



CECILIA ARMESTO

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE
Colletotrichum gloeosporioides AGENTE
ETIOLÓGICO DA MANCHA MANTEIGOSA EM
CAFEEIRO COM O GENE *gfp***

**LAVRAS – MG
2010**

CECILIA ARMESTO

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Colletotrichum gloeosporioides*
AGENTE ETIOLÓGICO DA MANCHA MANTEIGOSA EM CAFEIEIRO
COM O GENE *gfp***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador
Dr. Mario Sobral de Abreu

Co-Orientador
Dr. José da Cruz Machado

**LAVRAS – MG
2010**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Armesto, Cecília.

Transformação genética de *Colletotrichum gloeosporioides*
agente etiológico da mancha manteigosa em cafeeiro com o gene *gfp*
/ Cecília Armesto. – Lavras : UFLA, 2010.

44 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Mário Sobral de Abreu.

Bibliografia.

1. *Coffea arabica*. 2. Doenças fúngicas. 3. Proteína fluorescente.
4. Fungos fitopatogênicos. 5. Fitopatologia. 6. Genética de
microrganismos. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.44

CECILIA ARMESTO

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Colletotrichum gloeosporioides*
AGENTE ETIOLÓGICO DA MANCHA MANTEIGOSA EM CAFEIEIRO
COM O GENE *gfp***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de julho de 2010.

Dra. Antonia Figueira dos Reis

UFLA

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza

EPAMIG

Dr. Mário Sobral de Abreu
Orientador

Co-Orientador
Dr. José da Cruz Machado

**LAVRAS - MG
2010**

Ao meu sempre companheiro, Piero Iori.

OFEREÇO

*A Minha Família: meu pai Juan, minha mãe Joana e
minha irmã Mariana.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento do projeto.

Ao professor Mario Sobral de Abreu, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e pela amizade, ensinamentos e orientação, indispensável na conclusão deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Diagnose e Controle de Doenças de Plantas, Fernanda Gonçalves Martin Maia, Bruno Marques e Claudio Ogoshi.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Vegetal e Laboratório de Patologia de Sementes Priscila G., Priscila, Nara, Anderson, Romário, Luana e Carolina, por toda a ajuda concedida.

À professora Antonia Figueira dos Reis, pelo apoio e pela colaboração ao trabalho.

Ao meu sempre companheiro Piero Iori, pelo amor e dedicação.

Aos meus pais Juan e Joana, pelo amor e esforço para que eu chegasse até aqui. A minha irmã Mariana e ao meu cunhado Bráulio, pelas conversas engraçadas.

A minha eterna amiga Ligia.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela amizade e auxílio e a todos que indiretamente me ajudaram a concluir este trabalho, meu muito obrigado!

RESUMO

A cultura do café sofre com diversos problemas fitossanitários, dentre os quais evidenciam-se doenças de natureza fúngica, como a mancha-manteigosa, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, cuja ocorrência vem se agravando nas regiões produtoras de café (*Coffea arabica* L.). A falta de informações sobre o patossistema *Colletotrichum* x Cafeeiro dificulta a elucidação de aspectos relacionados à patogenicidade de raças e de transmissibilidade. A utilização de microrganismos geneticamente modificados por meio de marcadores moleculares tem sido uma ferramenta importante para esses tipos de estudos. Desse modo, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a eficiência de dois sistemas de transformação genética utilizando o gene marcador *gfp*, assim como as características culturais, a estabilidade dos transformados e a patogenicidade dos isolados transformados de *Colletotrichum gloeosporioides*. Utilizando os dois sistemas de transformação (PEG e eletroporação) constatou-se a eficiência de ambos, confirmada por meio de microscopia de epifluorescência e pela resistência ao antibiótico higromicina-B, quando incorporado ao meio de cultivo. O fungo manteve suas características morfológicas e culturais quando comparado aos isolados selvagens. Ao ser inoculado em plântulas de café, verificou-se que a patogenicidade dos isolados transformados não foi alterada após a transformação.

Palavras-chave: Mancha-manteigosa. *Colletotrichum gloeosporioides*. *gfp*.

ABSTRACT

Coffee culture has various sanitary problems, among them, showed up to order fungal diseases, such as blister spot, caused by *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, which has deteriorated in areas producing coffee (*Coffea arabica* L.). The lack of information about the *Colletotrichum* pathosystem x Coffee difficult to elucidate aspects of the pathogenicity of races and transmissibility. The use of genetically modified microorganisms using molecular markers has been an important tool for these types of studies. Thus our study aimed to evaluate the efficiency of two systems of genetic transformation using the marker gene *gfp* (Green Fluorescent Protein), as well as cultural characteristics, stability and processed, and pathogenicity of isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* processed. It found success using the two processing systems, confirmed this by means of epifluorescence microscopy and resistance to the antibiotic hygromycin-B, where incorporated into the culture medium. The fungus maintained its cultural and morphological characteristics compared to the wild strains. To be inoculated on seedlings of coffee can be seen that the pathogenicity of the isolates processed were not changed after the transformation.

Keywords: Blister spot. *Colletotrichum gloeosporioides*. *gfp*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	<i>Colletotrichum</i> spp. em café.....	11
2.2	A Mancha-manteigosa.....	13
2.3	Transformação genética em fungos.....	14
2.4	Marcadores fluorescentes.....	17
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1	Isolado de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	20
3.2	Teste de sensibilidade à higromicina-B.....	20
3.3	Obtenção dos protoplastos.....	21
3.4	Multiplicação do plasmídeo.....	21
3.5	Transformação química mediada por polietilenoglicol (PEG)	22
3.6	Transformação por eletroporação.....	22
3.7	Análise por microscopia de epifluorescência.....	23
3.8	Avaliação das características culturais e estabilidade mitótica.....	23
3.9	Avaliação da patogenicidade dos transformados.....	24
3.10	Sistematização e análise dos resultados.....	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
6	CONCLUSÕES.....	38
	REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

A cafeicultura é uma das atividades mais importantes do país e de grande representatividade na economia mundial. O desenvolvimento de uma cafeicultura sustentável no Brasil passa pelo aumento da rentabilidade do produtor, como forma de garantir sua permanência na atividade. Isso depende de sistemas de cultivo estáveis, que proporcionem maior longevidade para as lavouras e rentabilidade frequente. Cultivares produtivas, adaptadas a cada condição edafoclimática e sistema de cultivo e resistentes a pragas e doenças estão entre os principais componentes da sustentabilidade da cafeicultura.

Entre os principais problemas fitossanitários que acometem a cultura, evidenciam-se doenças de natureza fúngica, como ferrugem (*Hemileia vastatrix*), cercosporiose (*Cercospora coffeicola*), mancha-de-phoma (*Phoma spp*), antracnose e mancha-manteigosa, sendo estas duas últimas pertencentes ao complexo *Colletotrichum*.

Segundo Abreu et al (2008), a ocorrência de *Colletotrichum* é grave em regiões cafeeiras no Brasil, notadamente quando se trata de mancha-manteigosa, determinando perdas significativas nas produções, principalmente quando ela se torna epidêmica. Desse modo, desperta a necessidade da realização de pesquisas em relação ao estudo das raças de *Colletotrichum*, à patogenicidade de genótipos e aos estudos de transmissibilidade e epidemiológicos.

O patossistema *Colletotrichum* x cafeeiro é composto por populações de espécies de *Colletotrichum* que ocasionam diversos sintomas, havendo indícios da existência de raças patogênicas. Este fato pode estar associado à existência de alta variabilidade genética dentro do gênero, sendo este um dos fatores que têm dificultado o estabelecimento de estratégias específicas para o manejo da doença (OROZCO 2003). Uma das grandes dúvidas em relação ao patossistema é o verdadeiro potencial dos isolado em causar sintomas, quando inoculados em

plântulas, já que existe a possibilidade de estes não serem os desencadeadores da doença e sim isolados que estão internamente nos tecidos e que, por algum fator externo, causam reações, levando à exteriorização dos sintomas.

