

**CARLOS EDUARDO MARCHI**

**MUTANTES INSERCIONAIS DE *Magnaporthe grisea*  
COM PATOGENICIDADE ALTERADA EM ARROZ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA**

**MINAS GERAIS - BRASIL**

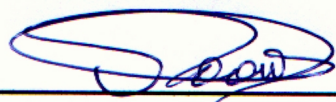
**2003**

CARLOS EDUARDO MARCHI

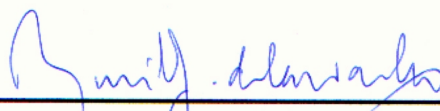
**MUTANTES INSERCIONAIS DE *Magnaporthe grisea*  
COM PATOGENICIDADE ALTERADA EM ARROZ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

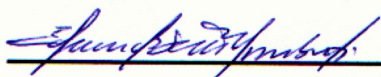
APROVADA: 12 de dezembro de 2003



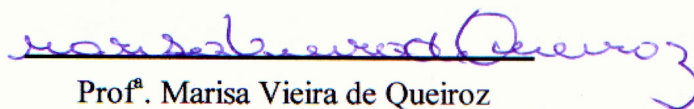
Dr. Plínio César Soares



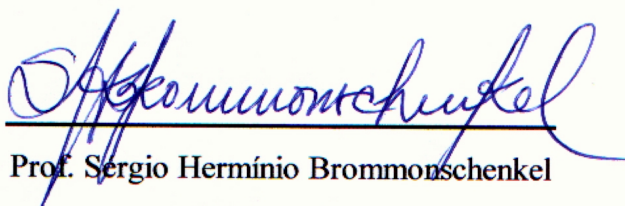
Prof. Murilo Geraldo de Carvalho



Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti  
(Conselheiro)



Prof. Marisa Vieira de Queiroz  
(Conselheira)



Prof. Sergio Hermínio Brommonschenkel

(Orientador)

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M317m Marchi, Carlos Eduardo, 1973-  
2003 Mutantes insercionais de *Magnaporthe grisea* com patogenicidade alterada em arroz / Carlos Eduardo Marchi. –  
Viçosa : UFV, 2003  
136p. : il.

Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa

1. *Magnaporthe grisea* - Patogenicidade.
2. *Magnaporthe grisea* - Transformação genética.
3. Mutagênese. 4. Brusone. 5. Fungos fitopatogênicos.
6. Arroz - Doenças e pragas. I. Universidade Federal de Viçosa. II.Título.

CDD 20.ed. 633.18943

Ao Pedro Arthur Borges de Godoy Marchi

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Para que este projeto saísse do imaginário e se tornasse realidade, alguns agradecimentos são mais que necessários.

A Deus, fonte de Amor, Força e Coragem em todos os momentos da Vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia (DFP) pela oportunidade de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Meu agradecimento especial ao Prof. Sérgio Hermínio Brommonschenkel, pelos ensinamentos, orientação, incentivo e amizade.

À Prof<sup>a</sup> Marisa Vieira de Queiroz, que ultrapassou o limite da co-orientação, transmitindo amizade, estímulo e tranquilidade, meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Eduardo S. G. Mizubuti pela revisão criteriosa e sugestões para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Prof. Murilo G. de Carvalho e ao Dr. Plínio César Soares, membros da banca examinadora, pela colaboração indispensável.

Ao Prof. Acelino Couto Alfenas, pelo convívio agradável.

A todos os professores do DFP, pelos conhecimentos transmitidos.

À Márcia M. Brandão, pela amizade e presteza com que sempre atendeu a todos no laboratório.

A todos os funcionários do DFP, em especial a Luis C. Costa, pela atenção e cooperação.

Ao pessoal das secretárias de Graduação e Pós-Graduação do DFP, em especial Délio Duarte e Cecília M. A. Soares, pela amizade e atenção dispensada.

Aos amigos de laboratório, Daniela A. Neves, Danival V. de Freitas, Diogo F. Moura, Douglas Lau, Edgar P. de Souza, Edival A. V. Zauza, Elene Yamazaki, Gabriela C. G. Andrade, Juliana I. L. Fialho, Klaus K. Scheuermann, Lúcio M. S. Guimarães, Michelli M. da F. Couto, Miguel A. D. Rodriguez, Rivalalve C. Gonçalves, Rodrigo N. Graça e Sandra K. de Alonso, pelas sugestões e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Vegetal Molecular, Adriana A. C. Truta, Adriana G. Moreira, Ana V. S. Nascimento, Ana R. R. Souza, Danielle R. de Barros, Eliane R. de Andrade, Eduardo C. de Andrade, Leonardo B. Torres, Renata F. Calegario e Poliane F. Alfenas, pelos momentos de descontração.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos, em especial Maurílio A. Varavallo e Ronei A. Ribeiro, por transmitirem seus conhecimentos de protoplastização e hibridização, respectivamente.

À Glória P. C. Urquiza, amiga ímpar, pelo constante incentivo nos momentos difíceis, e naqueles nem tão difíceis assim.

A todos os amigos de curso, especialmente Enilton N. Santana, Denise C. Lustosa e Maria L. N. Celeste.

Às colombianas Pilar X. L. Medina, Cláudia Z. G. Lombana e Irma X. Barbosa, pela amizade e incentivo.

Aos meus eternos amigos Maurício A. Correa e Simone N. Reis, que embora ausentes sempre torceram por mim.

À minha fiel e inseparável companheira, Tulipa.

Menção mais do que especial é devida aos meus pais, Sergio e Helena, à minha inesquecível avó Guilhermina, aos meus irmãos, Leila, Carlos José e Sérgio Luiz, aos meus sobrinhos, Muriel, Fábio, Fernando, Gabriel e Igor, aos meus cunhados Ivair, Cristiane e Sônia, que sempre apoiaram minhas decisões.

Aos meus sogros, Antônio e Ozana, e cunhados Antônio, Caetano e Ozana, que torceram pelo meu sucesso.

E finalmente, ao combustível de tudo isso, Mírian e meu filho Pedro Arthur, por acreditarem na minha capacidade, pelo carinho, incansável incentivo e, sobretudo, por compreenderem minha ausência.

**MINHA ETERNA GRATIDÃO**

**Carlos Eduardo Marchi**

## **BIOGRAFIA**

CARLOS EDUARDO MARCHI, filho de Sergio Marchi e Helena de Godoy Marchi, nasceu em 01 de julho de 1973, na cidade de Santa Rita do Passa Quatro, Estado de São Paulo.

Conclui o ensino médio no Colégio Oswaldo Cruz (COC) no ano de 1990, na cidade de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo.

No segundo semestre de 1991 ingressou na Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais, graduando-se em Engenharia Agrônômica em 25 de janeiro de 1997.

No mesmo ano iniciou o curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, na Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais, obtendo o título de *Magister Scientiae* em agosto de 1999.

Ainda no segundo semestre de 1999, iniciou o curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, concluindo o Doutorado em 2003.

## CONTEÚDO

	<b>Página</b>
<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	3
<b>REVISÃO - TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E MUTAGÊNESE INSERCIONAL EM FUNGOS FITOPATOGÊNICOS</b> .....	5
RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	7
INTRODUÇÃO .....	8
EVOLUÇÃO DA TECNOLOGIA DE TRANSFORMAÇÃO .....	10
INTEGRAÇÃO MEDIADA POR ENZIMA DE RESTRIÇÃO (REMI) .....	16
TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (ATMT) .....	22
APLICAÇÕES DAS TÉCNICAS DE TRANSFORMAÇÃO .....	26
Marcação física e clonagem de genes .....	26
Análise funcional .....	29
Melhoramento genético de espécies .....	31
FATOS E PERSPECTIVAS .....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33

<b>ARTIGO 1 - PRODUÇÃO E REGENERAÇÃO DE PROTOPLASTOS DE <i>Magnaporthe grisea</i></b> .....	45
RESUMO .....	45
ABSTRACT .....	46
INTRODUÇÃO .....	47
MATERIAL E MÉTODOS .....	50
<i>Magnaporthe grisea</i> e condições de cultivo .....	50
Obtenção dos protoplastos de <i>M. grisea</i> .....	50
1. Digestão do micélio .....	51
2. Concentração da enzima lítica .....	51
3. Tipos de estabilizadores osmóticos .....	52
4. Tempos de exposição ao sistema enzimático .....	52
Regeneração dos protoplastos de <i>M. grisea</i> .....	52
Análise dos dados .....	54
RESULTADOS .....	55
Obtenção dos protoplastos de <i>M. grisea</i> .....	55
1. Digestão do micélio .....	55
2. Concentração da enzima lítica .....	58
3. Tipos de estabilizadores osmóticos .....	60
4. Tempos de exposição ao sistema enzimático .....	62
Regeneração dos protoplastos de <i>M. grisea</i> .....	64
DISCUSSÃO .....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74
<b>ARTIGO 2 – INTEGRAÇÃO DE pAN7-1 NO GENOMA DE <i>Magnaporthe grisea</i> MEDIADA POR ENZIMA DE RESTRIÇÃO</b> .....	81
RESUMO .....	81
ABSTRACT .....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	93

<b>ARTIGO 3 - MUTANTES INSERCIONAIS DE <i>Magnaporthe grisea</i> COM PATOGENICIDADE ALTERADA EM ARROZ</b> .....	99
RESUMO .....	99
ABSTRACT .....	100
INTRODUÇÃO .....	101
MATERIAL E MÉTODOS .....	103
<i>Magnaporthe grisea</i> e condições de cultivo .....	103
Produção de protoplastos .....	104
Transformação fúngica .....	105
Estabilidade mitótica .....	106
Extração de DNA .....	106
<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	107
<i>Southern blot</i> .....	107
Testes de patogenicidade .....	108
Crescimento <i>in vitro</i> , germinação de conídios e diferenciação de apressórios .....	109
Definições operacionais .....	110
RESULTADOS .....	110
Identificação e caracterização fenotípica dos mutantes .....	110
Estabilidade mitótica dos mutantes .....	115
Crescimento <i>in vitro</i> , germinação de conídios e diferenciação de apressórios .....	115
Análise molecular do padrão de integração de pAN7-1 .....	119
DISCUSSÃO .....	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	129
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	134

## RESUMO

MARCHI, Carlos Eduardo, D. S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2003. **Mutantes insercionais de *Magnaporthe grisea* com patogenicidade alterada em arroz.** Orientador: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Conselheiros: Marisa Vieira de Queiroz e Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

Em *Magnaporthe grisea*, agente causal da brusone, mutagênese insercional mediada por transformação tem constituído estratégia para a identificação de genes essenciais para a patogenicidade em arroz. A técnica REMI, integração mediada por enzima de restrição, merece destaque em virtude da eficiência de transformação e da predominância de integrações simples. Visando a implantação de programa de mutagênese insercional em *M. grisea*, os objetivos deste trabalho incluíram: (1) adequar as condições para a obtenção e regeneração de protoplastos do ascomiceto, (2) estabelecer sistema de transformação REMI em *M. grisea*, avaliando o potencial dos protoplastos e do vetor pAN7-1 e (3) selecionar e caracterizar mutantes com patogenicidade alterada em plantas de arroz. Produção eficiente de protoplastos foi alcançada com o uso simultâneo de 10 mg de *Lysing Enzymes* e 10 mg de *Cellulase Onozuka R10* em 3 mL de  $MgSO_4$  a 1,2 M /  $NaH_2PO_4$  a 0,01 M (pH = 5,8). Protoplastos de *M. grisea* I-22 liberados com 3 horas de hidrólise enzimática apresentaram maior capacidade de regeneração da

parede celular. Quando expostos ao vetor pAN7-1, os protoplastos foram prontamente transformados para a resistência à higromicina. Quando pAN7-1-*HindIII* foi usado para transformar I-22 na presença de *HindIII*, a frequência de transformantes foi 1,1 a 8,1 vezes superior ao tratamento sem a adição da endonuclease de restrição. No geral, a melhor concentração de *HindIII* foi 5 unidades/reação de transformação. A partir de testes de patogenicidade envolvendo 125 transformantes, principalmente gerados por REMI, foi possível selecionar cinco mutantes com alterações consistentes na patogênese. Dois desses mutantes, T108 e T93, causaram poucas lesões em folhas de arroz, enquanto o mutante T251 não foi patogênico. A alteração na patogenicidade de T108 foi acompanhada pela menor capacidade de desenvolvimento *in vitro*. Quando inoculado em plantas de arroz, o mutante T41 apresentou agressividade reduzida, caracterizada por lesões arredondadas de tamanho limitado. Por sua vez, o período de incubação para o mutante T72 foi mais longo do que o do isolado selvagem. Além disso, atrasos consideráveis na germinação de conídios e na formação de apressórios foram detectados em T72. Os mutantes T93 e T251 apresentaram fenótipos semelhantes quando em cultura, caracterizados pela pigmentação marrom. Análises *Southern blots* de quatro mutantes indicaram que em 50 % dos casos, T108 e T251, apenas uma cópia de pAN7-1 se integrou em um único sítio no genoma. No mutante T251 ocorreu evento REMI propriamente dito. Os mutantes T41 e T93 apresentaram padrões de integração mais complexos.

## ABSTRACT

MARCHI, Carlos Eduardo, D. S., Universidade Federal de Viçosa, December 2003. **Insertional mutants of *Magnaporthe grisea* impaired in pathogenicity to rice.** Adviser: Sérgio Hermínio Brommonschenkel. Committee members: Marisa Vieira de Queiroz and Eduardo Seiti Gomide Mizubuti.

Transformation mediated-insertional mutagenesis of phytopathogenic fungi is an important tool to identify genes involved in pathogenicity. An improved version of this method is the restriction enzyme mediated integration, or REMI. We chose REMI to begin an insertional mutagenesis project in *M. grisea*. In this work, were reported the: (1) protoplasts production and regeneration of *M. grisea*, (2) transformation of protoplasts with pAN7-1 mediated by restriction enzyme and (3) identification and characterization of five transformants with pathogenicity defects in rice, at the phenotypic and molecular levels. The highest protoplasts production was obtained with *Lysing Enzymes* plus *Cellulase Onozuka* R-10 and the osmotic buffer  $MgSO_4$  at 1.2 M /  $NaH_2PO_4$  at 0.01 M (pH = 5.8). The highest regeneration frequency was obtained with protoplasts produced after 3 hours of incubation. The I-22 protoplasts were readily transformed for hygromycin resistance. When pAN7-1-*Hind*III was used to

transform fungal protoplasts in the presence of the *HindIII*, the transformation efficiency was increased 1.1 to 8.1-fold. The optimal *HindIII* concentration for enhanced transformation corresponded to 5 unit/transformation mix. Out of 125 transformants screened for the ability to infect rice plants, five showed changes in pathogenicity. The T108 and T93 mutants caused few lesions in rice leaves, while the T251 mutant was non-pathogenic. The alteration in pathogenicity of T108 was accompanied by reduced development in culture. The T41 mutant caused small and limited round lesions. The incubation period of the T72 mutant was longer than of wild type. Furthermore, late germination and appressorium formation was detected in the T72 mutant. The T93 and T251 mutants had similar phenotypes, characterized by a brown-pigmented colony. Four mutants (T41, T93, T108 and T251) were examined by Southern blots. The T108 and T251 mutants contained one copy of the vector integrated at a single site in the genome. REMI event occurred in the T251 mutant. More complex integration events were observed in the T41 and T93 mutants.

