciae* in soil. **Phytopathology** 93:1173-1181. 2003.

TSCHEN, J.S.M. & LI, I. F. Optimization of formation and regeneration of protoplast from biocontrol agents of *Trichoderma* species. **Mycosciense** 35:257-263. 1994.

UNKLES, S. E., CAMPBELL, E. I., RTUITER-JACOBS, Y. M. J. T., BROCKHUIJSEN, M., MACRO, J. A., CARREZ, D., CONTRERAS, R., VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J., KINGHORN, J. R. The development of a homologous transformation system for *Aspergillus oryzae* based on the nitrate reductase assimilation pathway: a convenient and general selection system for filamentous fungal transformation. **Molecular and General Genetics** 218:99-104. 1989.

VILLALBA, F., LEBRUN, M. H., HUA-VAN, A., DABOUSSI, M. J., GROSJEAN-COURMOYER, M. C. Transposon *Impala*, a novel tool for gene tagging in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interaction** 14:08-15. 2001.

WIEBE, M. G., NOVÁKOVÁ, M., MILLER, L., BLAKEBROUGH, M. L., ROBSON, G. D., PUNT, P. J., TRINCI, A. P. J. Protoplast production and transformation of morphological mutants of the Quorn<sup>®</sup> myco-protein fungus, *Fusarium graminearum* A3/5, using the hybromycin B resistance plasmid pAN7-1. **Mycol. Res.** 101:871-877. 1997.