A transformação de *Colletotrichum gloeosporioides* com genes fluorescentes pode ser um dos meios que levem à melhor compreensão desse patossistema. Sabe-se que este é um procedimento bem estabelecido, o qual possibilita que as células se tornem receptoras e permeáveis à entrada de DNA exógeno, constituindo importante ferramenta na manipulação genética de fungos filamentosos, que pode ser empregada em estudos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos (ZANETTE, 2007)

Estudos ainda necessitam ser realizados sobre a mancha-manteigosa em cafeeiros, para que se possam elucidar os efeitos de tal patossistema (ABREU; FERREIRA; MARTINS, 2008). Desse modo, objetiva-se com a utilização de genes marcadores, como a *gfp*, realizar a transformação genética de *Colletotrichum gloeosporioides*, assim como o acompanhamento dos transformantes, por meio de estudos de patogenicidade e características culturais das colônias, esclarecendo-se, dessa forma, aspectos importantes do referido patossistema.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Colletotrichum* spp. em café

Colletotrichum é um dos mais importantes gêneros de fungos fitopatogênicos nas regiões tropicais e subtropicais. Espécies desse gênero causam doenças significativas, economicamente, em cereais, gramíneas, leguminosas, hortaliças e em culturas perenes.

No complexo *Colletotrichum* x cafeeiro há diversos patossistemas, como mancha-manteigosa, antracnose de folhas e frutos, seca ou morte de ponteiros (*die-back*), queima-castanha (*brown blight*) e a antracnose-dos-frutos-verdes ou *coffee berry disease*, CBD (OROZCO, 2003).

Segundo Abreu, Ferreira e Martins (2008), o gênero *Colletotrichum* está amplamente distribuído em todas as regiões produtoras de café no mundo, tanto como saprófito ou como causador de doenças. Dentre as doenças mais importantes causadas pelo gênero, destacam-se a *coffee berry disease* (CBD), cujo agente causal é *Colletotrichum kahawae* Waller & Brigde, restrita ao continente africano e a mancha-manteigosa, que tem como agente causal *Colletotrichum gloesporioides* Penz. No Brasil, o gênero também está associado a doenças, como antracnose (que atinge folhas, ramos e frutos) e seca dos ponteiros, sendo esta a mais antiga doença atribuída ao fungo. Mundialmente, são reconhecidas três espécies isoladas de frutos, folhas e ramos, associadas ao patossistema *Colletotrichum* x cafeeiro: *C. kahawae* Waller & Brigde, *C. gloesporioides* Penz. e *C. acutatum* Simmonds.

No continente americano, não se conhece nenhum relato confirmado da ocorrência da CBD (CHALFOUN, 1997; OROZCO et al., 2002b). No Brasil, *Colletotrichum* spp. associado ao cafeeiro é composto de diversos patossistemas. A antracnose nas folhas do cafeeiro apresenta-se como manchas irregulares,

grandes, de coloração castanha a castanho-acinzentada, ocorrendo comumente nas margens das folhas (OROZCO, 2003; PARADELA FILHO et al., 2001). Segundo Paradela Filho *et al.* (2001), as lesões mais críticas e prejudiciais para o cafeeiro são aquelas em que o fungo incide sobre gemas, flores e chumbinho, provocando sua morte e queda, e enegrecimento e morte de ramos. Esses autores relatam, ainda, que os sintomas não estão relacionados com plantas injuriadas ou culturas mal manejadas; pelo contrário, eles são mais intensos e evidentes em culturas novas e muito bem desenvolvidas.

A mancha manteigosa é outra doença causada por *Colletotrichum gloeosporioides* cujos ataques mais intensos ocorrem nas folhas e ramos novos em plantas adultas, durante a fase de maior vegetação (MANSK; MATIELLO, 1977). Em cafeeiros com mancha-manteigosa, a produção pode ser grandemente afetada (FERREIRA et al., 2004).

Segundo Orozco et al. (2002b), o complexo *Colletotrichum* x cafeeiro no Brasil é composto por populações de espécies de *Colletotrichum* associadas ao café, ocasionando diversos sintomas ou colonizando as plantas de forma invasiva, sem manifestação de sintomas. Orozco et al. (2002a) afirmam, ainda, sobre a existência de raças patogênicas para os isolados da espécie *Colletotrichum gloeosporioides* que ocasionam os sintomas de mancha-manteigosa, seca de ponteiros e necrose em frutos.

Pereira (2005), estudando a variabilidade do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado ao cafeeiro por meio da técnica que utiliza mutantes nit, caracterizou grupos de compatibilidade vegetativa (VCG) para isolados de *C. gloeosporioides*. Este autor relata que a variabilidade encontrada entre os isolados deve-se ao alto número de grupos de VCG, concluindo sobre a complexidade dos estudos envolvendo espécies de *Colletotrichum*, já que a alta variabilidade pode interferir nos resultados.

2.2 A mancha-manteigosa

O primeiro relato de mancha-manteigosa ocorreu em 1957, feito por Wellman, na Costa Rica. Porém, somente no ano de 1972 é que Vargas & Gonzáles conseguiram demonstrar a associação da doença ao gênero *Colletotrichum*. No Brasil, as primeiras descrições datam de 1958, feitas por Bitancourt, porém, somente na década de 1990, quando foi constatada em cultivos de café na cidade de Cristais, MG, ocasionando manchas foliares, morte de plantas e afetando a produtividade da lavoura, é que essa doença tornou-se alvo de estudos (DORIZZOTO; ABREU, 1993; FERREIRA et al., 2004). Há relatos de sua ocorrência nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Espírito Santo, Rondônia e Amazonas. Em Minas Gerais, tem sido relatada em lavouras das cultivares Catucaí Vermelho e Amarelo, Rubi, Mundo Novo e Catucaí Vermelho.

Atualmente, a mancha-manteigosa em cafeeiro é uma doença que preocupa os produtores pelo aumento da incidência e agressividade com que se apresenta no campo, ocasionando o declínio vegetativo e, conseqüentemente, produtivo das plantas afetadas. Em observações de campo, cafeeiros com sintomas de mancha-manteigosa têm a produção gradativamente afetada, principalmente quando o fungo ataca flores e frutos em expansão. Assim, as plantas doentes não conseguem produzir frutos mesmo tendo boa floração. Na medida em que estes começam a desenvolver-se, os frutos chumbinhos mumificam e caem, chegando à perda total da produção (OROZCO et al., 2002a).

Mansk e Matiello (1977) descreveram, como sintomas característicos da mancha-manteigosa, manchas verde-claras de aspecto oleoso menos brilhante que a superfície da folha, medindo de 2 a 10 mm. Em estágios mais avançados essas manchas adquirem a coloração verde-pálida a amarela e bordos

irregulares, as quais coalescem e ocasionam a queda prematura das folhas. Em ramos e frutos, as lesões apresentam-se menores, com diâmetros entre 2 a 3 mm, deprimidas, necróticas de cor marrom-clara e bordas irregulares. Ataques intensos geralmente são observados em folhas e ramos novos de plantas adultas, ocorrendo necrose e seca dos ramos na parte apical, podendo levar à morte das plantas de forma descendente (FERREIRA, 2006).

Segundo Orozco (2003), o patossistema *Colletotrichum* x cafeeiro, no Brasil, se apresenta complexo. Resultados de testes de resistência em hipocótilos, cortes histopatológicos e testes de patogenicidade em frutos permitiram concluir que existem isolados patogênicos associados ao cafeeiro em Minas Gerais, contrapondo-se às afirmações de que os isolados deste fungo associado ao cafeeiro no Brasil são “não patogênicos, secundários, saprófitos ou oportunistas”. Este autor ainda relaciona a possível existência de raças patogênicas para isolados da espécie *Colletotrichum gloesporioides* e acredita que o mesmo possa estar presente na semente.

2.3 Transformação genética em fungos

O termo transformação genética refere-se ao processo de inserção de fragmentos de DNA exógeno em uma célula hospedeira, com a finalidade de promover a alteração genotípica do organismo receptor ou a expressão de tal DNA, permitindo, assim, o estudo de aspectos da biologia molecular de qualquer organismo vivo (MULLINS; KANG, 2001; PEDROZO, 2009). Esse processo de transferência consiste na introdução do DNA exógeno na célula hospedeira, na estabilidade e na replicação do DNA inserido e, como consequência, na expressão da característica desejada (RUIZ-DÍEZ, 2002).

O processo de transformação em fungos filamentosos também compreende pelo menos cinco requisitos básicos para a constatação do sucesso

do procedimento. Tais requisitos incluem células competentes (capazes de captar o DNA), o vetor de transformação, o transporte do vetor ao núcleo, duplicações e expressão do vetor e um método eficiente de identificação das células transformadas (LONGO, 1995).