## INTRODUÇÃO GERAL

A patogenicidade de fungos é processo complexo, envolvendo muitos genes que afetam a interação patógeno-hospedeiro (Fujimoto et al., 2002). Cada fitopatógeno possui tática específica para invadir seu hospedeiro e obter nutrientes para o seu desenvolvimento (Hamer & Talbot, 1998). Tais microrganismos desenvolveram e aprimoraram fatores de patogenicidade, assim como mecanismos para evitar ou suprimir as respostas de defesa do hospedeiro.

Pesquisas conclusivas acerca de moléculas essencialmente importantes para o processo fitopatogênico de fungos começaram com o advento da tecnologia de genética molecular para fungos filamentosos (Fincham, 1989). Tornou-se possível a elucidação da patogênese fúngica por meio da seleção de mutantes com patogenicidade alterada. No princípio, os mutantes eram selecionados naturalmente ou gerados com a utilização de agentes mutagênicos (Talbot & McCafferty, 1997). No entanto, a clonagem dos genes de patogenicidade consumia muito tempo, visto que era necessária a identificação de fragmentos do genoma do isolado selvagem capazes de complementar o fenótipo mutante, isto é, restaurar a patogenicidade. Assim, novas técnicas foram desenvolvidas para facilitar o isolamento dos genes de interesse. Os mutantes começaram a ser gerados via inserção de elementos de ácidos nucléicos (Idnurm & Howlett, 2001).

Durante algum tempo, a mutagênese insercional de *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr., principal patógeno da cultura do arroz, foi limitada pela baixa frequência de transformantes geralmente obtida com os procedimentos convencionais de transformação (Valent & Chumley, 1991). O problema foi amenizado com o emprego da técnica REMI, a qual aumentou significativamente a eficiência de transformação do ascomiceto (Shi et al., 1995). A técnica REMI (*Restriction Enzyme-Mediated Integration*), ou integração mediada por enzima de restrição, foi originalmente desenvolvida em *Saccharomyces cerevisiae* (Schiestl & Petes, 1991), e tem sido aplicada com êxito em muitos outros organismos, promovendo maior frequência de transformação, bem como facilitando a clonagem de genes.

Componentes importantes do processo patogênico de *M. grisea* têm sido identificados (Hamer & Talbot, 1998; Idnurm & Howlett, 2001). Destaca-se o grande número de informações disponíveis acerca dos eventos de pré-penetração, principalmente quanto ao desenvolvimento do apressório. Tal fato se dá, em parte, devido à facilidade de isolamento dos mutantes para a formação desta estrutura de infecção. Indivíduos incapazes de diferenciar apressórios funcionais não são patogênicos ao hospedeiro. Relativamente, pouco se sabe sobre os componentes envolvidos nos estágios finais da infecção da planta e como o crescimento do fungo é regulado no interior dos tecidos (Hamer & Talbot, 1998; Idnurm & Howlett, 2001).

Visto que a compreensão mais detalhada dos mecanismos genéticos que governam a patogenicidade de *M. grisea* em arroz poderá auxiliar no delineamento de novas e eficientes estratégias de manejo da doença, o objetivo

principal deste trabalho foi submeter o fungo causador da brusone à mutagênese REMI, visando a identificação de novos genes importantes para a patogênese. Especificamente, os objetivos incluíram: (1) melhorar a produção e a regeneração de protoplastos de *M. grisea*; (2) estabelecer sistema de transformação REMI em *M. grisea*, utilizando os protoplastos obtidos após a adequação da protoplastização e o vetor de transformação pAN7-1 e (3) selecionar e caracterizar mutantes insercionais de *M. grisea* com patogenicidade alterada em arroz.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

FUJIMOTO, D., SHI, Y., CHRISTIAN, D., MANTANGHIHAN, J.B. & LEUNG, H. Tagging quantitative loci controlling pathogenicity in *Magnaporthe grisea* by insertional mutagenesis. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 61:77-88. 2002.

HAMER, J.E. & TALBOT, N.J. Infection-related development in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Current Opinion in Microbiology** 1:693-697. 1998.

IDNURM, A. & HOWLETT, B.J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. **Molecular Plant Pathology** 2:241-255. 2001.

SCHIESTL, R.H. & PETES, T.D. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 88:7585-7589. 1991.

SHI, Z., CHRISTIAN, D. & LEUNG, H. Enhanced transformation in *Magnaporthe grisea* by restriction enzyme mediated integration of plasmid DNA. **Phytopathology** 85:329-333. 1995.

TALBOT, N.J. & McCAFFERTY, H.R.K. Identification and characterisation of pathogenicity genes from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Cahiers Options Méditerranéennes** 15:137-142. 1997.

VALENT, B. & CHUMLEY, F.G. Molecular genetic analysis of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Phytopathology** 29:443-467. 1991.

**REVISÃO**

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E MUTAGÊNESE INSERCIONAL EM  
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS\***

**CARLOS EDUARDO MARCHI<sup>1</sup>, SÉRGIO HERMÍNIO  
BROMMONSCHENKEL<sup>1</sup>, MARISA VIEIRA DE QUEIROZ<sup>2</sup> &  
EDUARDO SEITI GOMIDE MIZUBUTI<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, <sup>2</sup>Departamento de Microbiologia, Universidade  
Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, MG, fax: (31) 3899-2629,  
e-mail: cemarchi@alunos.ufv.br

(Aceito para publicação em     /     /     )

Autor para correspondência: Carlos Eduardo Marchi

---

MARCHI, C.E., BROMMONSCHENKEL, S.H., QUEIROZ, M.V. de &  
MIZUBUTI, E.S.G. Transformação genética e mutagênese insercional em fungos  
fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira.**

**RESUMO**

Em fitopatologia, procedimentos de transformação de fungos filamentosos  
têm sido amplamente utilizados para gerar mutantes insercionais com

---

\* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Universidade Federal de Viçosa (2003).

patogenicidade alterada, o que tem contribuído para a clonagem de genes cujos produtos são essenciais para causar doença no hospedeiro. Paralelamente, técnicas de transformação são importantes ferramentas para a análise funcional de genes previamente clonados. Até pouco tempo, a baixa frequência de transformantes constituiu fator limitante para a utilização destas técnicas. Porém, com o desenvolvimento da técnica de integração mediada por enzima de restrição (REMI, *Restriction Enzyme-Mediated Integration*), a eficiência de transformação foi melhorada substancialmente. Recentemente, a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT, *Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation*) tem representado alternativa à REMI. A ATMT tem sido efetiva na transformação de vários fungos fitopatogênicos como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Magnaporthe grisea* e *Fusarium oxysporum*, apresentando grande potencial para a marcação física e para a clonagem de genes envolvidos em patogenicidade. Apesar da simplicidade, a utilização de técnicas de transformação em genética de fungos fitopatogênicos é ainda incipiente no Brasil. Esta revisão aborda os avanços recentes na tecnologia de transformação de fungos filamentosos e suas aplicações em fitopatologia.

**Palavras-chave:** Mutantes insercionais, integração mediada por enzima de restrição, REMI, transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, ATMT, genes de patogenicidade.

## ABSTRACT

### GENETIC TRANSFORMATION AND INSERTIONAL MUTAGENESIS IN PHYTOPATHOGENIC FUNGI

Transformation of phytopathogenic fungi has been widely used to isolate insertional mutants with differences in pathogenicity. It is an effective way to tag and clone pathogenicity genes. Furthermore, it is an essential tool for functional analysis of the cloned genes. The low transformation efficiency in filamentous fungi is one of the factors limiting the use of this technology. The development of restriction enzyme-mediated integration (REMI) substantially increased the transformation efficiency. The *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT, is an alternative to REMI. This technique has been efficiently employed to transform phytopathogenic fungi as *Colletotrichum gloeosporioides*, *Magnaporthe grisea* e *Fusarium oxysporum*. The *Agrobacterium*-mediated transformation can be a powerful tool to mutate and tag genes for pathogenicity. Although very simple, in Brazil the transformation technology has not been widely used to increase our genetic understanding of phytopathogenicity. In this review, the recent advances in phytopathogenic fungi transformation systems and applications are discussed.

---

## INTRODUÇÃO

Os fungos constituem grupo numeroso e heterogêneo de organismos eucarióticos. Enquanto alguns são utilizados na alimentação humana (p. ex., *Agaricus bisporus*) ou na produção de antibióticos importantes como a penicilina (p. ex., *Penicillium chrysogenum*), outros são responsáveis por prejuízos anuais de bilhões de dólares decorrentes de perdas na agricultura. Estima-se que, das 100.000 espécies de fungos conhecidas, mais de 10 % causem doenças em plantas (Agrios, 1997).

A capacidade dos fungos de causar doenças em plantas é mecanismo complexo, comumente envolvendo a adesão ao hospedeiro, a germinação de conídios, a diferenciação de estruturas especiais como apressórios e haustórios, a penetração, a colonização dos tecidos e a esporulação. Por serem etapas controladas geneticamente, todos os genes envolvidos podem ser designados “genes de patogenicidade” (Kahmann & Basse, 1999). Uma estratégia para a identificação de genes de patogenicidade é a obtenção de mutantes com alterações na patogênese (Talbot & McCafferty, 1997). A mutagênese química ou mediada por luz UV pode aumentar a frequência de mutantes, naturalmente baixa na população. Contudo, a subsequente clonagem do gene mutado é laboriosa, demandando tempo para a identificação de fragmentos do genoma do indivíduo selvagem capazes de complementar a mutação (Kahmann & Basse, 1999).

O desenvolvimento de técnicas de genética molecular para fungos filamentosos, em especial técnicas de transformação, possibilitou gerar mutantes com defeitos na patogenicidade via a inserção de elementos DNA, como

plasmídeos, T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* ou transposons. Os mutantes insercionais têm sido ferramentas fundamentais para a evolução do conhecimento sobre a patogênese em plantas.

Apesar da identificação e clonagem de vários transposons em fungos filamentosos, esses elementos não têm sido empregados em larga-escala na mutagênese insercional. Os maiores entraves constituem a identificação de transposons com atividade em ampla gama de hospedeiro e de sistema de seleção funcional para a transposição. O *Restless*, elemento originário de *Tolypocladium inflatum*, pareceu sofrer excisão em hospedeiros heterólogos, porém a re-integração não foi demonstrada (Czechowska et al., 1999, citados por Kempken, 1999). Mais recentemente, *Impala*, originário de *Fusarium oxysporum*, apresentou atividade no genoma de *Magnaporthe grisea* (Villalba et al., 2001) e *Penicillium griseoroseum* (Queiroz & Daboussi, 2003). Esses resultados fazem de *Restless* e *Impala* candidatos importantes para o desenvolvimento de vetores.

A propriedade integrativa dos vetores de transformação para fungos filamentosos foi prontamente utilizada para mediar mutagênese insercional. Contudo, a baixa frequência de transformantes obtida em muitos sistemas, como *M. grisea*, limitou a ampla utilização da técnica (Valent & Chumley, 1991).

Em anos recentes, a eficiência de transformação de muitas espécies fúngicas tem sido aumentada sensivelmente, graças a duas técnicas inovadoras em particular, a mutagênese insercional mediada por enzima de restrição, REMI - *Restriction Enzyme-Mediated Integration* (Schiestl & Petes, 1991), e a transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, ATMT - *Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation* (De Groot et al., 1998).

Mesmo sendo tecnologia eficaz, é seguro afirmar que, em nenhum dos sistemas sob investigação, a saturação da mutagênese para a patogenicidade foi alcançada. Embora represente vasto campo de pesquisa, no Brasil existe carência de trabalhos envolvendo a transformação e a mutagênese de fungos fitopatogênicos. Desta forma, a presente revisão teve como objetivo oferecer um texto em português sobre as técnicas de transformação disponíveis para esses organismos, em especial as técnicas REMI e ATMT, enfatizando o potencial como ferramentas biológicas para compreensão dos mecanismos fúngicos de patogênese em plantas.

## **EVOLUÇÃO DA TECNOLOGIA DE TRANSFORMAÇÃO**

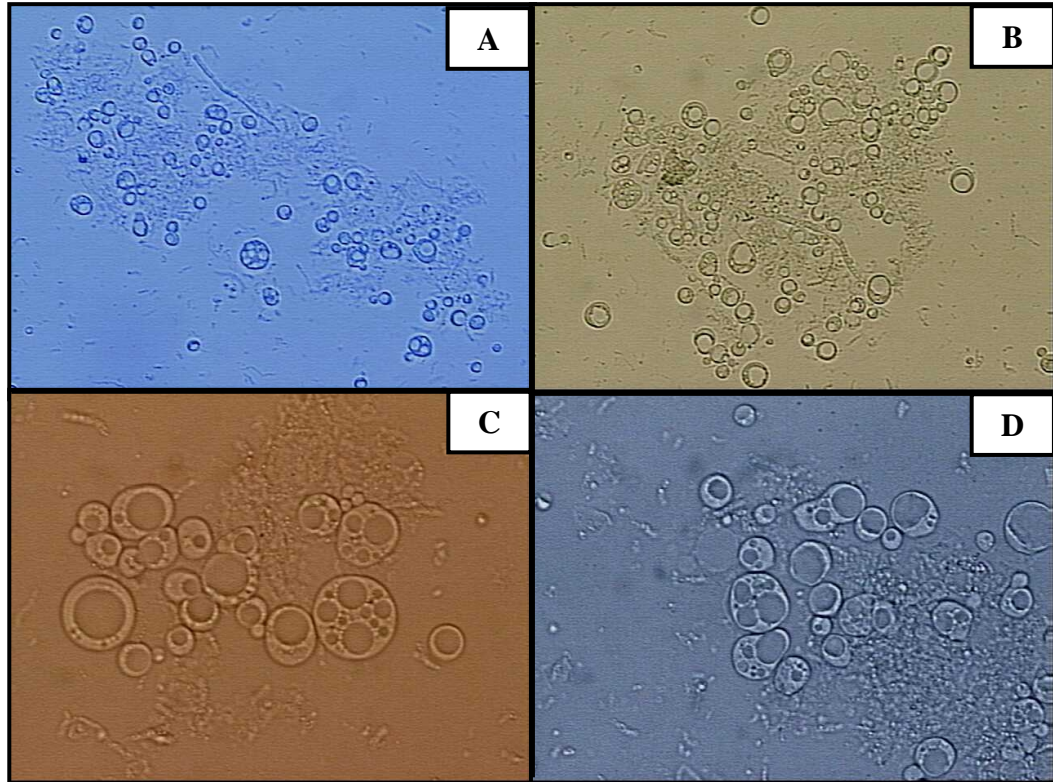
O termo transformação genética foi originalmente proposto para designar o processo natural de modificação do genoma bacteriano, inicialmente verificado por Frederick Griffith em 1928, ao trabalhar com a bactéria causadora da pneumonia, *Streptococcus pneumoniae*. Contudo, atualmente, o uso do termo não se limitou às bactérias, referindo-se também às alterações genéticas ocorridas em células vegetais, leveduriformes, fúngicas e de mamíferos. Uma definição moderna de transformação genética poderia ser “processo de aquisição natural ou induzida de fragmentos de DNA exógenos, o qual pode resultar em modificações fenotípicas em determinado organismo”.

