

KLÉDNA CONSTÂNCIA PORTES REIS

**MUTAGÊNESE INSERCIONAL EM *Penicillium griseoroseum*
MEDIADA PELO ELEMENTO TRANSPONÍVEL *impala* DE
*Fusarium oxysporum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

RESUMO

REIS, Klédna Constância Portes, M. S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2002. **Mutagênese insercional em *Penicillium griseoroseum* mediada pelo elemento transponível *impala* de *Fusarium oxysporum*.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Conselheiros: Elza Fernandes de Araújo e Jorge Luiz Cavalcante Coelho.

O elemento transponível *impala*, isolado do fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum*, é capaz de sofrer transposição em *Penicillium griseoroseum*, porém, com uma baixa frequência. Em trabalho anterior, condições de estresse, testadas com o objetivo de aumentar a transposição de *impala* em *P. griseoroseum*, foram eficientes, sendo isoladas 691 colônias revertentes, em que o elemento *impala* havia sofrido transposição. Neste trabalho, foram feitas a caracterização molecular das linhagens revertentes e a avaliação da produção de enzimas pectinolíticas, com o objetivo de testar a eficiência de *impala* como ferramenta para a etiquetagem e isolamento de genes que codificam pectinases. As análises por hibridização das linhagens revertentes, utilizando como sonda o elemento *impala* e o gene *niaD* de *A. nidulans*, demonstraram que o tratamento por irradiação foi mais eficiente do que o choque térmico para a ativação da transposição em *P. griseoroseum*. Nas linhagens revertentes obtidas após a irradiação, um maior número de sítios de reinserção de *impala* foi observado. Entre as linhagens revertentes provenientes do choque térmico, uma apresentou perda total do elemento *impala*. Das 650 linhagens revertentes analisadas quanto à produção de pectinases, uma linhagem obtida após choque térmico apresentou atividade significativamente inferior de pectina liase quando comparada à linhagem selvagem. A região flanqueadora do novo sítio de inserção do elemento *impala* foi amplificada por PCR invertido. O fragmento

amplificado de 600pb foi clonado e será utilizado como sonda para o isolamento do gene completo em um banco genômico da linhagem selvagem de *P. griseoroseum*. Este trabalho demonstra, pela primeira vez, que o elemento *impala* pode ser usado para a etiquetagem de genes no fungo *Penicillium griseoroseum*.

ABSTRACT

REIS, Klédna Constância Portes, M. S., Universidade Federal de Viçosa, April, 2002. **Insertional mutagenesis in *Penicillium griseoroseum* mediated by the transposable element *impala* of *Fusarium oxysporum*.** Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Committes members: Elza Fernandes de Araújo and Jorge Luiz Cavalcante Coelho.

The tranposable element *impala*, isolated from the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum*, suffers transposition in *Penicillium griseoroseum*, albeit at low frequency. In a previous work, stress conditions tested to increase *impala* transposition in *P. griseoroseum* have been show to be very efficient, resulting in the production of 691 revertant colonies in which *impala* had suffered transposition.

In this work, a molecular characterization of revertant colonies and the analysis of pectinolytic enzyme were done to test *impala* efficiency as a tool for tagging and isolating pectinase gene.

Hybridization analysis of revertant colonies using *impala* and the *niaD* gene of *Aspergillus nidulans* as probes demonstrated that UV treatment was more efficient than thermal shock for the activation of *impala* transposition in *P. griseoroseum*. In the revertant colonies obtained after UV irradiation, a larger number of reinsertion sites was observed. Among the revertants produced by thermal shock, one strain showed total loss of *impala*.

Among 650 revertant colonies analyzed for pectinase production, one isolate obtained after thermal shock treatment presented significantly lower pectin lyase activity than the wild type strain. The flanking region of the new insertion site of *impala* was amplified by inverted PCR. A 600-pb amplified fragment was cloned and will be used as probe for the isolation of the complete gene from a library of the type strain of *P. griseoroseum*.

This work demonstrates for the first time that the element *impala* can be used for efficient gene tagging in *P. griseoroseum*.