Para que ocorra a inserção do referido fragmento de DNA exógeno em uma célula hospedeira, há a necessidade de um processo de transformação para que esta célula se torne apta a recebê-lo. Atualmente, existem diversas técnicas pelas quais se pode obter a inserção de um fragmento de DNA. Dentre elas estão:

a) a transformação química, na qual a absorção do DNA é intermediada pela presença de íons de cálcio e de polietilenoglicol;

b) o tratamento com acetato de lítio, em que a introdução ocorre por meio da exposição das células a altas concentrações de acetato de lítio, tornando a parede celular permeável à entrada do DNA;

c) a biobalística, em que ocorre o bombardeamento, em alta velocidade, de partículas de tungstênio envoltas com DNA, diretamente em conídios ou hifas;

d) a eletroporação, na qual a inserção de DNA ocorre por meio de pulsos elétricos de curta duração (RUÍZ-DÍEZ, 2002).

No caso de fungos filamentosos e leveduriformes, a frequência de transformação utilizando células intactas é muito baixa e por isso é que as células são convertidas em protoplastos, sendo este um dos principais fatores de sucesso para a transformação genética: a obtenção de protoplastos viáveis.

Protoplastos são células artificialmente desprovidas de parede celular, o que possibilita que se tornem receptoras e permeáveis à entrada do DNA exógeno. Porém, vários fatores influenciam a obtenção de protoplastos, como a preparação enzimática, o estabilizador osmótico, a idade micelial e o microrganismo a ser utilizado (PEBERDY, 1976).

A obtenção de protoplastos de células fúngicas, utilizando várias enzimas degradadoras de parede celular, tem sido o método mais comum para se preparar células competentes para estudos genéticos (ZANETTE, 2007). Especialmente em fungos filamentosos que apresentam espessa parede celular, a protoplastização parece ser uma etapa essencial para uma transformação bem sucedida (POSSIEDE, 2004).

Uma vez preparadas as células competentes, a transformação prossegue pela entrada do DNA no núcleo. Depois, ele precisa ser duplicado (genes seletivos transcritos em um RNA mensageiro) e será traduzido em proteínas funcionais, permitindo, assim, a seleção dos transformantes. Em geral, a maioria dos eventos de transformação em fungos filamentosos envolve a integração do DNA transformante no genoma nuclear da célula receptora. O DNA integrado se duplica e é transcrito junto com o DNA da célula receptora. Essa integração pode ocorrer em um único ou em vários sítios, como simples ou múltiplas cópias, e em sítios específicos ou ao acaso.

A transformação genética resulta em uma série de fenótipos complexos, muitas vezes explicado como resultado da forma e local da integração dos plasmídeos no DNA genômico (LONGO, 1995).

Concomitante ao processo de transformação, há a necessidade de que, unido ao fragmento de DNA a ser inserido, exista um marcador, o qual permita a seleção das células transformadas. Um modo de seleção destas pode ser por meio de marcadores de resistência ou dominantes, as quais induzem a sensibilidade a determinadas drogas ou antibióticos (RUIZ-DÍEZ, 2002), por exemplo, como ocorre na utilização de marcadores resistentes a higromicina-B e ao fungicida Benomil (PEDROZO, 2009).

2.4 Marcadores Fluorescentes

As proteínas fluorescentes são ferramentas importantes que têm revolucionado a biologia celular na última década, principalmente no estudo de células vivas (FREITAG et al., 2004). Os genes que codificam essas proteínas são excelentes marcadores moleculares, pois a visualização dos seus produtos não requer substratos ou cofatores e podem ser empregadas em qualquer organismo que possa ser geneticamente modificado (CZYMMMEK; BOURETT; HOWARD, 2005; ISHIKAWA, 2009). Atualmente, na literatura, são descritos vários plasmídeos contendo genes que codificam diferentes proteínas fluorescentes, que fluorescem em diferentes comprimentos de onda, podendo ser observadas em diferentes colorações, como: verde-*gfp*, azul-*cfp*, amarelo-*yfp* e vermelho-*rfp*.

A green fluorescent protein ou GFP é uma proteína com 238 aminoácidos, que é intrinsecamente fluorescente e emite uma luz verde quando exposta à irradiação com ultravioleta (CHALFIE et al., 1994). Este gene é originário do cnidário *Aequorea Victoria* e tem sido utilizado como repórter em vários sistemas heterólogos, tornando-se uma ferramenta muito utilizada em biologia molecular.

A principal característica da GFP é a fluorescência proporcionada por sua estrutura terciária, chamada de *beta-can*, a qual possui, em seu interior, a região cromofórica responsável pela fluorescência. Tal propriedade permite que essa proteína, de detecção não invasiva, seja utilizada como um eficiente gene marcador in vivo. A GFP tornou-se importante também devido ao seu reduzido tamanho, à alta estabilidade e à fácil detecção (LIMA, 2001). Desse modo, o gene *gfp* pode ser facilmente clonado em diferentes vetores (plasmídios, cosmídios e bacteriófagos) e expresso nos mais variados tipos celulares, como procariotos, eucariotos inferiores e superiores (TSIEN, 1998).

A GFP não provoca interferência nas atividades celulares. Seu ensaio é simples e sua atividade pode ser detectada por vários métodos, inclusive usando microscopia de fluorescência, microscopia confocal ou medindo intensidade de fluorescência em células individualmente (WELSH; KAY, 1997). A detecção da fluorescência apresentada pela GFP pode ser obtida pela excitação da molécula com luz ultravioleta a 395 nm e a detecção da fluorescência emitida a 510 nm em fluorímetro.

As modificações no gene *gfp* têm sido realizadas em vários esquemas de mutagênese, visando o isolamento de mutantes que sejam mais eficientes. Entre esses mutantes têm-se os termoestáveis, os com intensidade fluorescente melhorada, mudança de códons para compatibilidade com o uso de códons do hospedeiro, remoção de sequências intrônicas e qualidade espectral, entre outros (WELSH; KAY, 1997). Atualmente, inúmeras variantes da molécula original são encontradas. Um exemplo é a GFP criada por Miller e Lindow (1997), que é sessenta vezes mais fluorescente que a original. A utilização da GFP tem permitido, nestes anos, o desenvolvimento de diversos estudos, utilizando-a fusionada a um promotor ou em uma proteína específica, de um organismo vivo, ou, mesmo, no funcionamento intracelular.

O monitoramento de células vivas é uma das grandes vantagens proporcionadas pela marcação de organismos com *gfp* (LIMA, 2001). Na fitopatologia, a GFP tem sido utilizada no estudo da interação entre fitopatógenos e seus respectivos hospedeiros, facilitando o monitoramento de microrganismos em plantas, controlando a sua distribuição e estimando sua biomassa. Oren et al (2003), em estudo sobre a interação entre *Fusarium verticilloides* em plantas de milho, destacaram a importância da marcação desse patógeno com GFP, por fornecer novas informações, auxiliando a explicar as diferenças que ocorrem nas interações, tanto virulentas quanto assintomáticas.

Ainda como exemplo da utilização de *gfp* no estudo da interação entre diversos fitopatógenos, tem-se: na penetração de *Erwinia amylovora* em macieiras (BIGS; GEIDER, 1999); no estudo de isolados de *Colletotrichum acutatum* patogênicos e não patogênicos (HOROWITZ; FREEMAN; SHARON, 2002) e na quantificação de *Trichoderma harzianum* no solo (ORR; KNUDSEN, 2004). Foram realizados também estudos “in vitro” de *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, patógeno de plantas de fumo (BOTTIN et al., 1999). Em feijão, a GFP foi utilizada para detectar a expressão da endopoligalacturonase de *Colletotrichum lindemuthianum*, durante seu processo de infecção (DUMAS et al., 1999).

Uma das vantagens do uso desse gene marcador é que ele não interfere na patogenicidade do isolado. Segundo Horowitz, Freeman e Sharon (2002), os isolados transformados com *gfp* de *Colletotrichum acutatum* permaneceram infectivos, assim como os isolados selvagens, e puderam ser detectados nos tecidos infectados, três dias após a inoculação. Foi possível observar o rápido desenvolvimento do fungo, preenchendo o mesofilo com denso micélio que invadiu as células e causou necrose do tecido.