Somente 45 anos após a demonstração da transformação bacteriana, o primeiro fungo transformado foi reportado. Mishra & Tatum (1973) submeteram

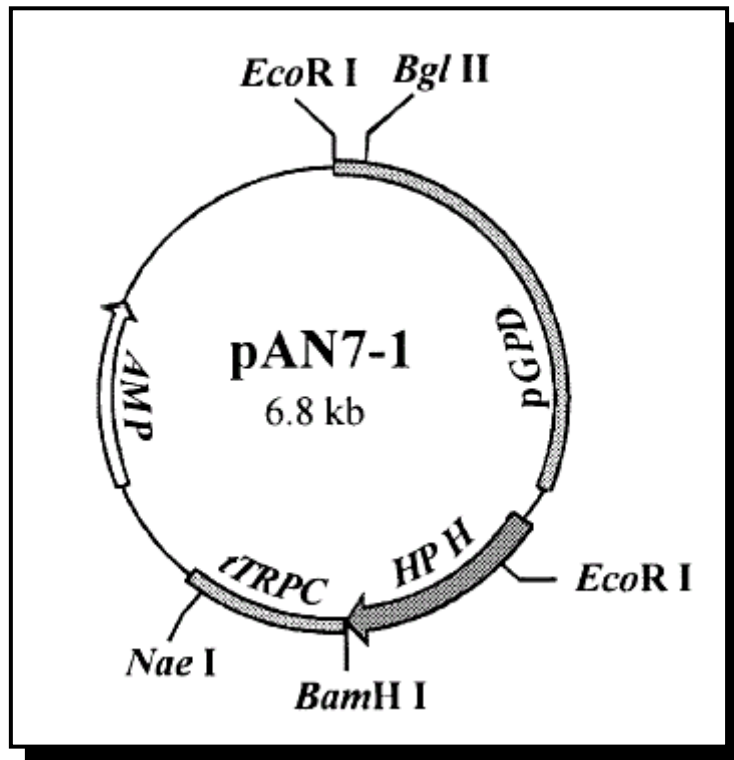
um isolado de *Neurospora crassa* dependente de inositol à transformação com fragmentos de DNA do isolado selvagem. Apesar de colônias capazes de sintetizar inositol terem sido obtidas, os resultados foram vistos com certo ceticismo. A transformação genética de fungos se tornou gradativamente aceita à medida que evidências foram geradas com outros genes e outras espécies.

O procedimento de obtenção de protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* utilizado por Hutchinson & Hartwell (1967) impulsionou o desenvolvimento de sistemas de transformação em fungos. Protoplastos são células desprovidas de parede celular, a qual é, geralmente, removida pela ação de enzimas líticas comerciais em meio osmoticamente estabilizado (Figura 1). Posteriormente, quando em meio nutritivo apropriado, os protoplastos de fungos são capazes de regenerar a parede celular, dando origem ao micélio. Hinnen et al. (1978) verificaram que os protoplastos de levedura eram prontamente capazes de absorver DNA exógeno. Ainda hoje, os protoplastos constituem a forma mais comum de células competentes para a transformação (Ruiz-Díez, 2002).

A transformação de fungos filamentosos foi intensificada com o desenvolvimento de protocolos para a protoplastização e a construção de vetores. Em geral, os vetores de transformação são plasmídeos, que se integram ectopicamente no genoma do hospedeiro (Fincham, 1989). O plasmídeo pAN7-1 é um dos vetores comumente empregados em sistemas de transformação de fungos filamentosos (Figura 2).



**FIGURA 1. A a D:** Fotomicrografias de protoplastos de *Botryosphaeria* sp., fungo filamentoso causador de cancro em eucalipto. Mistura de digestão: 80 mg de micélio, 3 mL de estabilizador osmótico KCl a 0,7 M / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 0,01 M (pH = 5,9), 7,5 mg de *Lysing Enzymes* (*Sigma Chemicals Co.*) e 7,5 mg de *Glucanex* (*Novo Nordisk Ltd.*). Protoplastização realizada a 28 - 30 °C, a 100 rpm, por 4 horas (Marchi et al., 2003, dados não publicados). **A e B:** aumento de 200 X; **C e D:** aumento de 400 X.



**FIGURA 2.** Mapa do vetor de transformação pAN7-1 (Punt et al., 1987). O gene *AMP* (codificador da resistência à ampicilina), e o gene da fosfotransferase da higromicina (*HPH*) de *Escherichia coli* (codificador da resistência à higromicina) representam os sistemas de seleção para os organismos procarioto e eucarioto, respectivamente. O gene *HPH* está ligado ao promotor do gene *GPD* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e ao terminador do gene para a biossíntese de triptofano (*tTRPC*) de *Aspergillus nidulans*. Alguns sítios de reconhecimento para enzimas de restrição foram indicados. A origem de replicação, necessária para a multiplicação do vetor em *E. coli*, não foi representada.

O sucesso da transformação de protoplastos de *N. crassa* e *Aspergillus nidulans* foi sendo gradativamente estendido para outras espécies, incluindo fitopatógenos como o basidiomiceto *Ustilago maydis*, agente causal do carvão do milho (Banks, 1983).

Em virtude das inconveniências da protoplastização, como a demanda de tempo e complexidade algumas vezes exibida, novas técnicas foram sendo aplicadas para a transformação de fungos filamentosos.

A transformação de células intactas mediante o tratamento com íons metal-alcalinos (p. ex.,  $\text{Li}^+$  ou  $\text{Cs}^+$ ) e polietileno glicol (PEG), comumente empregada em *S. cerevisiae*, foi verificada em *N. crassa* (Dhawale et al., 1984). Contudo, em razão da freqüente baixa eficiência, esse procedimento não foi largamente explorado na transformação de fungos filamentosos.

O uso da eletroporação como ferramenta de transformação genética foi originalmente demonstrado por Neumann et al. (1982) em células de mieloma de camundongos. A transferência de genes foi bem sucedida com células intactas (Hashimoto et al., 1985) e com protoplastos de levedura (Karube et al., 1985). A técnica baseia-se na aplicação de campos elétricos com altas voltagens, por curta duração, para criar poros transientes na membrana celular, facilitando assim a entrada do DNA transformante (Prasanna & Panda, 1997). Alguns autores sugerem que a mudança de carga ocorrida durante um pulso elétrico facilita a agregação e a incorporação do DNA (Ruiz-Díez, 2002). A eletroporação foi prontamente empregada em fungos filamentosos, e os primeiros relatos encontrados datam 1989, e incluem: *F. solani*, *A. nidulans*, *Clonostachys* sp., *A. awamori* e *A. niger* (Riach & Kinghorn, 1996). *Leptosphaeria maculans*

(Chakraborty et al., 1991), *C. lindemuthianum*, *C. magna* (Redman & Rodriguez, 1994), *Mycosphaerella graminicola* (Adachi et al., 2002), *C. acutatum* (Horowitz et al., 2002) e *Ashbya gossypii* (Wendland et al., 2002) são exemplos de espécies que somaram à lista de fungos fitopatogênicos eletroporados. A eficiência de transformação tem sido variável. No caso de *L. maculans*, por exemplo, a eletroporação de  $1,2 \times 10^6$  conídios levou à obtenção de aproximadamente  $5,7 \times 10^3$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA (Chakraborty et al., 1991). Em contraste, a eletroporação de  $10^7$  conídios de *C. acutatum* produziu 0,36 transformantes/ $\mu\text{g}$  de pGFP linear (Horowitz et al., 2002).

O processo de bombardeamento de partículas constituiu outra alternativa ao uso de protoplastos, reduzindo o número de espécies refratárias à transferência de genes. Nesse método, partículas de ouro ou tungstênio, com cerca de 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro, recobertas com seqüências de DNA, são aceleradas por meio de descarga de alta energia, penetrando a parede e a membrana plasmática da célula a ser transformada. No interior da célula, o DNA transformante pode se dissociar das partículas e integrar no genoma hospedeiro. Um dos trabalhos pioneiros de bombardeamento de células de levedura foi realizado por Armaleo e colaboradores em 1990. Com relação aos fungos filamentosos, Riach & Kinghorn (1996) listaram algumas das espécies pioneiras bombardeadas. São sistemas de transformação desenvolvidos no início dos anos 90, e incluem *N. crassa*, *Phytophthora capsici*, *P. citricola*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *M. grisea* e *Trichoderma harzianum*.

Assim como a eletroporação, o bombardeamento de partículas possibilita a transformação de células e tecidos intactos, como hifas e esporos. O

bombardeamento de *Uromyces appendiculatus* (Bhairi & Staples, 1992), e mais recentemente de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (Schillberg et al., 2000) e *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (Chaure et al., 2000) exemplificam a utilidade dessa técnica no estudo de parasitas obrigatórios.

Segundo Redman & Rodriguez (1994), a eficiência de transformação para a grande parte dos fungos filamentosos varia de 0 a 10 transformantes/ $\mu$ g de DNA, independentemente da técnica empregada. Vários fatores podem ser apontados como responsáveis: (1) a espécie recipiente; (2) o material a ser transformado; (3) a viabilidade e integridade dos protoplastos, quando utilizados; (4) a técnica adotada; (5) características do vetor, incluindo o tamanho, a quantidade, o estado físico, a marca de seleção e as regiões regulatórias e (6) a atividade de nucleases.

Os esforços para melhorar a eficiência de transformação de fungos filamentosos culminaram no desenvolvimento das técnicas REMI, *Restriction Enzyme-Mediated Integration* (Schiestl & Petes, 1991), e ATMT, *Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation* (De Groot et al., 1998), as quais têm efetivamente facilitado a manipulação genética de fungos fitopatogênicos.

## **INTEGRAÇÃO MEDIADA POR ENZIMA DE RESTRIÇÃO (REMI)**

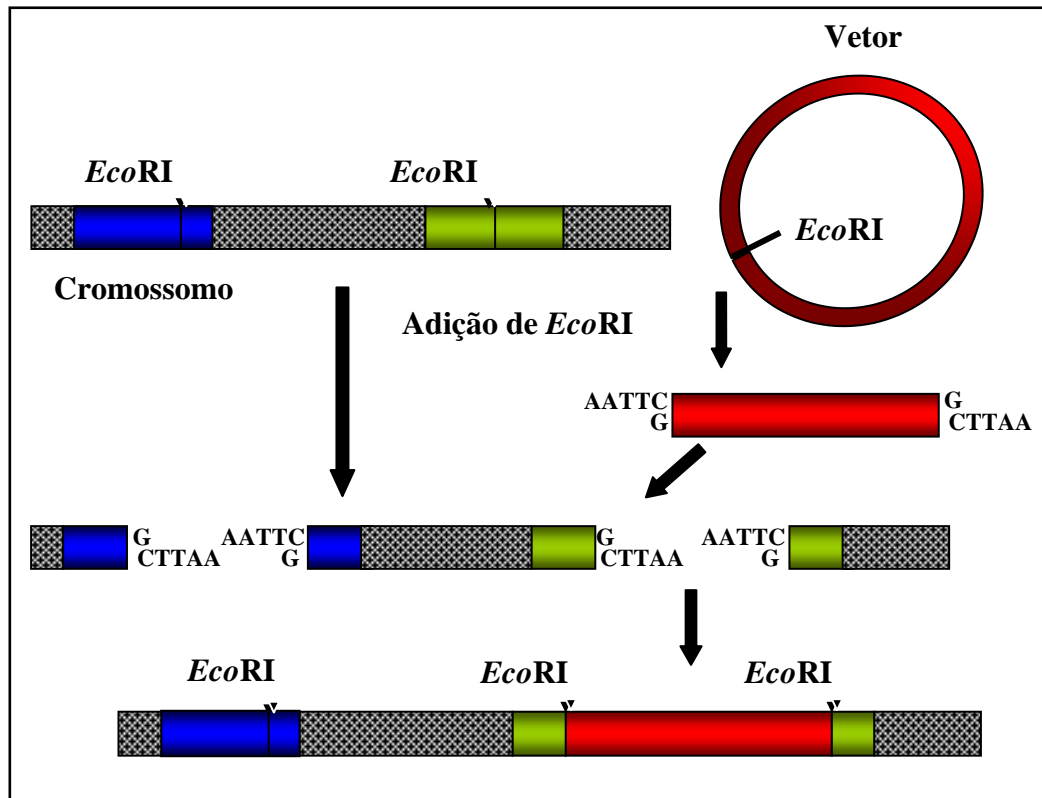
Na transformação convencional de fungos filamentosos, geralmente, protoplastos ( $10^7$  a  $10^9$ /mL) são expostos ao vetor ( $\geq 1$   $\mu$ g). Logo após, alta concentração de PEG é adicionada na presença de  $\text{CaCl}_2$  e outros químicos. O vetor entra na célula fúngica, ganha acesso ao núcleo e se integra no genoma. Em

seguida, os protoplastos são plaqueados em meio de seleção estabilizado osmoticamente, o qual permite apenas a regeneração das células transformadas.

Schiestl & Petes (1991) descreveram novo método para transformar *S. cerevisiae*, denominado integração mediada por enzima de restrição (REMI), o qual promoveu aumento de sete vezes na frequência de transformantes em relação à transformação convencional. Em REMI o DNA transformante é linearizado e enzima de restrição, geralmente a mesma usada para linearizar o vetor, é adicionada à mistura de transformação. Como resultado, são formadas extremidades coesivas compatíveis entre o vetor e o DNA genômico, o que catalisa o evento de integração. Por exemplo, um vetor clivado com *EcoRI* liga-se ao DNA genômico clivado com *EcoRI*, gerando dois sítios de *EcoRI* (Figura 3). A restauração dos sítios de restrição caracteriza os eventos REMI propriamente ditos.

Com o sucesso da transformação de *Cochliobolus heterostrophus* (Lu et al., 1994), REMI foi utilizada na transformação de vários fungos fitopatogênicos. A transformação do agente causal da podridão de colmo e queima foliar do milho, *C. graminicola*, ilustra a eficiência da técnica (Thon et al., 2000). Foram obtidos cerca de 3 transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA quando pCB1636 foi utilizado na ausência de enzimas de restrição, independentemente do estado físico do vetor (Tabela 1). Quando enzimas de restrição foram adicionadas à reação houve aumento considerável na frequência de transformantes. Melhores resultados foram observados quando o plasmídeo linear e a enzima usada para a linearização foram utilizados. A técnica REMI aumentou a eficiência de transformação acima de 27

vezes. A adição de enzimas, as quais não foram usadas para clivar o vetor, também elevou a frequência de transformantes, porém em níveis menores.



**FIGURA 3.** Mecanismo de integração do vetor de transformação mediada por enzima de restrição. A clivagem do vetor de transformação e do genoma fúngico pela enzima de restrição *EcoRI* resulta na formação de extremidades coesivas compatíveis. O vetor se integra no genoma do fungo via um dos sítios clivados pela enzima. Em seguida, o sistema de reparo de DNA da célula restaura as quebras provocadas no genoma. As áreas azul e verde no genoma do fungo representam seqüências gênicas.