Robinson e Sharon (1999) testaram a patogenicidade de *Colletotrichum gloesporioides* f. sp. *Aeschynomene*, transformados com o *gfp*. Todos tiveram patogenicidade igual à do isolado selvagem, tendo sido observada a fluorescência de conídios e micélio em tecidos inoculados e não inoculados. Mesmo aos dois meses após a inoculação, foi possível isolar conídios das plantas inoculadas, que continuaram a expressar a GFP. *Colletotrichum graminicola*, transformados com esse mesmo gene, também foram capazes de infectar sistemicamente o milho, sendo que as suas hifas foram encontradas nas raízes, colonizando a superfície, invadindo epiderme, córtex e tecidos vasculares (SUKNO et al., 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolado de *Colletotrichum gloeosporioides*

O isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* (IS2) utilizado para a transformação genética foi selecionado da coleção micológica do Laboratório de Diagnose e Controle de Doenças de Plantas, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, obtido de sintomas de seca de ponteiro, sendo este proveniente de culturas monospóricas, o qual teve sua patogenicidade previamente confirmada. Utilizou-se também isolado não patogênico (IH), com a finalidade de comparar sintomas, obtido de sintomas de necrose da haste, o qual também pertencente à coleção micológica do Laboratório de Diagnose e Controle de Doenças de Plantas.

Os isolados foram mantidos em meio ágar-extrato de malte 2% (MEA), em câmara de crescimento, a 25°C±1 e fotoperíodo de 12 horas.

3.2 Teste de sensibilidade à higromicina-B

Discos de 5 mm do isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura MEA acrescido do antibiótico higromicina-B (Hygromycin-B Sigma), nas concentrações de 0, 50, 75, 100, 150, 225, 300 µg.mL⁻¹, utilizando quatro repetições para cada tratamento. O desenvolvimento das culturas nas diferentes concentrações foi avaliado durante dez dias.

3.3 Obtenção dos protoplastos

Uma suspensão de 2×10^6 conídios. mL^{-1} foi colocada para crescer, por 24 horas, em meio malte líquido, sob agitação de 120 rpm, à temperatura ambiente. Após o crescimento, o micélio foi filtrado em peneira de $25\mu\text{m}$ e lavado, por duas vezes, com 5 mL de estabilizador osmótico.

Os seguintes fatores foram avaliados: estabilizadores osmóticos (NaCl 0,7M pH 5,7; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,2M pH 5,8; KCl 0,7M pH 5,8; MgSO_4 0,7M pH 5,5; sacarose 0,5M pH 5,7 e sorbitol 0,6M pH 5,7), concentração ideal de enzimas líticas para digestão (5, 10, 20 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$), tipo de estruturas fungicas (conídios e micélio) e tempo de geração de protoplastos (1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas).

Como procedimento padrão para a protoplastização, a cada 100 mg de micélio úmido utilizaram-se 3 ml de estabilizador osmótico com a adição do combinado de enzimas liticas (Lysing enzymes, Sigma # L 1393). Após o preparo, esta foi incubada à temperatura ambiente com agitação de 75 rpm. Após a liberação dos protoplastos, a suspensão foi centrifugada, e eles foram submetidos à análise microscópica e quantificados em câmara de Neubauer, com a finalidade de obter uma concentração final ajustada em 10^7 protoplastos. mL^{-1} .

3.4 Multiplicação do plasmídeo

O plasmídeo utilizado, pSC001, contendo o gene de resistência ao antibiótico higromicina-B e o gene promotor pToxA, originado do fungo *Aspergillus nidulans*, para expressão da proteína GFP, foi cedido pelo pesquisador Dr. Theo van der Lee (Plant Research International, The Netherlands). A multiplicação do plasmídeo foi realizada em células *Escherichia coli* DH α 5, sendo essas colocadas para crescer inicialmente em meio sólido e, em seguida, em meio líquido. Os plasmídeos foram posteriormente purificados

pelo método da lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989) e analisados em gel de agarose a 1%, corado com GelRed *nucleic acid gel stain*.

3.5 Transformação química mediada por polietilenoglicol (PEG)

Após a obtenção, os protoplastos foram ressuspensos em tampão de armazenamento, contendo quatro partes de STC (0,8 M sorbitol, 50 mM Tris HCl pH 8,0 e 50 mM CaCl₂) e uma parte de SPTC (0,8 M sorbitol, 40% PEG 4000, 50 mM Tris HCl pH 8,0 e 50 mM CaCl₂). Após a adição de 10 µl de DNA plasmidial, na concentração de 0,35-1,66 µg.µL⁻¹, essa suspensão foi incubada em gelo, por 30 minutos. Como controle foi utilizada água destilada autoclavada em lugar de DNA. Em seguida adicionou-se à suspensão 1 ml de SPTC, incubando-se, por 20 minutos, à temperatura ambiente. Depois ela foi vertida em 100 ml de meio de regeneração (0,1% extrato de levedura, 0,1% caseína hidrolisada, 34,2% sacarose, 1% ágar granulado), previamente autoclavado, e adicionado de 225 µg.ml⁻¹ de higromicina-B. O meio foi vertido em placas de Petri descartáveis e incubadas em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12 horas, a 25°C±1. Após 72 horas, as colônias crescidas foram transferidas para outras placas com meio MEA 2% adicionado de 225 µg.ml⁻¹ de higromicina-B. Para esta etapa, foram feitos dois ensaios, com cinco repetições cada.

3.6 Transformação por eletroporação

Para a transformação por eletroporação foram aplicados 10 µL do DNA plasmidial (0,35-1,66 µg.µL⁻¹), a 1 mL da suspensão de protoplastos (10⁷ protoplastos.ml⁻¹), empregando-se cinco repetições em cada um dos dois ensaios. Como controle, utilizou-se água destilada autoclavada no lugar de DNA plasmidial. As suspensões foram colocadas em cubetas descartáveis no gelo por

10 minutos. Passado este período, as amostras foram submetidas à eletroporação no eletroporador Cell Porator®, empregando-se resistência interna de 400 ohms, capacitância de 50 μf e intensidade de campo de 1,5 kv/cm. Em seguida, foram colocadas no gelo, por 15 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1 mL do estabilizador osmótico KCl, agitando-se gentilmente a suspensão que, então, foi vertida em 100 mL de meio de regeneração (0,1% extrato de levedura, 0,1% caseína hidrolisada, 34,2% sacarose, 1% ágar granulado), juntamente com 225 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de higromicina-B, utilizada para a seleção dos transformantes. O meio foi vertido em placas de Petri descartáveis e incubadas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas, a 25 \pm 1°C. Após 72 horas, as colônias crescidas foram transferidas para outras placas com meio MEA 2%, adicionadas de 225 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de higromicina-B.

3.7 Análise por microscopia de epifluorescência

Após sete dias de crescimento, foram feitas coletas do material fúngico transformado e observação dos em microscopia de epifluorescência (Zeiss Axio Observer Z.1) com filtro 470 a 490 nm e pico de transmissão em 510 a 560 nm.

3.8 Avaliação das características culturais e estabilidade mitótica

Após a transformação, os isolados foram avaliados quanto às suas características culturais. Para cada isolado, discos de 5 mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri com meio MEA, incubados sob fotoperíodo de 12 horas, \pm 25°C, durante dez dias. A avaliação do ensaio foi realizada pela determinação do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), coloração e esporulação das colônias.

Adicionalmente, foi realizado o teste de estabilidade mitótica com os transformantes, o qual consistiu da transferência de discos de 5 mm de diâmetro para placas de Petri com meio MEA. As colônias crescidas foram repicadas sucessivamente por sete vezes, sendo que a última repicagem em meio MEA continha o antibiótico higromicina-B ($225 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Depois, foram feitas observações utilizando-se microscopia de epifluorescência.

3.9 Avaliação da patogenicidade dos transformados

Foram avaliados os isolados transformados por eletroporação (IS2-E), os obtidos por PEG (IS2-P), o isolado selvagem (IS2) e um isolado não patogênico (IH). Para cada isolado foram inoculados, por aspersão, 10 hipocótilos na fase “palito de fósforo”, com suspensões de esporos na concentração de 2×10^6 conídios. ml^{-1} . Por 48 horas, os hipocótilos permaneceram em câmara úmida e, após este período, foram reinoculados e mantidos em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas a $25^\circ\text{C} \pm 1$, por 15 dias. Como testemunha, foram utilizados hipocótilos inoculados com o fungo não transformado e com água destilada esterilizada. Os sintomas foram avaliados conforme a Tabela 1 e a interpretação dos resultados foi feita pelo índice de intensidade de doença (IID) por meio da equação 1.

Tabela 1 Grau de sintoma observado em plântulas

Grau do sintoma	Severidade/Sintoma
1	Ausência de reação visível
2	Lesões iniciais nas folhas
3	Lesões acentuadas nas folhas
4	Lesões com início de estrangulamento no hipocótilo
5	Lesões acentuadas no hipocótilo
6	Planta morta

Fonte: Van DenVossen et al. (1976)

$$IID = \frac{\sum(n^\circ \text{ de hipocótilos em cada classe } \times \text{ valor numérico de cada classe})}{n^\circ \text{ de hipocótilos em todas as classes } \times 4} \quad (1)$$

3.10 Sistematização e análise dos resultados

Utilizando o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2000), os dados foram inicialmente avaliados pela análise de variância e teste F. A comparação entre as médias, quando o valor de F foi significativo, foi feita pelo teste de Scott e Knott (1974), a 5%. A construção de gráficos e a estimativa da correlação de Pearson entre algumas variáveis foram realizadas por meio da versão demonstrativa do aplicativo Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste de sensibilidade a higromicina-B demonstraram que houve crescimento gradual entre as diferentes concentrações. A partir de $225 \mu\text{g.mL}^{-1}$, houve redução significativa do crescimento do isolado IS2 de *Colletotrichum gloeosporioides* e, com $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$, houve inibição total crescimento micelial (Gráfico 1).

De acordo com dados da literatura, as concentrações do antibiótico utilizadas nos protocolos de transformações para fungos do gênero *Colletotrichum* e para outros fungos são bastante variáveis, podendo variar até entre raças. Para *Colletotrichum acutatum*, recomendam-se $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (HOROWITZ; FREEMAN; SHARON, 2002). Conforme Chen, Hsiang e Goodwin (2003), para isolados de *Colletotrichum destructivum* e *Colletotrichum orbiculare* $70 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi o suficiente para selecionar isolados transformados. Já conforme Ishikawa (2009), $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi o indicado para selecionar transformados de *Colletotrichum lindemuthianum*. Estes dados demonstram que a determinação da concentração de inibitório para higromicina-B deve ser identificada para cada caso em particular.

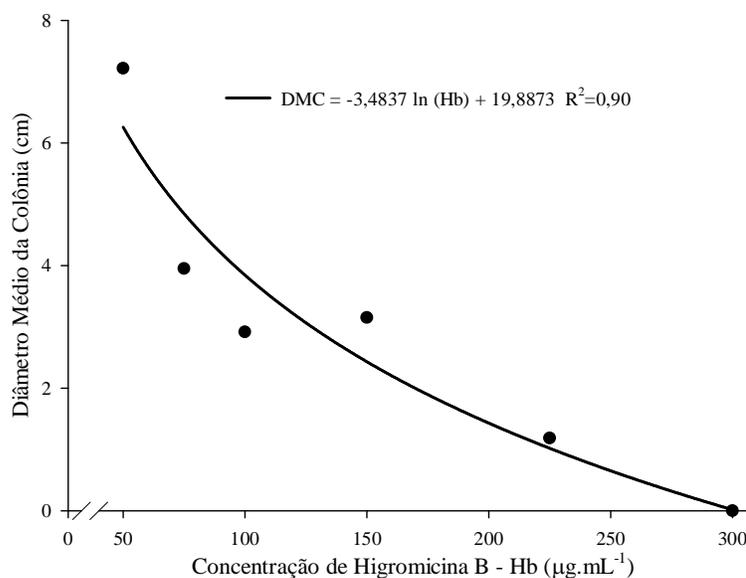


Gráfico 1 Crescimento médio do isolado IS2 de *C. gloeosporioides* em diferentes concentrações de higromicina-B

Na protoplastização de *Colletotrichum gloeosporioides*, dentre os fatores analisados, foi verificado que os de maior influência foram: estabilizador osmótico, tipo estrutura fúngica e o tempo de exposição às enzimas líticas. Observou-se, ainda, que o aumento da concentração da enzima lítica não resultou em maior produção de protoplastos.

Dentre os estabilizadores utilizados, constatou-se maior eficiência entre os estabilizadores salinos do que entre os compostos por açúcares. Resultados semelhantes foram encontrados por Lalithakumari (2000), que observaram que sais inorgânicos são preconizados como mais eficientes para a protoplastização de fungos filamentosos, enquanto açúcares ou açúcares-álcoois são mais apropriados para a liberação de protoplastos de leveduras. Os melhores resultados para a liberação de protoplastos de *C. gloeosporioides* foram obtidos utilizando-se KCl 0,7M e NaCl 0,7M, com $2,7 \times 10^6$ e $1,5 \times 10^6$ protoplastos.mL⁻¹, respectivamente (Gráfico 2). O estabilizador osmótico é um componente

importante no processo de protoplastização, pois deve promover condições favoráveis para a atividade enzimática, principalmente após a remoção da parede celular, quando o soluto deve garantir a integridade da célula até a síntese da nova parede (MARCHI et al., 2006).

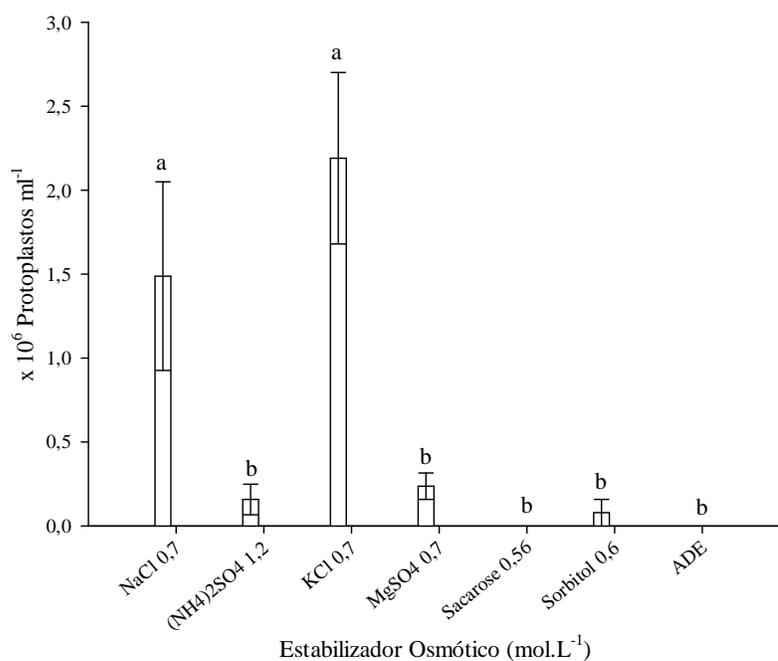


Gráfico 2 Média da produção de protoplastos em diferentes estabilizadores osmóticos. Colunas seguidas das mesmas letras não diferem pelo Teste de Scott-Knott, $P < 0,05$. Barra de erros representa o erro padrão da média

Acredita-se que, devido ao caráter mais ácido dos estabilizadores salinos, estes favoreçam a protoplastização de fungos filamentosos, considerando que o pH é fator crítico para a produção de protoplastos, influenciando as atividades do complexo enzimático (VEGA, 1990).

Em relação ao tipo de material fúngico utilizado, não houve produção de protoplastos, utilizando-se conídios de *C. gloeosporioides*. Zanette (2007), trabalhando com protoplastos de *Colletotrichum sublineolum*, constatou a

ineficiência da *lysing enzyme* na digestão de paredes das células conidiais, independente do tempo de exposição. Porém, quando o tratamento foi feito em hifas, a autora obteve até $5,5 \times 10^5$ protoplastos.mL⁻¹. Isso pode ser compreendido pelo fato de que a parede celular dos conídios é mais espessa do que as das hifas e de composição distinta, o que exige sistemas líticos mais complexos.

No presente trabalho, quando foram utilizadas hifas para a protoplastização de *C. gloeosporioides*, verificou-se que a maior liberação de protoplastos ocorreu após quatro a cinco horas de exposição (Gráfico 3). Depois desse tempo, o número de protoplastos decresce e os que permanecem no meio tornam-se deformados, devido à exposição excessiva à enzima, que degenera primeiros protoplastos formados.