**TABELA 1.** Número de transformantes de *Colletotrichum graminicola* usando combinações de enzima-pCB1636 (Thon et al., 2000).

Estado físico do vetor pCB1636	Enzima adicionada à reação de transformação <sup>a</sup>			
	Nenhuma	<i>HindIII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>
Circular	3,0 <sup>b</sup>	5,3	25,3	12,3
	3,7	5,7	10,3	19,7
	<b>3,4<sup>c</sup></b>	<b>5,5</b>	<b>17,8</b>	<b>16,0</b>
Linearizado com <i>BamHI</i>	1,3	5,3	3,6	62,7
	5,0	22,7	26,3	112,3
	<b>3,2</b>	<b>14,0</b>	<b>15,0</b>	<b>87,5</b>
Linearizado com <i>HindIII</i>	0,3	22,3	13,0	19,3
	5,3	28,0	7,3	15,0
	<b>2,8</b>	<b>25,2</b>	<b>10,2</b>	<b>17,2</b>

<sup>a</sup> Quando a enzima foi requerida, 40 unidades foram adicionadas à reação.

<sup>b</sup> Número de transformantes por micrograma de DNA.

<sup>c</sup> O número em negrito representa a média de dois experimentos.

De modo geral, os fungos fitopatogênicos têm sido eficientemente transformados quando enzima de restrição está presente na reação, gerando resultados similares aos observados com *C. graminicola* (Thon et al., 2000). Na maioria dos casos a técnica acarretou acréscimo na frequência de transformantes (Tabela 2). A reação de transformação de *C. heterostrophus* na presença de 100 unidades da enzima *HindIII* gerou frequência de transformantes resistentes à higromicina 20 vezes superior ao tratamento controle, plasmídeo linear sem

enzima (Lu et al., 1994). A recuperação de transformantes de *Alternaria alternata* patótipo tomate foi sete vezes maior quando 20 unidades de *HindIII*/reação mediaram a integração do vetor no genoma do fungo (Akamatsu et al., 1997).

**TABELA 2.** Efeito da adição de enzima de restrição na eficiência de transformação (ET) de fungos fitopatogênicos.

<b>Fungo fitopatogênico</b>	<b>Efeito da enzima na ET*</b>	<b>Referência</b>
<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	Positivo	Lu et al., 1994
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Positivo	Redman & Rodriguez, 1994
<i>Magnaporthe grisea</i>	Positivo	Shi et al., 1995
<i>Ustilago maydis</i>	Não afetou	Bölker et al., 1995
<i>Alternaria alternata</i> patótipo tomate	Positivo	Akamatsu et al., 1997
<i>Mycosphaerella zea-maydis</i>	Positivo	Yun et al., 1998
<i>Alternaria alternata</i> patótipo pera japonesa	Positivo	Tanaka et al., 1999
<i>Gibberella fujikuroi</i>	Positivo	Linnemannstöns et al., 1999
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	Não afetou	Balint-Kurti et al., 2001
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Positivo	Yakoby et al., 2001

\* Positivo = aumento da ET; Não afetou = sem aumento da ET.

*U. maydis* (Bölker et al., 1995) e *M. fijiensis* (Balint-Kurti et al., 2001) representam os poucos relatos em que REMI não promoveu incremento na eficiência de transformação. Em *U. maydis* utilizaram-se 50 unidades de *Bam*HI por reação de transformação, enquanto em *M. fijiensis* a reação foi conduzida com 10, 50 ou 100 unidades de *Bg*III. Até o presente, os resultados indicam que REMI é dependente da concentração da enzima de restrição. A reação de transformação de *Alternaria alternata* patótipo tomate com mais de 20 unidades de *Hind*III ou *Xba*I promoveu redução significativa no número de transformantes (Akamatsu et al., 1997). Além disso, é possível que algumas enzimas não afetem a eficiência de transformação. Em *M. grisea*, por exemplo, o aumento da frequência de transformantes foi 10 vezes maior com *Bam*HI ou *Bg*III, enquanto *Hind*III elevou a eficiência em apenas duas vezes (Shi et al., 1995). Portanto, são necessárias novas investigações antes de afirmar que REMI não é eficiente em *U. maydis* e *M. fijiensis*.

O número de transformantes apresentando apenas uma cópia do vetor integrada no genoma parece ser outra vantagem de REMI. Na ausência de enzimas de restrição, o DNA transformante é preferencialmente integrado em múltiplas cópias *in tandem* no genoma de *Ustilago maydis* (Bölker et al., 1995). Quando REMI foi utilizada, cerca de 90 % dos transformantes apresentaram uma única cópia de pSMUT no genoma. Como a presença da enzima favorece a integração de uma única cópia do vetor? É provável que presença da nuclease durante a transformação impossibilita a multimerização do plasmídeo antes de integrar-se no genoma. Essa característica é altamente positiva no que tange à marcação física de genes, pois facilita a posterior recuperação do gene mutado.

Na maioria dos casos, REMI tem garantido a aleatoriedade dos eventos de integração do vetor. Sweigard et al. (1998), em contrapartida, obtiveram dois mutantes independentes de *M. grisea* com inserção do vetor no mesmo gene, *PTH2*. Lu et al. (1994) também relataram a ocorrência de dois mutantes com integração do vetor no loco *Tox1* de *C. heterostrophus*. Neste último caso, pode ter sido reflexo do tamanho do loco e/ou da riqueza de sítios de reconhecimento para a enzima de restrição utilizada na transformação. O tipo de enzima de restrição utilizada limita o número de sítios acessíveis para integração, e mesmo se obtendo aleatoriedade de inserção com determinada enzima, outras enzimas devem ser utilizadas para assegurar inserções nos vários genes de interesse. Teoricamente, enzimas reconhecendo sítios com quatro pares de base promoveriam melhor cobertura do genoma.

### **TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT)**

*Agrobacterium tumefaciens*, bactéria de solo gram negativa, causa a doença conhecida como galha-da-coroa em várias plantas. A bactéria transfere parte de seu plasmídeo Ti (*Tumour-inducing*), o T-DNA (*Transfer DNA*), para as células hospedeiras. A transferência depende da ativação dos genes *vir* (genes de virulência) do plasmídeo Ti, que é feita por compostos exsudados pelos ferimentos da planta, como monossacarídeos e acetosiringone (AS). O T-DNA se integra no genoma da planta e a expressão dos genes *onc*, presentes em sua seqüência, leva à proliferação celular e à formação de tumor. As únicas regiões do

T-DNA necessárias para sua transferência são as duas seqüências diretas repetidas flanqueadoras de 24 pb, conhecidas como borda esquerda (LB - *left border*) e borda direita (RB - *right border*). A elucidação do mecanismo de infecção da bactéria despertou a atenção de pesquisadores, que se valeram desse fenômeno biológico para criar nova ferramenta de transformação. A manipulação do plasmídeo Ti gerou sistema eficiente de transferência de genes, o qual é hoje o mais empregado na transformação de plantas.

Em meados dos anos 90, demonstrou-se que a *A. tumefaciens* é capaz de transformar *S. cerevisiae*, com a integração do T-DNA ocorrendo via recombinação homóloga ou ilegítima (Bundock et al., 1995; Piers et al., 1996; Bundock & Hooykaas, 1996). A transferência do T-DNA foi, em parte, dependente dos genes *vir*. Isolados de *A. tumefaciens* deficientes na síntese das proteínas *vir* reduziram ou anularam a frequência de transformantes de *S. cerevisiae*. A presença das seqüências flanqueadoras do T-DNA foi importante para o mecanismo de transformação, tendo sido constatada a ausência de transformantes quando o vetor faltando LB e RB foi utilizado (Piers et al., 1996). Outra característica importante de ATMT em *S. cerevisiae* foi o requerimento pelo composto fenólico AS. A omissão de AS não permitiu a transformação da levedura (Bundock et al, 1995; Piers et al., 1996).

O confronto das informações acima sugere semelhanças no mecanismo de transferência do T-DNA nos sistemas eucarióticos superior e inferior. O T-DNA precisa ser processado pela clivagem de LB e RB e então, transferido para a levedura por aparato similar ao utilizado para a transformação de plantas.

O sucesso da agro-transformação de levedura foi rapidamente estendido para outros sistemas fúngicos. Ao ser co-cultivada com fungos filamentosos, *A. tumefaciens* foi capaz de transformar espécies como: *A. awamori*, *A. niger*, *F. venenatum*, *T. reesei*, *C. gloeosporioides*, *N. crassa* (De Groot et al, 1998) e o cogumelo *Agaricus bisporus* (De Groot et al, 1998; Chen et al., 2000). Mais recentemente, à gama de hospedeiros de *A. tumefaciens* foram anexados *F. oxysporum* (Mullins et al., 2001), *M. grisea* (Rho et al., 2001) e o oomiceto *P. infestans* (Vijn & Govers, 2003).

Resumidamente, o procedimento padrão para a ATMT em fungos filamentosos envolve: (1) o cultivo da bactéria; (2) a obtenção das células do fungo a ser transformado; (3) o co-cultivo das células bacterianas e fúngicas sobre filtro de nitrocelulose em meio de indução com AS e (4) a transferência da membrana para o meio de cultura com o agente seletivo para os transformantes e o antibiótico específico para matar a bactéria.

A eficiência de transformação obtida com a técnica tem sido muito satisfatória. A ATMT, utilizando protoplastos ou conídios, melhorou a eficiência de transformação de *A. awamori* acima de 600 vezes em comparação aos procedimentos tradicionais. Além disso, a maior parte dos transformantes continha uma única cópia do T-DNA integrado aleatoriamente no cromossomo (De Groot et al., 1998). Em *F. oxysporum* e *M. grisea* a agro-transformação foi capaz de gerar frequências de 300 - 500 e 500 - 1000 transformantes/ $10^6$  conídios, respectivamente (Mullins et al., 2001; Rho et al., 2001).

A eficiência de transformação tem sido correlacionada com o número de células bacterianas utilizado para a transformação e com o tempo de co-cultivo

dos organismos (Mullins et al., 2001; Rho et al., 2001). Em geral, o aumento do número de células bacterianas ou do tempo de co-cultivo resultou em eficiência de transformação melhorada. Por outro lado, na ATMT em *M. grisea*, o maior tempo de exposição dos conídios do fungo às células bacterianas resultou em aumento do número de cópias do T-DNA inseridas no genoma (Rho et al., 2001).

A transformação de fungos filamentosos via *A. tumefaciens* é extremamente dependente de AS, indicando que a indução dos genes *vir* é essencial para a transferência do vetor (De Groot et al., 1998; Gouka et al., 1999; Chen et al., 2000; Rho et al., 2001). É fundamental o fornecimento do composto fenólico durante o período de co-cultivo da bactéria com o fungo. Embora AS seja dispensável durante o cultivo das células de *A. tumefaciens*, a sua ausência nesta etapa promoveu redução no número de transformantes (Mullins et al., 2001; Rho et al., 2001). Contudo, a pré-indução dos genes *vir* da bactéria exerceu efeito sobre o número de cópia de T-DNA inseridos no genoma de *F. oxysporum*. Apenas 53 % dos transformantes gerados por células de *A. tumefaciens* crescendo em meio com AS apresentaram uma única cópia do T-DNA no genoma (Mullins et al., 2001). Em contrapartida, a transformação mediada por bactérias cultivadas em meio sem AS gerou 80 % de transformantes com apenas uma cópia do vetor. Efeito similar foi verificado com a ATMT em *M. grisea* (Rho et al., 2001).

Vantagem importante de ATMT sobre REMI é a versatilidade na escolha do material a ser transformado. A transformação é eficiente com protoplastos, esporos, fragmentos de hifas ou fragmentos de basiocarpo.

## APLICAÇÕES DAS TÉCNICAS DE TRANSFORMAÇÃO

### Marcação física e clonagem de genes

A necessidade de compreender os mecanismos que governam a patogenicidade de fungos importantes economicamente tem estimulado muitas pesquisas. Uma estratégia é utilizar os vetores de transformação para simultaneamente mutar e marcar fisicamente os genes envolvidos na patogênese. O princípio baseia-se na inativação de genes via a inserção do vetor na região regulatória ou codificadora (mutagênese insercional), com subsequente identificação dos mutantes de interesse. As próximas etapas incluem: (1) análise de hibridização de DNA para selecionar eventos de integração simples; (2) recuperação do vetor com as seqüências genômicas flanqueadoras; (3) seqüenciamento do fragmento recuperado; (4) construção e hibridização do banco genômico do isolado selvagem, para a clonagem do gene completo; (5) análise da seqüência do gene clonado; (6) pesquisa em bancos de dados de DNA para fazer inferências funcionais, e (7) demonstração que o fenótipo mutante observado é derivado do evento de inserção do vetor.

Até junho de 2001, as seqüências de 79 genes envolvidos na patogenicidade de fungos foram depositadas em bancos de dados de domínio público (Idnurm & Howlett, 2001). Vinte e duas seqüências gênicas foram identificadas por meio de mutagênese insercional mediada por técnicas de transformação. Genes envolvidos na biossíntese de toxinas de *C. heterostrophus* (Lu et al., 1994), *A. alternata* (Akamatsu et al., 1997; Tanaka et al., 1999) e *M. zae-maydis* (Yun et al., 1998), e

genes envolvidos na colonização de espécies de *Colletotrichum* (Thon et al., 2000; Dufresne et al., 2000) são representantes dessa categoria.

Para ser funcional, a mutagênese insercional precisa contar com método eficiente de transformação, que favoreça a integração de uma única cópia do vetor em sítios aleatórios no genoma do fungo (Brown & Holden, 1998). Por atender essas exigências, REMI tem melhorado significativamente o processo de marcação física e clonagem de genes envolvidos na patogênese. A eficiência de REMI como ferramenta para a mutagênese insercional em fungos fitopatogênicos foi inicialmente verificada em *C. heterostrophus*. Após a falta de êxito observada com mutagênese convencional, Lu et al. (1994) identificaram dois mutantes *Tox1*<sup>-</sup> marcados fisicamente pela presença do vetor em uma coleção de 1310 transformantes REMI. Logo em seguida, Bölker *et al.* (1995) aplicaram REMI em *U. maydis*, produzindo uma coleção de 928 transformantes. Cerca de 1,4 % desses indivíduos não produziram sintomas em plantas de milho. Análise mais detalhada de dois mutantes demonstrou que os fenótipos mutantes observados resultaram da inserção do vetor.

A técnica REMI tem sido intensamente utilizada na dissecação dos mecanismos de patogenicidade de *M. grisea* (Shi et al., 1995; Sweigard et al., 1998; Balhadère et al., 1999; Fujimoto et al., 2002). Segundo a classificação de genes de patogenicidade adotada por Idnurm & Howlett (2001), REMI possibilitou a clonagem de genes envolvidos na produção de estruturas de infecção (ex., *PTH11*), nas respostas ao ambiente (ex., *PTH2* e *PTH3*) e na sinalização celular (ex., *PTH4*). Mais recentemente, Fujimoto et al. (2002), objetivando identificar locos de características quantitativas controlando a

patogênese de *M. grisea* em arroz, obtiveram três transformantes REMI com patogenicidade reduzida marcados fisicamente pelo plasmídeo (0,5 %). Dois locos identificados, *PAT144* e *PAT531*, pareceram afetar a eficiência de infecção e a colonização dos tecidos do hospedeiro.