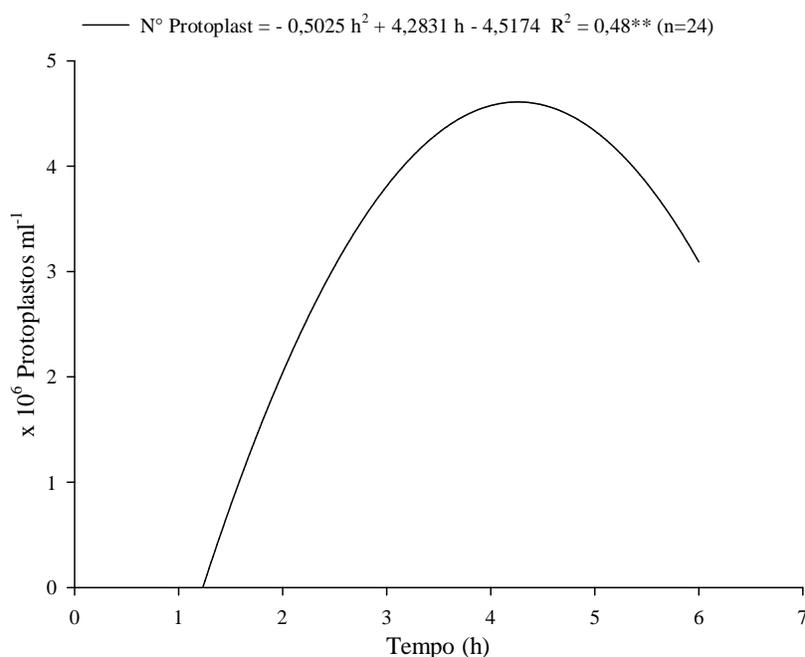


Gráfico 3 Número médio de protoplastos de *C. gloeosporioides* em função do tempo de hidrólise enzimática

A transformação genética com a utilização do plasmídeo PSC001, que expressa a *gfp*, foi bem sucedida em ambos os processos. A confirmação da transformação dos isolados de *C. gloeosporioides* foi comprovada por meio da resistência ao antibiótico higromicina-B e pela fluorescência verde nos isolados transformados, uma vez que os isolados selvagens, quando submetidos à microscopia de epifluorescência, não emitiam fluorescência.

A intensidade da fluorescência foi variável entre os isolados transformados, tendo sido observada principalmente no conteúdo citoplasmático de conídios e hifas. No geral, os mais altos de intensidade de fluorescência foram observados nos conídios de *C. gloeosporioides*.

Foi observado também que a qualidade da fluorescência entre as duas técnicas foi diferente. Em conídios de *C. gloeosporioides* transformados por eletroporação, notou-se que a fluorescência foi uniforme. Por outro lado, foram visualizadas falhas na emissão da fluorescência nos conídios transformados por PEG. O contrario foi observado para o micélio, pois os que foram transformados pelo método PEG, apresentaram maior número de hifas com alta fluorescência.

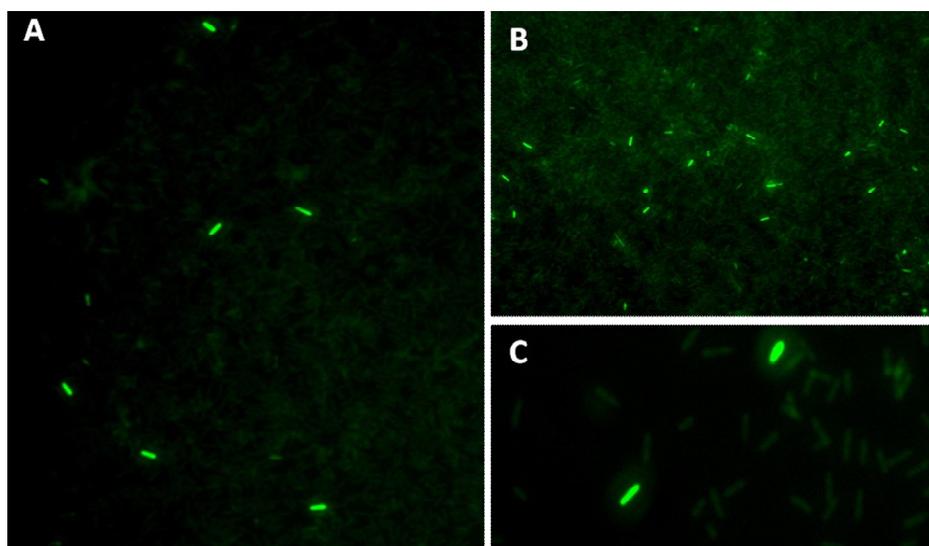


Figura 1 Conídios de *C. gloeosporioides* transformados por eletroporação, quando observados ao microscópio de epifluorescência, A) com aumento de 20X; B) com aumento de 10X; C) com aumento 40 de X

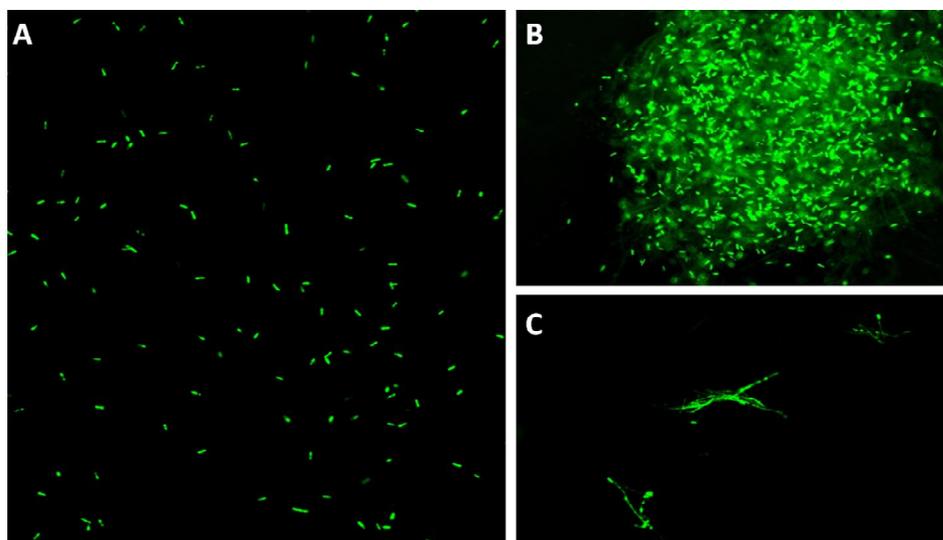


Figura 2 Conídios de *C. gloeosporioides* transformados por PEG, quando observados ao microscópio de epifluorescência, A) conídios esparsos com aumento de 10X; B) massa de conídios com aumento de 10X; C) hifas com aumento 10 de X

Quando transformados por eletroporação (Figura 1), foram obtidas 18 colônias de transformados. Este é o primeiro relato de transformação de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da mancha-manteigosa em cafeeiros, por eletroporação no Brasil.

Para a transformação química mediada por PEG (Figura 2), foram obtidas 21 colônias de transformados. A eficiência da transformação varia conforme o sistema utilizado e conforme o microrganismo a ser transformado. Robinson & Sharon (1999) conseguiram obter mais de 80 transformantes estáveis de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. Já Chen, Hsiang e Goodwin (2003), obtiveram 9 transformantes de *C. destructivum* e 8 de *C. orbiculare*. Oren et al. (2003), trabalhando com *Fusarium verticillioides*, obtiveram dois transformantes por μg de DNA plasmidial e West et al. (1999) geraram 64 transformantes de *Phytophthora palmivora*.

Alguns microrganismos incorporam naturalmente DNA exógeno, em certas condições, e quase todas as células são transformadas. Porém, em algumas populações, somente algumas células se tornam competentes, sendo possível que apenas um pequeno número de células tenha membrana plasmática permeável ao DNA transformante, limitando a frequência da transformação ou, até mesmo, a competência pode ser limitada por algum outro fator, como, por exemplo, características do núcleo (LONGO, 1995).