A técnica REMI também foi explorada por Thon et al. (2000) na marcação física de genes de *C. graminicola* envolvidos na patogenicidade em milho. Um dos mutantes detectados teve a seqüência interrompida recuperada e seqüenciada. O gene *CPR1*, assim designado, apresentou homologia com componente de um complexo peptidase sinal de *S. cerevisiae*, e foi hipotetizado estar envolvido na transição da fase biotrófica para a fase necrotrófica do processo de infecção.

Embora muitas vezes eficiente no estudo de patogenicidade fúngica, REMI apresenta significativa taxa de mutações não marcadas fisicamente. Essas mutações podem ser geradas espontaneamente ou pelo reparo do DNA induzido por REMI. Em *M. grisea*, Sweigard et al. (1998) obtiveram aproximadamente 1/3 de mutantes REMI não marcados fisicamente pelo gene codificador da resistência à higromicina. Resultado similar foi obtido com a transformação REMI em *C. heterostrophus* (Lu et al., 1994), enquanto em *U. maydis* 30 a 50 % das mutações não foram marcadas pela presença do vetor (Bölker et al., 1995). Essas mutações são facilmente identificadas em fungos que apresentam ciclo sexual em laboratório, porém, para àqueles onde a fase sexual não foi relatada a identificação pode consumir algum tempo. Rearranjos e deleções de DNA podem também ocorrer no sítio de integração. Sweigard et al. (1998) mencionaram ocorrência de deleções largas em mutantes *M. grisea*, especificamente *pth11-1* e *pth12*, superiores a 10 Kb. Surpreendentemente, a deficiência de giberelina manifestada

por 26 mutantes de *G. fujikuroi*, fungo patogênico ao arroz, obtidos por procedimentos convencionais de transformação e por REMI, não foi devido à inserção do vetor (Linnemannstöns et al., 1999). Análises *Southern blot* e eletroforese em campo pulsado (PFGE) indicaram rearranjos envolvendo deleções largas e translocações no cromossomo 4 do fungo. A adequação do protocolo REMI, no que concerne ao tipo e a concentração da endonuclease de restrição, pode minimizar o problema de mutações não marcadas fisicamente (Mullins & Kang, 2001).

Embora não tenham sido encontrados relatos, ATMT constitui ferramenta alternativa à REMI, exibindo grande potencial para a marcação física de genes de fungos fitopatogênicos. Assim como REMI, a ATMT atende todos os pré-requisitos para marcação física eficiente de genes de patogenicidade. Além disso, embora ainda não elucidado, acredita-se que a taxa de mutações não marcadas em ATMT seja inferior a observada em REMI. A suposição é reflexo da aparente fidelidade nos eventos de integração (apenas pequenas deleções têm sido detectadas em ambas as bordas do T-DNA) e dos menores danos causados no genoma do hospedeiro.

### **Análise funcional**

As funções da maioria dos genes recentemente descobertos têm sido prontamente identificadas por comparação com as seqüências previamente depositadas nos bancos de dados. No entanto, a análise computadorizada não é suficiente para identificar a função gênica com alta confiabilidade, necessitando-se de experimentação.

A forma mais direta de obter informações consistentes sobre função gênica é criando mutações do tipo perda-de-função. No processo convencional, um gene previamente clonado é manipulado de forma a tornar-se inativo, e em seguida é introduzido no genoma da espécie hospedeira via técnicas de transformação. Se o sistema em estudo permitir a ocorrência de eventos de recombinação homóloga, o gene selvagem será substituído pelo alelo inativo. Posteriormente, procede-se à análise do fenótipo resultante, fazendo-se inferências sobre a função gênica.

A mutagênese direcionada permitiu demonstrar o papel de muitos genes fúngicos nos processos de formação de estruturas de infecção, resposta ao ambiente, produção de toxinas e sinalização celular (Idnurm & Howlett, 2001). A maior limitação desse método é a baixa frequência dos eventos de recombinação homóloga em fungos filamentosos (Fincham, 1989; Mullins & Kang, 2001). Em decorrência disso, é grande o número de transformantes a ser analisado para se chegar ao mutante com perda-de-função.

Alternativa potencial aos procedimentos convencionais é a transformação mediada por *Agrobacterium*. A bactéria tem mediado, em alguns casos, a integração eficiente do DNA transformante via eventos de recombinação homóloga. A frequência de recombinação homóloga observada em *Kluyveromyces lactis* foi reproduzida em *F. oxysporum* (Bundock et al., 1999; Mullins & Kang, 2001). Cerca de 70 % dos indivíduos agro-transformados apresentaram a substituição do gene homólogo de *S. cerevisiae*, *SNF1* (codificador de proteína quinase requerida para a expressão de enzimas degradadoras de parede), pelo alelo inativo. Se essa propriedade for constatada

como regra, a agro-transformação constituirá método importante para a genômica funcional de fungos fitopatogênicos.

### **Melhoramento genético de espécies**

O estabelecimento de técnicas de biologia molecular para fungos filamentosos, especialmente sistemas de transformação, possibilitou a introdução de novas características em espécies-alvo.

Basicamente, as estratégias para obter indivíduos geneticamente melhorados incluem: (1) gerar cópias múltiplas de genes endógenos; (2) modificar a regulação gênica e (3) expressar genes provenientes de outras espécies ou organismos. Delineada a estratégia, o vetor contendo a construção gênica de interesse, incluindo seqüências promotora e terminadora ativas na linhagem recipiente, é introduzido no genoma da espécie hospedeira.

Obviamente, espécies de importância industrial têm sido mais comumente submetidas ao melhoramento genético. No entanto, é possível encontrar alguns bons exemplos de melhoramento genético de espécies de fungos fitopatogênicos. O melhoramento da atividade antagonista de *Trichoderma harzianum* é um deles (Limón et al., 1999). Indivíduos apresentando 8 a 12 cópias do gene *CHIT33*, os quais superexpressavam quitinase, foram mais eficientes na inibição do crescimento *in vitro* de *Rhizoctonia solani* em relação ao indivíduo selvagem.

Mais recentemente, técnicas de transformação mediaram o aumento da patogenicidade do fungo nematófago *Arthrobotrys oligospora*. Åhman et al. (2002) obtiveram mutantes de *A. oligospora* com cópias adicionais de *PII*, gene codificador de protease serínica extracelular pertencente à família subtilisina de

proteases serínicas. Embora sua função não esteja totalmente esclarecida, acredita-se que *PII* exerça função na patogenicidade do fungo. Os mutantes com múltiplas cópias de *PII* apresentaram maior número de estruturas de infecção e maior velocidade de captura, o que os tornaram mais eficientes no processo patogênico ao nematóide *Panagrellus redivivus*.

## FATOS E PERSPECTIVAS

As técnicas de transformação têm cumprido eficientemente o seu papel na mutagênese insercional, contribuindo para o acúmulo de informações acerca da patogenicidade de fungos em plantas (Idnurm & Howlett, 2001). Do total de seqüências gênicas depositadas em bancos de dados até a metade de 2001, cerca de 30 % foram identificadas e clonadas via mutagênese insercional mediada por transformação.

A técnica REMI mostrou ser método eficiente de investigação da patogenicidade de fungos como *U. maydis* (Bölker et al., 1995), *M. grisea* (Sweigard et al., 1998), *Colletotrichum graminicola* (Thon et al., 2000) e *F. oxysporum* (Namiki et al., 2001). Paralelamente, ATMT emerge com grande potencial para a marcação física genes requeridos para a fitopatogênese. Embora não totalmente elucidado, acredita-se que ATMT apresente freqüência de mutações não marcadas inferior à observada com REMI.

Além disso, as técnicas de transformação têm contribuído para a análise funcional de genes de fungos fitopatogênicos previamente clonados. E com os

avanços dos projetos genoma, mais do que nunca, essa tecnologia constituirá ferramenta valiosa para a genômica funcional.

Aliado a mutagênese insercional e a mutagênese dirigida, a obtenção de fungos expressando as proteínas verde fluorescente (GFP) e/ou vermelha fluorescente (DsRed) contribuirá para a elucidação de detalhes nas interações fungo-planta, ampliando o conhecimento sobre o desenvolvimento do patógeno no hospedeiro. A fluorescência diferenciada exibida por essas proteínas e outras derivadas poderá ser explorada em fitopatologia e na ecologia de fungos, principalmente em aspectos relativos ao controle biológico de doenças de plantas (Mikkelsen et al., 2003).

Diante da ampla linha de pesquisa, cabe à comunidade científica nacional despertar para a tecnologia de transformação e mutagênese, e aplicar criteriosamente tais ferramentas visando à compreensão das espécies reconhecidamente importantes bem como de toda a biodiversidade ainda inexplorada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, K., NELSON, G.H., PEOPLES, K.A., FRANK, S.A., MONTENEGRO-CHAMORRO, M.V., DEZWAAN, T.M., RAMAMURTHY, L., SHUSTER, J.R., HAMER, L. & TANZER, M.M. Efficient gene identification and targeted gene disruption in the wheat blotch fungus *Mycosphaerella graminicola* using TAGKO. **Current Genetics** 42:123-127. 2002.

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 4<sup>a</sup> ed. San Diego. Academic Press. 1997.
- ÅHMAN, J., JOHANSSON, T., OLSSON, M., PUNT, P.J., VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. & TUNLID, A. Improving the pathogenicity of a nematode-trapping fungus by genetic engineering of a subtilisin with nematotoxic activity. **Applied and Environmental Microbiology** 68:3408-3415. 2002.
- AKAMATSU, H., ITOH, Y., KODAMA, M., OTANI, H. & KOHMOTO, K. AAL-toxin-deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. **Phytopathology** 87:967-972. 1997.
- ARMALEO, D., YE, G.N., KLEIN, T.M., SHARK, K.B., SANFORD, J.C. & JOHNSTON, S.A. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. **Current Genetics** 17:97-103. 1990.
- BALHADÈRE, P.V., FOSTER, A.J. & TALBOT, N.J. Identification of pathogenicity mutants of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* by insertional mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 12:129-142. 1999.
- BALINT-KURTI, P.J., MAY, G.D. & CHURCHILL, A.C.L. Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions. **FEMS Microbiology Letters** 195:9-15. 2001.

BANKS, G.R. Transformation of *Ustilago maydis* by a plasmid containing yeast 2-micron DNA. **Current Genetics** 7:73-77. 1983.

BHAIRI, S.M. & STAPLES, R.C. Transient expression of the  $\beta$ -glucuronidase gene introduced into *Uromyces appendiculatus* uredospores by particle bombardment. **Phytopathology** 82:986-989. 1992.

BÖLKER, M., BÖHNERT, H.U., BRAUN, K.H., GÖRL, J. & KAHMANN, R. Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). **Molecular and General Genetics** 248:547-552. 1995.

BROWN, J.S. & HOLDEN, D.W. Insertional mutagenesis of pathogenic fungi. **Current Opinion in Microbiology** 1:390-394. 1998.

BUNDOCK, P. & HOOYKAAS, P.J.J. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 93:15272-15275. 1996.

BUNDOCK, P., DEN DULK-RAS, A., BEIJERSBERGEN, A. & HOOYKAAS, P.J.J. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO Journal** 14:3206-3214. 1995.

BUNDOCK, P., MRÓCZEK, K., WINKLER, A.A., STEENSMA, H.Y. & HOOYKAAS, P.J.J. T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* as an efficient tool for gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. **Molecular and General Genetics** 261:115-121. 1999.

CHAKRABORTY, B.N., PATTERSON, N.A. & KAPOOR, M. An electroporation-based system for high-efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi. **Canadian Journal of Microbiology** 37:858-863. 1991.

CHAURE, P., GURR, S.J. & SPANU, P. Stable transformation of *Erysiphe graminis* an obligate biotrophic pathogen of barley. **Nature Biotechnology** 18:205- 207. 2000.

CHEN, X., STONE, M., SCHLAGNHAUFER, C. & ROMAINE, C.P. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. **Applied and Environmental Microbiology** 66:4510-4513. 2000.

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

DHAWALE, S.S., PAIETTA, J.V. & MARZLUF, G.A. A new, rapid and efficient transformation procedure for *Neurospora*. **Current Genetics** 8:77-79. 1984.

DUFRESNE, M., PERFECT, S., PELLIER, A.L., BAILEY, J.A. & LANGIN, T. A *GAL4*-like protein is involved in the switch between biotrophic and necrotrophic phases of the infection process of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. **The Plant Cell** 12:1579-1590. 2000.

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

FUJIMOTO, D., SHI, Y., CHRISTIAN, D., MANTANGHIHAN, J.B. & LEUNG, H. Tagging quantitative loci controlling pathogenicity in *Magnaporthe grisea* by insertional mutagenesis. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 61:77-88. 2002.

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

HASHIMOTO, H., MORIKAWA, H., YAMADA, Y. & KIMURA, A. A novel method for transformation of intact cells by electroinjection of plasmid DNA. **Applied Microbiology and Biotechnology** 21:336-339. 1985.

HINNEN, A., HICKS, J.B. & FINK, G.R. Transformation of yeast chimaeric ColE1 plasmid carrying *LEU2*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 75:1929-1933. 1978.

HOROWITZ, S., FREEMAN, S. & SHARON, A. Use of green fluorescent protein-transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology** 92:743-749. 2002.

HUTCHINSON, H.T. & HARTWELL, L.H. Macromolecule synthesis in yeast spheroplasts. **Journal of Bacteriology** 94:1697-1705. 1967.

IDNURM, A. & HOWLETT, B.J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. **Molecular Plant Pathology** 2:241-255. 2001.

KAHMANN, R. & BASSE, C. REMI (restriction enzyme mediated integration) and its impact on the isolation of pathogenicity genes in fungi attacking plants. **European Journal of Plant Pathology** 105:221-229. 1999.

KARUBE, I., TAMIYA, E. & MATSUOKA, H. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* spheroplasts by high electric pulse. **FEBS Letters** 182:90-94. 1985.

KEMPKEN, F. Fungal transposons: from mobile elements towards molecular tools. **Applied Microbiology and Biotechnology** 52:756-760. 1999.

LIMÓN, M.C., PINTOR-TORO, J.A. & BENÍTEZ, T. Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-Kda chitinase. **Phytopathology** 89:254-261. 1999.

LINNEMANNSTÖNS, P., VOB, T., HEDDEN, P., GASKIN, P. & TUDZYNSKI, B. Deletions in the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi* by restriction enzyme-mediated integration and conventional transformation-mediated mutagenesis. **Applied and Environmental Microbiology** 65:2558-2564. 1999.

LU, S., LYNHOLM, L., YANG, G., BRONSON, C., YODER, O.C. & TURGEON, B.G. Tagged mutations at the *Tox1* locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 91:12649-12653. 1994.

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

MISHRA, N.C. & TATUM, E.L. Non-mendelian inheritance of DNA-induced inositol independent in *Neurospora*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 70:3875-3879. 1973.

MULLINS, E.D. & KANG, S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. **Cellular and Molecular Life Sciences** 58:2043-2052. 2001.

MULLINS, E.D., CHEN, X., ROMAINE, P., RAINA, R., GEISER, D.M. & KANG, S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. **Phytopathology** 91:173-180. 2001.

NAMIKI, F., MATSUNAGA, M., OKUDA, M., INOUE, I., NISHI, K., FUJITA, Y. & TSUGE, T. Mutation of an arginine biosynthesis gene causes reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 14:580-584. 2001.

NEUMANN, E., SCHAEFER-RIDDLER, M., WANG, Y. & HOFSCHEIDER, P.H. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation. **The EMBO Journal** 1:841-845. 1982.

PIERS, K.L., HEATH, J.D., LIANG, X., STEPHENS, K.M. & NESTER, E.W. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 93:1613-1618. 1996.

PRASANNA, G.L. & PANDA, T. Electroporation: basic principles, practical considerations and applications in molecular biology. **Bioprocess Engineering** 16:261-264. 1997.

PUNT, P.J., OLIVER, R.P., DINGEMANSE, M.A., POUWELS, P.H. & VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. **Gene** 56:117-124. 1987.

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

REDMAN, R.S. & RODRIGUEZ, R.J. Factors affecting the efficient transformation of *Colletotrichum* species. **Experimental Mycology** 18:230-246. 1994.

RHO, H.S., KANG, S. & LEE, Y.H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. **Molecules and Cells** 12: 407-411. 2001.

RIACH, M.B.R. & KINGHORN, J.R. Genetic transformation and vector developments in filamentous fungi. In: BOS, C. J. (Ed.) **Fungal genetics: principles and practice**. New York. Marcel Dekker Inc. 1996. pp. 209-233.

RUIZ-DÍEZ, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. **Journal of Applied Microbiology** 92:189-195. 2002.

SCHIESTL, R.H. & PETES, T.D. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 88:7585-7589. 1991.

SCHILLBERG, S., TIBURZY, R. & FISCHER, R. Transient transformation of the rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. **Molecular and General Genetics** 262:911-915. 2000.

SHI, Z., CHRISTIAN, D. & LEUNG, H. Enhanced transformation in *Magnaporthe grisea* by restriction enzyme mediated integration of plasmid DNA. **Phytopathology** 85:329-333. 1995.

SWEIGARD, J.A., CARROLL, A.M., FARRALL, L., CHUMLEY, F.G. & VALENT, B. *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 11:404-412. 1998.

TALBOT, N.J. & McCAFFERTY, H.R.K. Identification and characterisation of pathogenicity genes from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Cahiers Options Méditerranéennes** 15:137-142. 1997.

TANAKA, A., SHIOTANI, H., YAMAMOTO, M. & TSUGE, T. Insertional mutagenesis and cloning of the genes required for biosynthesis of the host-specific AK-toxin in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 12:691-702. 1999.

THON, M.R., NUCKLES, E.M. & VAILLANCOURT, L.J. Restriction enzyme-mediated integration used to produce pathogenicity mutants of *Colletotrichum graminicola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 13:1356-1365. 2000.

VIJN, I. & GOVERS, F. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant Pathology** 4:459-467. 2003.

VILLALBA, F., LEBRUN, M.H., HUA-VAN, A., DABOUSSI, M.J. & GROSJEAN-COURNOYER, M.C. Transposon *impala*, a novel tool for gene tagging in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 14:308-315. 2001.

WENDLAND, J., AYAD-DURIEUX, Y., KNECHTLE, P., REBISCHUNG, C. & PHILIPPSSEN, P. PCR-based gene targeting in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. **Gene** 242:381-391. 2000.

YAKOBY, N., ZHOU, R., KOBILER, I., DINOOR, A. & PRUSKY, D. Development of *Colletotrichum gloeosporioides* restriction enzyme-mediated integration mutants as biocontrol agents against anthracnose disease in avocado fruits. **Phytopathology** 91:143-148. 2001.

YUN, S.H., TURGEON, B.G. & YODER, O.C. REMI-induced mutants of *Mycosphaerella zeae-maydis* lacking the polyketide PM-toxin are deficient in pathogenesis to corn. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 52:53-66, 1998.

ARTIGO 1

PRODUÇÃO E REGENERAÇÃO DE PROTOPLASTOS DE

*Magnaporthe grisea*\*

CARLOS EDUARDO MARCHI<sup>1</sup>, SÉRGIO HERMÍNIO

BROMMONSCHENKEL<sup>1</sup>, MARISA VIEIRA DE QUEIROZ<sup>2</sup> &

EDUARDO SEITI GOMIDE MIZUBUTI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, <sup>2</sup>Departamento de Microbiologia, Universidade

Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, MG, fax: (31) 3899-2629,

e-mail: cemarchi@alunos.ufv.br

(Aceito para publicação em / / )

Autor para correspondência: Carlos Eduardo Marchi

---

MARCHI, C.E., BROMMONSCHENKEL, S.H., QUEIROZ, M.V. de &  
MIZUBUTI, E.S.G. Produção e regeneração de protoplastos de *Magnaporthe  
grisea*. **Fitopatologia Brasileira**.

**RESUMO**

Protoplastos constituem ferramentas biológicas importantes para pesquisas em fungos filamentosos, sendo empregados intensamente em sistemas de

---

\* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Universidade Federal de Viçosa (2003).

transformação genética. A protoplastização de *Magnaporthe grisea* foi facilitada com o advento de *Novozym 234*, preparação enzimática comercial à base de glucanases e quitinases. A indisponibilidade deste complexo enzimático no mercado estimulou a comparação da eficiência de outras enzimas líticas disponíveis comercialmente na obtenção de protoplastos de *M. grisea*. Paralelamente, foram analisados estabilizadores osmóticos, tempos de digestão e frequência de regeneração. Maior produção de protoplastos de *M. grisea* foi obtida com o uso simultâneo de *Lysing Enzymes* e *Cellulase Onozuka R-10*. A utilização de 10 ou 15 mg de cada preparação enzimática, em 3 mL de estabilizador osmótico, resultou em maior liberação de protoplastos. O melhor estabilizador osmótico foi  $\text{MgSO}_4$  a 1,2 M /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 0,01 M (pH = 5,8), seguido por  $\text{MgSO}_4$  a 0,8 M /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 0,01 M (pH = 5,8). A produção de protoplastos de *M. grisea* foi monitorada a cada 60 minutos, e foi maior com período de incubação de 3 a 6 horas. No entanto, maior frequência de regeneração (19,4 %) foi registrada para protoplastos gerados com 3 horas de hidrólise enzimática.

**Palavras-chave:** Protoplastização, brusone, *Pyricularia grisea*, *P. oryzae*.

## ABSTRACT

### ISOLATION AND REGENERATION OF *Magnaporthe grisea*

#### PROTOPLASTS

Protoplasts are important biological tools in filamentous fungi research. Fungal protoplasts have been extensively used in genetic transformation

experiments. Protoplastization of *Magnaporthe grisea*, the rice blast fungus, was accomplished with *Novozym 234*, a commercial enzymatic preparation with glucanase and chitinase activities. However, this enzymatic complex is no longer commercially available, thus efficiency of several others commercial enzymes in *M. grisea* protoplasts preparation was investigated. Osmotic buffer, digestion time and regeneration rate were also analyzed. The highest protoplasts production was obtained with *Lysing Enzymes* plus *Cellulase Onozuka R-10*. Ratios of 10 to 10 mg or 15 to 15 mg of enzymes to 3 mL of buffer were most effective for the protoplasts yields. The best osmotic buffer was  $\text{MgSO}_4$  at 1.2 M /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  at 0.01 M (pH = 5.8), followed by  $\text{MgSO}_4$  at 0.8 M /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  at 0.01 M (pH = 5.8). The *M. grisea* protoplasts yield was increased with 3 to 6 hours of incubation. However, the highest regeneration frequency (19.4 %) was recorded for 3 hours incubated protoplasts.

---

## INTRODUÇÃO

O isolamento de protoplastos, células artificialmente desprovidas de parede, é procedimento bem estabelecido para fungos filamentosos (Peberdy, 1989). A aplicabilidade da técnica baseia-se na suposição que os protoplastos são fisiologicamente análogos às células intactas das quais foram derivados.

Protoplastos foram inicialmente explorados em estudos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos. Em anos recentes, protoplastos têm constituído ferramentas biológicas importantes para a manipulação genética de fungos

filamentosos (Peberdy, 1989). Protoplastos são requeridos para a fusão somática de indivíduos pertencentes a gêneros ou espécies distintas, para a determinação do número e/ou tamanho de cromossomos, bem como para a localização de genes específicos em cromossomos por meio de PFGE, eletroforese de campo pulsado (Peberdy, 1989). Além disso, os protoplastos são substratos importantes para a técnica REMI, *Restriction Enzyme-Mediated Integration* (Schiestl & Petes, 1991), e outros métodos de transformação genética.

Freqüentemente, na protoplastização utilizam-se fragmentos de micélio jovem ou esporos assexuais, germinados ou não; basidiósporos podem ser utilizados no caso de basidiomicetos como *Agaricus* (Fincham, 1989; Ruiz-Díez, 2002). Embora métodos mecânicos possam ser aplicados, usualmente a remoção da parede celular ocorre pela ação de enzimas líticas, em meio osmoticamente balanceado. Além da espécie fúngica e do tipo de célula utilizada, a liberação de protoplastos depende de fatores como: (1) a composição do meio de cultivo; (2) o estado fisiológico da cultura; (3) o tipo e a concentração da enzima lítica; (4) o tipo e a concentração do estabilizador osmótico; (5) o tempo de digestão e (6) o pH e a temperatura do sistema. Após a liberação, quando em meio nutritivo apropriado, os protoplastos são capazes de regenerar a parede celular, dando origem ao micélio. Contudo, as taxas de regeneração e reversão variam de organismo para organismo, geralmente nunca atingindo 100 % (Aguilar, 1991).

Os primeiros ensaios de protoplastização de fungos filamentosos datam final da década de 50, e foram desenvolvidos com *Neurospora crassa* (Emerson & Emerson, 1958; Bachmann & Bonner, 1959). A partir daí, muitos fungos filamentosos, incluindo espécies fitopatogênicas como *Alternaria eichhorniae*

(Shabana & Charudattan, 1997), *Crinipellis pernicioso* (Lima et al., 2003), *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme* (Vazquez & Figueroa, 1996), *F. graminearum* (Wiebe et al., 1997) e *Sclerotium rolfsii* (Fariña et al., 2004) têm sido alvos de protoplastização.

Os primeiros protoplastos de *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr. (anamorfo: *Pyricularia grisea*, *P. oryzae*), principal patógeno da cultura do arroz (Ou, 1985), foram obtidos a partir da combinação de enzimas comerciais (Hosokawa & Kosaka, 1976). Complexo enzimático extraído de *Bacillus circulans* também foi relatado como capaz de protoplastizar *M. grisea* (Tanaka et al., 1981). Contudo, a produção de enzimas a partir de microrganismos é trabalhosa, e as preparações têm grandes variações na proporção relativa das diferentes enzimas líticas.

A protoplastização de *M. grisea* foi facilitada com o advento da formulação comercial *Novozym 234* (*Novo Nordisk* Ltd.), devido à sensibilidade da parede celular a esta preparação. *Novozym 234*, complexo hidrolítico à base de glucanases e quitinases extraído de *Trichoderma* sp., tornou-se o sistema enzimático praticamente universal para a obtenção de protoplastos de *M. grisea* (Talbot et al., 1993; Shi et al., 1995; Sweigard et al., 1998; Balhadère et al., 1999). No entanto, atualmente *Novozym 234* não se encontra disponível no mercado.

A indisponibilidade de *Novozym 234* e a necessidade de obter protoplastos para o estabelecimento de mutagênese insercional mediada por REMI, motivaram a avaliação da eficiência de algumas enzimas líticas disponíveis comercialmente na protoplastização de *M. grisea*. Além disso, foram analisados o tipo e a concentração de estabilizadores osmóticos, tempos de digestão e a regeneração dos protoplastos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ***Magnaporthe grisea* e condições de cultivo**

Foram utilizados os isolados I-21 e I-22, patogênicos ao arroz, gentilmente cedidos pelo Laboratório de Fitopatologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. Os isolados foram cultivados em meio de farinha de arroz-ágar (FAA - 20 g de farinha de arroz com casca, 5 g de sacarose, 15 g de ágar, 1 L de água destilada) por 5 a 7 dias em BOD a 28 °C, no escuro. Para a preservação do fungo em longo prazo, pedaços (4 cm<sup>2</sup>) de papel-manteiga colonizados pelo micélio foram mantidos a - 80 °C (Valent et al., 1991).

### **Obtenção dos protoplastos de *M. grisea***

Para o isolamento de protoplastos, inicialmente foi obtida cultura-estoque dos isolados. Discos de ágar com micélio do fungo foram transferidos para *erlenmeyer* 250 mL contendo meio completo (MC - 0,5 % de sacarose; 0,6 % de extrato de levedura; 0,6 % de caseína ácida hidrolisada) e submetidos a 130 - 150 rpm, a 28 - 30 °C, por 4 dias. Uma fração da cultura-estoque foi transferida para outro *erlenmeyer* 250 mL contendo MC e permitida crescer por 48 horas nas mesmas condições.

A massa micelial com 48 horas de cultivo foi filtrada, lavada duas vezes com estabilizador osmótico e permitida secar em câmara de fluxo por alguns minutos. O procedimento padrão para a protoplastização envolveu a adição da enzima lítica em 3 mL de estabilizador osmótico contendo 100 mg de micélio

úmido do fungo. Esta mistura foi mantida em agitador (100 rpm) a 28 - 30 °C por período de tempo variando de 1 a 6 horas.

Todos os fatores foram analisados em dois ensaios independentes, e cada tratamento foi aplicado em quatro unidades experimentais (*erlenmeyer* 25 mL). Os protoplastos foram observados ao microscópio e quantificados em câmara de Neubauer.

### **1. Digestão do micélio**

Foram testados os seguintes sistemas líticos: 1 - Controle (sem enzima lítica); 2 - *Lyticase* (*Sigma Chemicals Co.*); 3 - *Lysing Enzymes* (*Sigma Chemicals Co.*); 4 - *Driselase* (*Sigma Chemicals Co.*); 5 - *Glucanex* (*Novo Nordisk Ltd.*); 6 - *Cellulase Onozuka R-10* (*Yakult Biochemical Co. Ltd.*); 7 - *Lysing Enzymes* + *Cellulase Onozuka R10*; 8 - *Glucanex* + *Cellulase Onozuka R10* e 9 - *Lysing Enzymes* + *Glucanex*. Quinze miligramas de enzima foram misturados ao estabilizador osmótico  $MgSO_4$  a 1,2 M /  $NaH_2PO_4$  a 0,01 M (pH = 5,8). Quando em combinações, as enzimas foram usadas em proporções iguais (7,5 mg de cada enzima). A protoplastização foi efetuada por 5 horas.

### **2. Concentração da enzima lítica**

Para estabelecer a melhor relação massa micelial:enzima, seguindo os mesmos procedimentos, foram preparadas misturas para a digestão com diferentes quantidades (mg) do sistema enzimático que liberou o maior número de protoplastos. A protoplastização foi efetuada por 5 horas, utilizando-se o estabilizador osmótico  $MgSO_4$  a 1,2 M /  $NaH_2PO_4$  a 0,01 M (pH = 5,8).