Conforme os resultados obtidos, pode-se inferir que o método empregado, muitas vezes, é capaz de interferir na eficácia da transformação. A eletroporação como sistemas de transformação é um processo bem estabelecido e muito empregado, utilizando como células competentes protoplastos e conídios germinados. No caso de conídios germinados, tem como vantagem o pouco tempo despendido no processo. Entretanto, a transformação genética com a aplicação de polietilenoglicol (PEG), apesar da utilização de diferentes soluções e de poder ser aplicado somente a protoplastos, gerados no momento da

transformação, pode ser realizado em qualquer laboratório, desde que as normas necessárias de assepsia e descarte sejam seguidas, não exigindo nenhum equipamento específico.

A avaliação dos isolados após os dois processos de transformação confirmou que eles não interferiram diretamente nas características culturais das colônias. Em relação à forma e à coloração das colônias, não houve diferença entre os isolados transformados e selvagens, que variaram de branco-cinza a salmão. Em relação ao índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), constatou-se uma diferença significativa entre os isolados transformados e o isolado selvagem (Tabela 2).

Tabela 2 Características culturais dos transformados de *C. gloeosporioides*

Isolados	IVCM (Ø - cm)	Coloração micélio	Esporulação	Formação de setores
IS2	2,06 a	Branco-cinza	-	Sim
IS2-E	1,67 b	Branco-cinza	-	Sim
IS2-P	1,70 b	Branco-salmão	+ -	Sim

SI2 – isolado de *C. gloeosporioides* patogênico

IS2-P – isolado de *C. gloeosporioides* transformado por PEG

IS2-E – isolado *C. gloeosporioides* transformado por eletroporação

+ - Abundante

- Moderado

Chen, Hsiang e Goodwin (2003) obtiveram sucesso na transformação de isolados de *Colletotrichum destructivum* e *Colletotrichum orbiculare*, observando que, mesmo após várias transferências de meios seletivos e não seletivos, houve a manutenção da estabilidade de expressão da fluorescência. Os transformantes apresentaram a mesma taxa de crescimento e as mesmas características culturais do tipo selvagem, podendo ser observada a expressão da GFP em todas as estruturas fúngicas durante a infecção de folhas de *Nicotiana benthamiana*.

Sobre estabilidade mitótica, quando os fungos transformados foram repicados, sucessivamente, por seis vezes em meio MEA, eles apresentaram crescimento normal. Porém, para os transformados obtidos por eletroporação, quando transferidos para meio MEA contendo higromicina-B ($225 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), os transformados não apresentaram crescimento após sete dias e não mantiveram sua fluorescência. Já os transformados obtidos com PEG demonstraram um pequeno crescimento quando transferidos para meio seletivo, porém, também não mantiveram sua fluorescência. Entretanto, quando ambos foram transferidos para meio sempre contendo higromicina-B, em média, cinquenta por cento dos isolados transformados com *gfp* mantiveram sua fluorescência.

Segundo Lorang et al. (2001), isso pode ser explicado pelo fato de alguns fungos formarem protoplastos multinucleados, o que pode originar transformantes com fluorescência em apenas algumas células fúngicas, sendo, então, necessárias sucessivas transferências em meio seletivo para manter a fluorescência. Conforme Siqueira (2009), nestes casos, o núcleo não mantém a informação necessária para a produção da fluorescência ao longo das sucessivas repicagens.

Por meio do teste de patogenicidade dos isolados transformados de *C. gloeosporioides* em plântulas de café, ficou evidenciado que esses isolados mantiveram a sua capacidade de infectar e causar danos (Tabela 3). A capacidade infectiva de todos os isolados transformados com o marcador *gfp* neste estudo foi comparável à do isolado selvagem. Depois do teste, foi realizado o isolamento do patógeno em meio sintético, confirmando que o mesmo foi o causador das lesões e este foi observado também em microscopia de epifluorescência, confirmando a presença dos transformados (Figura 3).

Tabela 3 Patogenicidade apresentada pelos isolados transformados

Isolado	Índice de intensidade da doença
IS2	0,90
IS2-P	0,45
IS2-E	0,66
IH	0,00
ADE	0,00

SI2 – isolado de *C. gloeosporioides* patogênico

IS2-P – isolado de *C. gloeosporioides* transformado por PEG

IS2-E – isolado *C. gloeosporioides* transformado por eletroporação

IH – Isolado de *C. gloeosporioides* não patogênico

ADE – inoculação com água destilada esterilizada

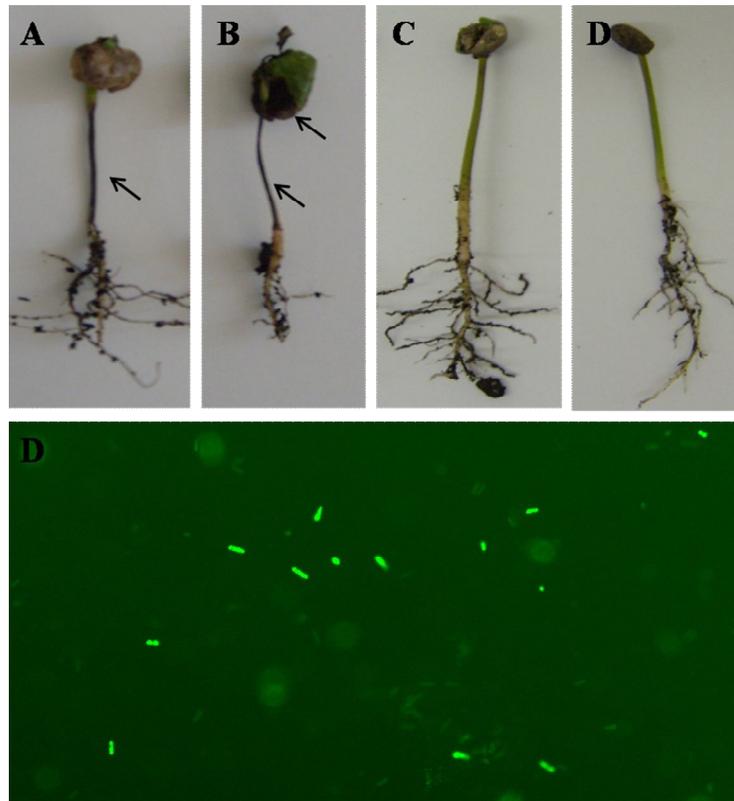


Figura 3 Hipocótilos de café com sintomas de necrose no caule causada por *C. gloeosporioides* e sadios (controles); A) infecção pelo isolado transformado; B) infecção pelo isolado selvagem patogênico; C) Isolado selvagem não patogênico; D) Controle inoculado com água; E) conídios isolados dos hipocótilos de café inoculado com os isolados transformados

Neste trabalho, reforça-se a importância do uso de marcadores genéticos, os quais, posteriormente, serão utilizados em estudos de patogenicidade e transmissibilidade, assim como no de comportamento do fitopatógeno na planta, auxiliando na elucidação de aspectos relevantes no complexo *Colletotrichum* x cafeeiro – mancha-manteigosa, culminando em valiosas informações para o estabelecimento de estratégias de controle e manejo da doença.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em vista dos avanços obtidos e do quão relevante são, para o patossistema *Colletotrichum* x cafeeiro, estudos complementares a este ainda necessitam ser realizados.

Uma análise mais detalhada, a qual possa ser realizada em microscopia confocal, possivelmente contribuirá para a conclusão dos resultados aqui demonstrados, possibilitando o direcionamento dos estudos de caracterização patogênica, assim como o desenvolvimento e o monitoramento dos transformados nos tecidos das plântulas.

No caso de proteínas fluorescentes, a confirmação do transformante pode ser facilmente detectada por meio da expressão de sua fluorescência sob análise microscópica. Porém, para melhor representatividade do trabalho, análises dos transformados por ferramentas moleculares, como a reação de PCR ou hibridização com sondas, que marcará a sequência de DNA de interesse, devem ser realizadas para a confirmação da introdução dos fragmentos de *gfp* no genoma do fungo.