### **3. Tipos de estabilizadores osmóticos**

O estabilizador osmótico afeta a protoplastização. O soluto deve promover condições favoráveis para a atividade da enzima e proteger os protoplastos contra a lise. Por isso, foi verificada a eficiência de estabilizadores osmóticos empregados tradicionalmente na protoplastização de fungos filamentosos, os quais incluíram: 1 - Controle (água destilada); 2 -  $\text{MgSO}_4$  a 0,6 M /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 0,01 M (pH = 5,8); 3 -  $\text{MgSO}_4$  a 0,8 M /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 0,01 M (pH = 5,8); 4 -  $\text{MgSO}_4$  a 1,2 M /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 0,01 M (pH = 5,8); 5 - KCl a 0,7 M /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 0,1 M (pH = 5,9); 6 - NaCl a 0,8 M /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 0,1 M (pH = 5,8); 7 - Sorbitol a 0,6 M /  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a 0,1 M (pH = 8,0) e 8 - Sacarose 20 % / EDTA a 50 mM / citrato tri-sódico a 20 mM (pH = 8,0). A protoplastização foi efetuada por 5 horas, sendo utilizado o sistema enzimático mais eficiente, em sua melhor concentração.

### **4. Tempos de exposição ao sistema enzimático**

A combinação sistema enzimático:concentração de enzima:estabilizador osmótico mais eficiente na protoplastização do fungo foi avaliada em diferentes tempos de incubação, variando de 1 a 6 horas. A cada 60 minutos, frações da suspensão de protoplastos foram retiradas assepticamente de cada repetição, com pipeta, e quantificadas em câmara de Neubauer.

### **Regeneração dos protoplastos de *M. grisea***

Após a adequação das condições para a protoplastização, suspensões purificadas de protoplastos, obtidas com 3, 4 ou 5 horas de digestão, foram examinadas quanto à capacidade de regeneração da parede celular.

Sistema de duas fases líquidas foi usado para a purificação dos protoplastos. Brevemente, os protoplastos liberados em  $\text{MgSO}_4$  a 1,2 M /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 0,01 M (pH = 5,8) foram colocados em tubo corex (15 mL) e, suavemente, adicionaram-se 4 mL de estabilizador ST (sorbitol a 0,6 M, Tris-HCl a 0,1 M, pH = 8,0). Posterior a centrifugação em rotor de caçamba (3000 rpm/5 minutos), os protoplastos se agregaram na interface dos estabilizadores osmóticos. Os protoplastos foram transferidos para outro tubo corex, ressuspensos em 2 mL de estabilizador STC (sorbitol a 1 M, Tris-HCl a 0,05 M,  $\text{CaCl}_2$  a 0,05 M, pH = 8,0) e precipitados por centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. Após três ciclos de lavagem em STC, a concentração de protoplastos foi ajustada para  $10^7/\text{mL}$  de STC.

Em ensaio preliminar, a regeneração dos protoplastos I-22, liberados com 5 horas de digestão, foi avaliada em cinco meios de regeneração: TB3 (20 % de sacarose; 0,3 % de extrato de levedura; 0,3 % de caseína ácida hidrolisada; 2 % de ágar); BDA acrescido de  $\text{MgSO}_4$  a 1,2 M (pH = 5,8); BDA acrescido de NaCl a 0,8 M (pH = 5,8); BDA acrescido de sorbitol a 1 M (pH = 8,0) e *Czapek* contendo 20 % de sacarose e 2 % de ágar. Embora não tenha sido quantificada, a frequência de regeneração foi aparentemente maior em TB3. Assim, TB3 foi selecionado para avaliar a influência do tempo de digestão na capacidade regenerativa dos protoplastos.

Um volume de 20  $\mu\text{L}$ , contendo número conhecido de protoplastos, foi semeado em placas de Petri pela técnica do cultivo em mistura (*pour plate*), utilizando-se TB3 ou meio completo-ágar (MCA - 0,5 % de sacarose; 0,3 % de extrato de levedura; 0,3 % de caseína ácida hidrolisada; 2 % de ágar).

O efeito do tempo de digestão na regeneração dos protoplastos foi avaliado em dois ensaios. Os tratamentos foram aplicados em 12 unidades experimentais (placas de Petri), as quais foram mantidas a 28 °C em BOD sem luz, por 7 dias. Calculou-se a porcentagem de regeneração segundo a fórmula:

$$\text{Regeneração (\%)} = (A - B)/C \times 100$$

Onde: A - número de colônias crescidas em TB3

B - número de colônias crescidas em MCA

C - número total de protoplastos plaqueados

No último ensaio, seis colônias foram removidas de placas de regeneração de cada tratamento e transferidas para placas de Petri com FAA. Dez placas por tratamento foram preparadas e incubadas a 28 °C em BOD sem luz. Este experimento visou avaliar a frequência de colônias inaptas a reverter para a forma micelial, ou seja, a frequência de colônias abortadas.

### **Análise dos dados**

Foi verificada a adequação dos dados quanto às pressuposições da análise de variância. Os procedimentos estatísticos, análises de variância e testes de média, foram realizados com o programa *SAS System* (SAS Institute, Cary, NC).

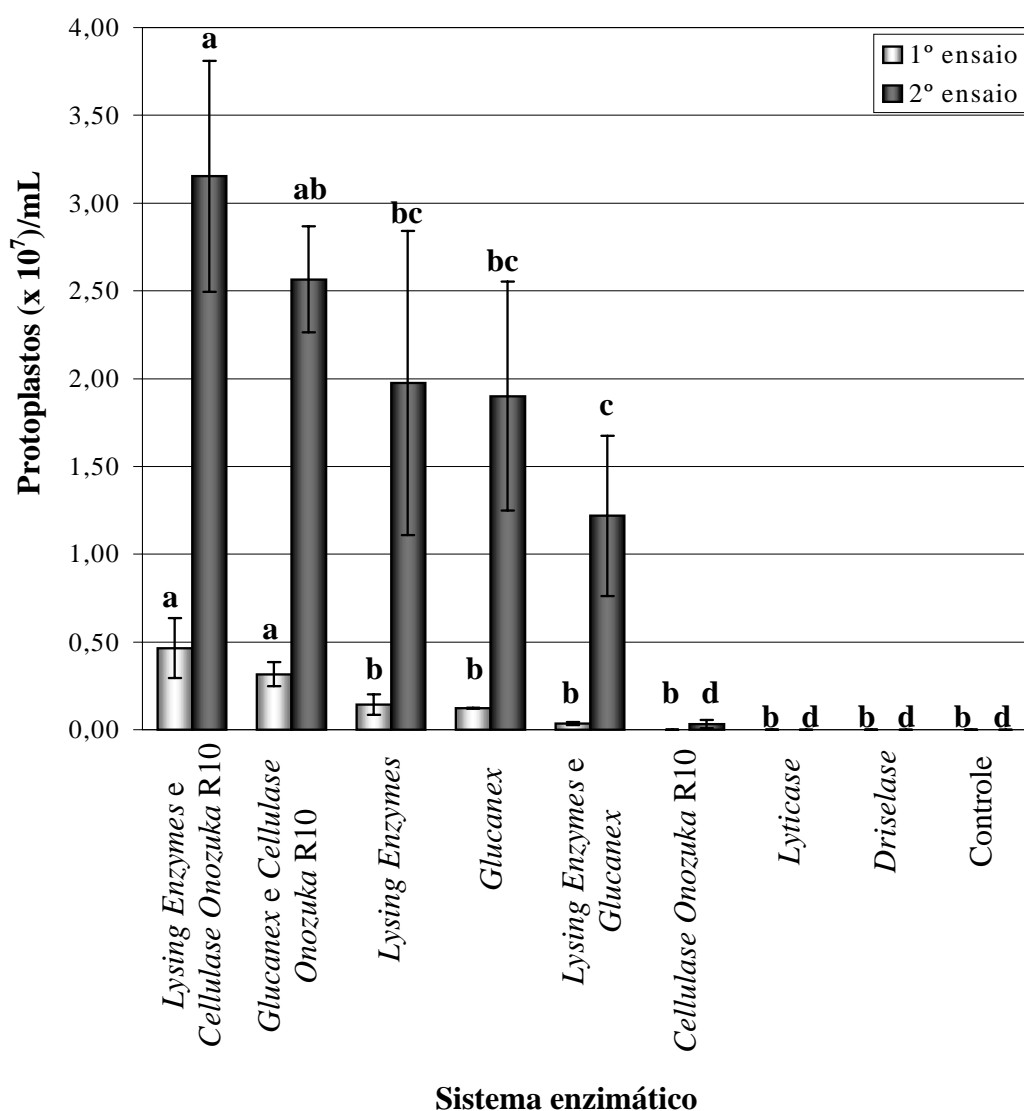
## RESULTADOS

### Obtenção dos protoplastos de *M. grisea*

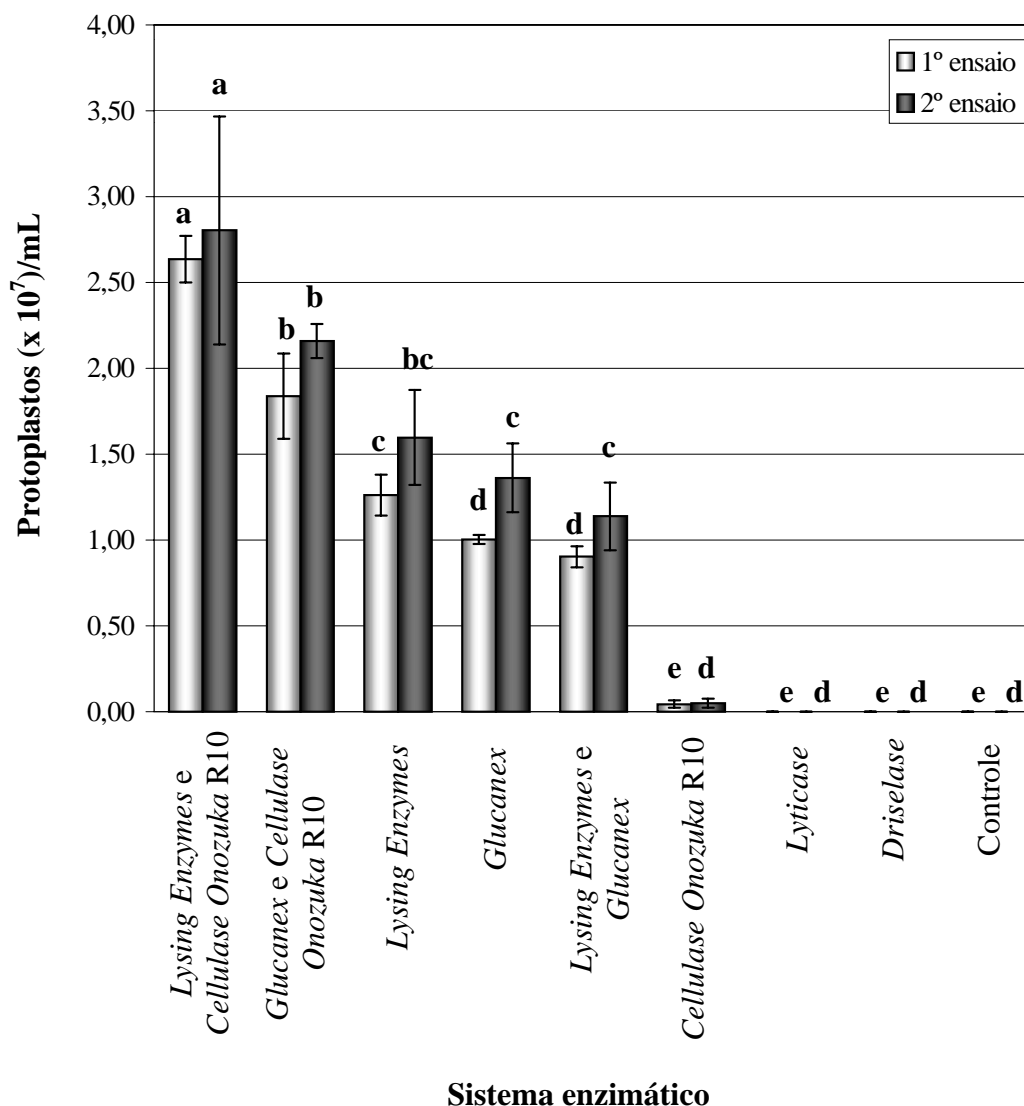
#### 1. Digestão do micélio

A liberação de protoplastos de *M. grisea* I-21 foi influenciada pelo sistema enzimático. Nos dois ensaios, houve a mesma tendência para a eficiência dos tratamentos, não se observando protoplastos quando *Driselase* ou *Lyticase* foi utilizada (Figura 1). O micélio I-21 foi sensível a *Lysing Enzymes* ou a *Glucanex*. A combinação de *Lysing Enzymes* e *Cellulase Onozuka R10* aumentou a produção de protoplastos em 225 % e 59 % no primeiro e no segundo ensaio, respectivamente, quando comparada com *Lysing Enzymes* isolada (Figura 1). Do mesmo modo, a combinação de *Glucanex* e *Cellulase Onozuka R10* foi mais eficiente do que *Glucanex* (Figura 1). Agindo individualmente, *Cellulase Onozuka R10* liberou protoplastos apenas no segundo ensaio.

A protoplastização de *M. grisea* I-22 foi avaliada e, também para este isolado, *Driselase* ou *Lyticase* não promoveu a liberação de protoplastos (Figura 2). A produção de protoplastos obtida com *Cellulase Onozuka R10* no primeiro e no segundo ensaio foi de  $4,4 \times 10^5/\text{mL}$  e  $5,0 \times 10^5/\text{mL}$ , respectivamente. *Lysing Enzymes* e *Glucanex*, agindo separadamente, foram eficientes na liberação de protoplastos, com médias superiores a  $10^7$  protoplastos/mL. Contudo, I-22 foi mais sensível à combinação de *Lysing Enzymes* e *Cellulase Onozuka R10*, seguida pela combinação de *Glucanex* e *Cellulase Onozuka R10*.



**FIGURA 1.** Número de protoplastos de *Magnaporthe grisea*, isolado I-21, após 5 horas de incubação a 28 - 30 °C, a 100 rpm, com diferentes sistemas enzimáticos. Mistura de digestão: 100 mg de micélio, 15 mg de enzima e 3 mL de MgSO<sub>4</sub> a 1,2 M em tampão fosfato a 0,01 M (pH = 5,8). Quando em combinação, usaram-se 7,5 mg de cada enzima. As barras representam o desvio padrão. Em cada ensaio, tratamentos com mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5 %.