6 CONCLUSÕES

- a) No presente trabalho foram obtidos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* transformados com o *gfp*, com potencial para utilização na interação patógeno-hospedeira.
- b) As condições ideais para a obtenção de protoplastos de *C. gloeosporioides* são: utilização de hifas de *C. gloeosporioides* em estabilizador osmótico KCl 0,7M, concentração de 5mg.ml⁻¹ de *Lysing enzyme* e tempo médio de hidrólise enzimática de 4 a 5 horas.
- c) Os dois métodos de transformação genética utilizados, eletroporação e transformação química mediada por PEG, são eficientes na transformação genética do fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da mancha-manteigosa em cafeeiros, utilizando o plasmídeo pSC001, sendo este eficaz na expressão do gene marcador *gfp*.
- d) As características culturais e a patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* não são afetadas pela sua transformação com o gene *gfp*, porém, há alteração do índice de velocidade crescimento micelial (IVCM).
- e) Com a utilização do isolados de transformados de *Colletotrichum gloeosporioides* confirmou-se a exteriorização dos sintomas.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. S.; FERREIRA, J. B.; MARTINS, F. G. Mancha manteigosa no contexto do complexo *Colletotrichum* em cafeeiros. In: SIMPÓSIO DE MANEJO DE PLANTAS: MANEJO FITOSSANITÁRIO DO CAFEERIO, 8., 2008, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2008. p. 105-126.

BIGS, J.; GEIDER, K. Movement of *Erwinia amylovora* in host plants and bacterial sorbitol and sucrose metabolism assayed with the green fluorescent protein. In: _____. **New aspects of resistance research on cultivated plants: bacterial diseases**. Berlin: Springer Verlag, 1999. p. 55-57.

BOTTIN, A. et al. Green fluorescent protein (*gfp*) as gene expression reporter and vital marker for studying development and microbe-plant interaction in the tobacco pathogen *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. **Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 176, n. 1, p. 51-56, July 1999.

CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, New York, v. 263, n. 11, p. 802-805, Feb. 1994.

CHALFOUN, S. M. **Doenças do cafeeiro**: importância, identificação e métodos de controle. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 93 p.

CHEN, N.; HSIANG, T.; GOODWIN, P. H. Use of green fluorescent protein to quantify the growth of *Colletotrichum* during infection of tobacco. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 53, n. 1, p. 113-122, Apr. 2003.

CZYMMEK, K. J.; BOURETT, T. M.; HOWARD, R. J. Fluorescent protein probes in fungi. In: _____. **Microbial imaging**. London: Elsevier, 2005. p. 27-41.

DORIZZOTO, A.; ABREU, M. S. Caracterização cultural e morfológica de *Colletotrichum coffeanum* NOACK e *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26., 1993, Aracajú. **Anais...** Brasília: SBF, 1993. p. 306.

DUMAS, B. et al. Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 4, p. 1769-1771, Apr. 1999.

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema SISVAR para análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 2000. 66 p.

FERREIRA, J. B. **Aspectos histopatológicos, epidemiologia e controle da mancha manteigosa em *Coffea arabica* L.** 2006. 159 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

FERREIRA, J. B. et al. Prejuízos ocasionados pela mancha manteigosa em cafeeiros (*Coffea arabica* L.). In: ENCONTRO SUL MINEIRO DE CAFEICULTURA, 10.; SIMPÓSIO DE PESQUISA CAFEIEIRA DO SUL DE MINAS, 5., 2004, Lavras. **Anais...** Lavras: NECAF, 2004. 1 CD-ROM.

FREITAG, M. et al. *gfp* as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, n. 10, p. 897-910, Oct. 2004.

HOROWITZ, S.; FREEMAN, S.; SHARON, A. Use the green fluorescent protein-transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*. **Phytopatology**, Palo Alto, v. 92, n. 7, p. 743-749, July 2002.

ISHIKAWA, F. H. **A função das anastomoses entre conídios na recombinação genética em *Colletotrichum lindemuthianum***. 2009. 159 p. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

LALITHAKUMARI, D. **Fungal protoplast: a biotechnological tool.** Enfield: Science, 2000. 184 p.

LIMA, A. O. de S. **Utilização de *gfp* (Green Fluorescent Protein) na análise da evolução dirigida da β -glucosidase A de *Fervidobacterium sp.*** 2001. 116 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2001.

LONGO, A. C. **Transformação genética e variabilidade detectada por RAPD em isolados endofíticos de *Colletotrichum musae*.** 1995. 103 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiros", Piracicaba, 1995.

LORANG, J. M. et al. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 1987-1994, May 2001.

MANSK, Z.; MATIELLO, J. B. Ocorrência de mancha manteigosa em café "Conilon" (*Coffea canephora*, Pierre) no Estado do Espírito Santo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Anais...** Guarapari: IBC/GERCA, 1977. p. 172-173.

MARCHI, C. E. et al. Obtenção e regeneração de protoplastos de *Magnaporthe grisea*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 32, n. 3, p. 232-238, jul. 2006.

MILLER, W. G.; LINDOW, S. E. An improved *gfp* cloning cassette disegned for prokaryotic transcriptional fusions. **Gene**, Amsterdam, v. 191, n. 3, p. 149-153, June 1997.

MULLINS, E. D.; KANGS, S. Transformation: a tool for studing fungal pathogens of plant. **Celullar and Molecular Life Sciences**, Birkhäuser Basel, v. 58, n. 14, p. 2043-2052, July 2001.

OREN, L. et al. Early events in the *Fuzarium verticilloides*-Maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 3, p. 1695-1701, Mar. 2003.

OROZCO, E. F. M. **Caracterização morfológica, molecular, bioquímica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. associados ao cafeeiro em Minas Gerais e comparação com *Colletotrichum kahawae***. 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

OROZCO, E. F. M. et al. Incidência de *Colletotrichum* spp. em frutos cereja e sementes de café arábica (*Coffea arabica*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2002a. p. 59.

_____. Transmissão de *Colletotrichum* spp., por sementes de café arábica (*Coffea arabica*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2002b. p. 93.

ORR, K. A.; KNUDSEN, G. R. Use of the green fluorescent protein and image analysis to quantify proliferation of *Trichoderma harzianum* in nonsteril soil. **Phytopatology**, Palo Alto, v. 94, n. 12, p. 1383-1389, Dec. 2004.

PARADELA FILHO, O. et al. **O complexo *Colletotrichum* do cafeeiro**. Campinas: IAC, 2001. 11 p. (Boletim Técnico IAC, 191).

PEBERDY, J. F. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 67, n. 1, p. 23-26, Sept. 1976.

PEDROZO, R. **Transformação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectum* com os genes marcadores *gfp* e *DsRed***. 2009. 53 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

PEREIRA, I. S. **Compatibilidade vegetativa e sexual do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado ao cafeeiro e estudos histopatológicos.** 2005. 147 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

POSSIEDE, Y. M. **Estudos morfológicos e genéticos em *Guignardia* spp e *Phyllosticta* spp.** 2004. 129 p. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

ROBINSON, M.; SHARON, A. Transformation of the bioherbicide *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* by electroporation of germinated conidia. **Current Genetics**, New York, v. 36, n. 1/2, p. 98-104, Aug. 1999.

RUÍZ-DÍEZ, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, n. 2, p. 189-195, Jan. 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2. ed., 3. vol., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 253 p.

SIQUEIRA, C. S. **Transformação de *Stenocarpella maydis* com os genes marcadores *gfp* e *DsRed* e patogenicidade dos transformados em sementes de milho.** 2009. 53 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SUKNO, S. A. et al. Root infection and systemic colonization of maize by *Colletotrichum graminicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 74, n. 3, p. 823-832, Feb. 2008.

TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 67, p. 509-544, Nov. 1998.

VEGA, M. E. **Aspectos genéticos da paramiose via fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. 1990. 95 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1990.

VOSSSEN, H. A. M. van der; COOK, R. T. A.; MURAKURO, N. W. Breeding for resistance to coffee berry disease caused by *Colletotrichum coffeanum* Noack (*sensu* Hindorf) in *Coffea arabica* L.: I., methods of preselection for resistance. **Euphytica**, Wageningen, v. 25, n. 1, p. 733-745, Jan. 1976.

WELLMAN, F. L. **Blister spot of Arabica coffee from virus**. San José: Turrialba, 1953. 116 p.

WELSH, S.; KAY, S. A. Reporter gene expression for monitoring gene transfer. **Current Biology in Biotechnology**, London, v. 8, n. 5, p. 617-622, Oct. 1997.

WEST, P. V. et al. Green fluorescent protein (*gfp*) as a reporter gene for the plant pathogenic oomycete *Phytophthora palmivora*. **Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 178, n. 1, p. 71-80, Sept. 1999.

ZANETTE, G. F. **Caracterização fenotípica e tentativa de obtenção de fase sexuada em *Colletotrichum sublineolum***. 2007. 102 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.