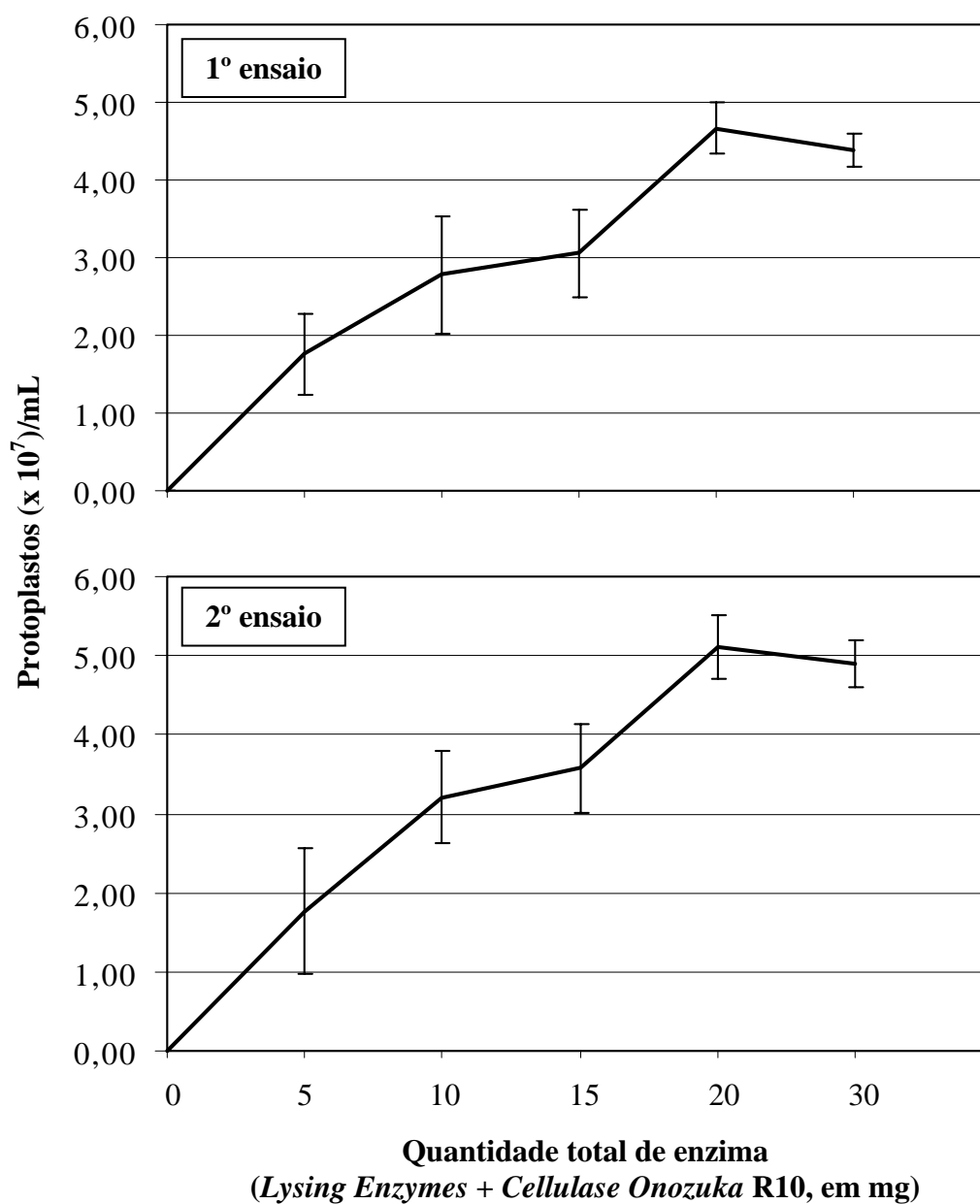


**FIGURA 2.** Número de protoplastos de *Magnaporthe grisea*, isolado I-22, após 5 horas de incubação a 28 - 30 °C, a 100 rpm, com diferentes sistemas enzimáticos. Mistura de digestão: 100 mg de micélio, 15 mg de enzima e 3 mL de MgSO<sub>4</sub> a 1,2 M em tampão fosfato a 0,01 M (pH = 5,8). Quando em combinação, usaram-se 7,5 mg de cada enzima. As barras representam o desvio padrão. Em cada ensaio, tratamentos com mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5 %.

## 2. Concentração da enzima lítica

Uma vez que número satisfatório de protoplastos foi liberado com o uso simultâneo de *Lysing Enzymes* e *Cellulase Onozuka R10*, o efeito da concentração enzimática na protoplastização de *M. grisea* foi verificado com base nessa combinação de enzimas (Figura 3). Este ensaio e os subseqüentes foram realizados apenas com o isolado I-22. Foram testadas concentrações que variaram de 2,5 a 15 mg de cada enzima por 3 mL de estabilizador osmótico.

De maneira geral, a produção de protoplastos aumentou com o aumento da concentração enzimática (Figura 3). Em ambos os ensaios, maior número de protoplastos foi alcançado quando cada enzima foi utilizada em quantidade superior a 7,5 mg. Os picos das curvas de protoplastização foram atingidos quando o sistema enzimático foi constituído por 10 mg de *Lysing Enzymes* e 10 mg de *Cellulase Onozuka R10*. Nessa condição, a média dos ensaios correspondeu a  $4,9 \times 10^7$  protoplastos/mL. Essa média foi reduzida para  $4,6 \times 10^7$  protoplastos/mL quando se utilizou o sistema lítico mais concentrado, ou seja, 15 mg de cada enzima (Figura 3).



**FIGURA 3.** Número de protoplastos de *Magnaporthe grisea*, isolado I-22, em função da concentração de *Lysing Enzymes* e *Cellulase Onozuka R10*. Mistura de digestão: 100 mg de micélio, cada enzima variando de 2,5 a 15 mg e 3 mL de MgSO<sub>4</sub> a 1,2 M em tampão fosfato a 0,01 M (pH = 5,8). Protoplastização realizada por 5 horas a 28 - 30 °C, a 100 rpm. As barras representam o desvio padrão.

### 3. Tipos de estabilizadores osmóticos

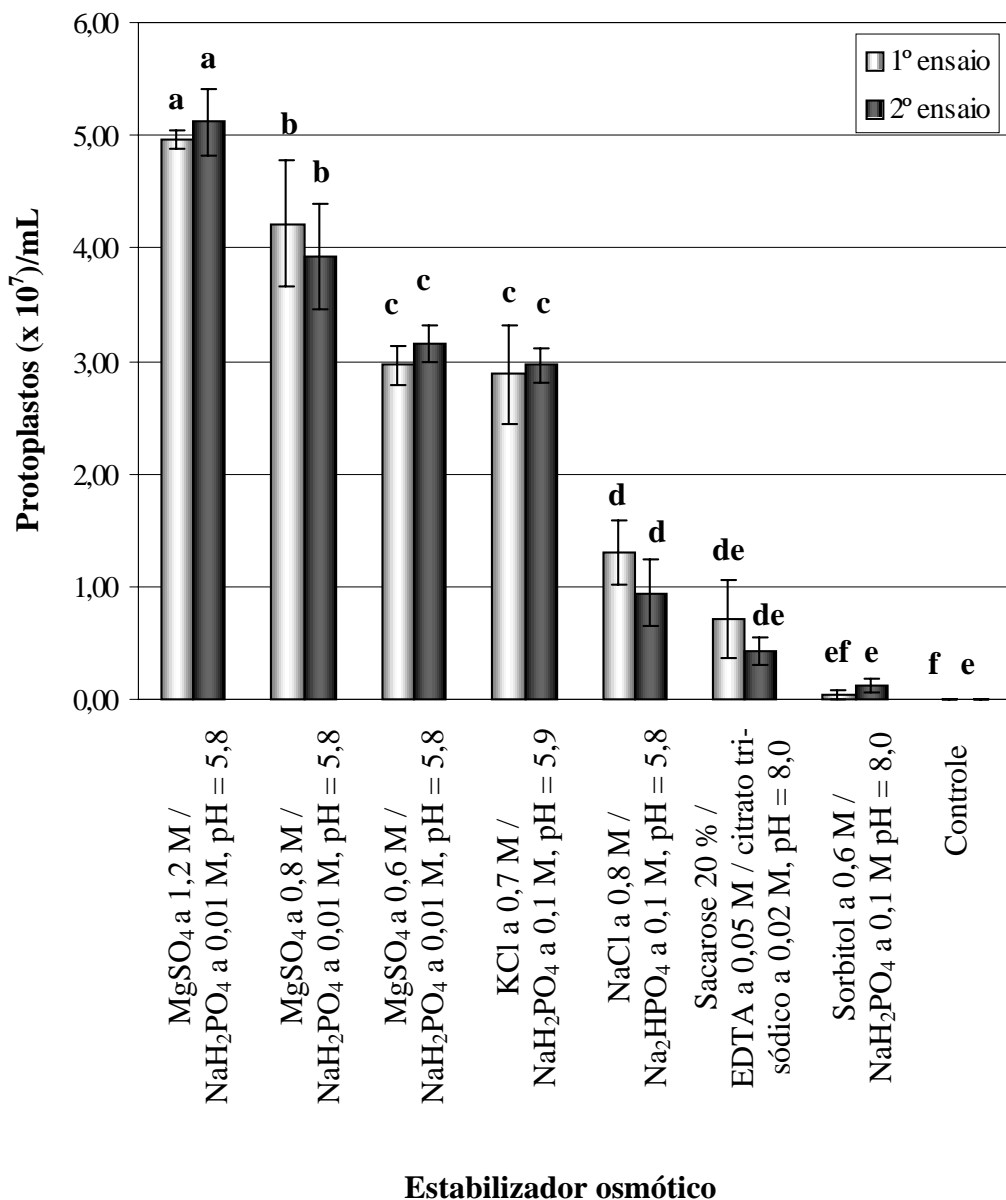
A protoplastização do I-22 foi influenciada pelo soluto empregado no sistema lítico (Figura 4). Em ambos os ensaios, houve a mesma tendência para a eficiência dos estabilizadores osmóticos.

Maior liberação de protoplastos foi observada com a solução de  $\text{MgSO}_4$  a 1,2 M, com médias de  $5,1 \times 10^7$  e  $5,0 \times 10^7$  protoplastos/mL no primeiro e no segundo ensaio, respectivamente (Figura 4). A solução de  $\text{MgSO}_4$  a 0,8 M também foi eficiente na liberação de protoplastos I-22, com média dos ensaios de  $4,1 \times 10^7$  protoplastos/mL. A estabilização com  $\text{MgSO}_4$  a 0,6 M foi similar à obtida com KCl a 0,7 M (Figura 4).

Entre os sais, a solução à base de NaCl foi a menos eficiente na estabilização da protoplastização de I-22, possibilitando a produção de  $1,3 \times 10^7$  e  $0,9 \times 10^7$  protoplastos/mL no primeiro e no segundo ensaio, respectivamente (Figura 4).

Duas soluções compostas por açúcares foram testadas como estabilizadores osmóticos para a liberação de protoplastos I-22. O emprego de solução à base de sacarose ou sorbitol promoveu baixa produção de protoplastos, média dos ensaios de  $0,6 \times 10^7$ /mL e  $0,9 \times 10^6$ /mL, respectivamente (Figura 4).

Embora não mensurados, em observações ao microscópio óptico, os protoplastos pareciam maiores quando liberados em estabilizadores osmóticos compostos por sais. Em contrapartida, protoplastos aparentemente menores foram observados quando sorbitol ou sacarose foi utilizado.



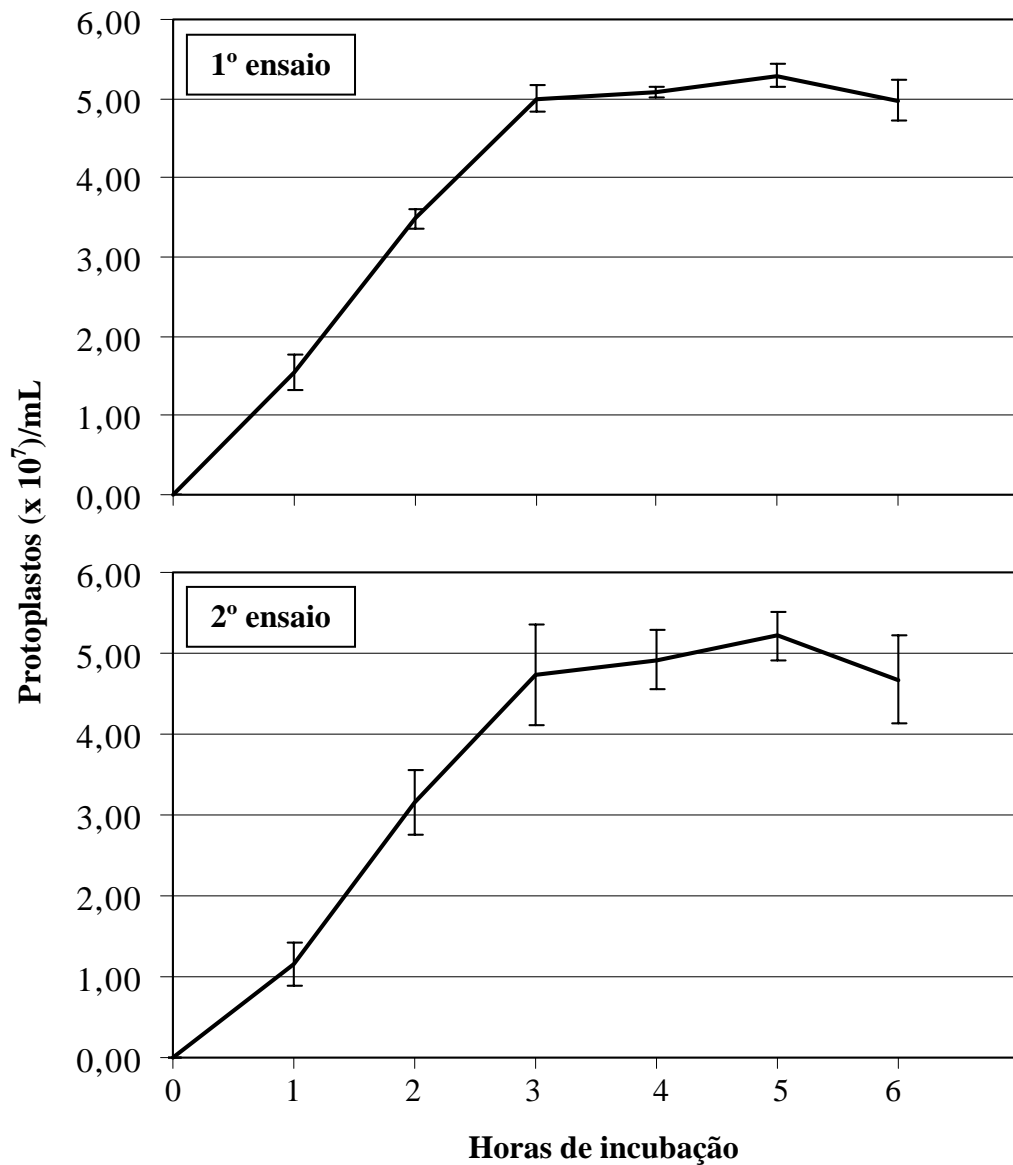
**FIGURA 4.** Número de protoplastos de *Magnaporthe grisea*, isolado I-22, em função do estabilizador osmótico. Mistura de digestão: 100 mg de micélio, 10 mg de *Lysing Enzymes*, 10 mg de *Cellulase Onozuka R10* e 3 mL de estabilizador. Protoplastização realizada por 5 horas a 28 - 30 °C, a 100 rpm. As barras representam o desvio padrão. Em cada ensaio, tratamentos com mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5 %.

#### 4. Tempos de exposição ao sistema enzimático

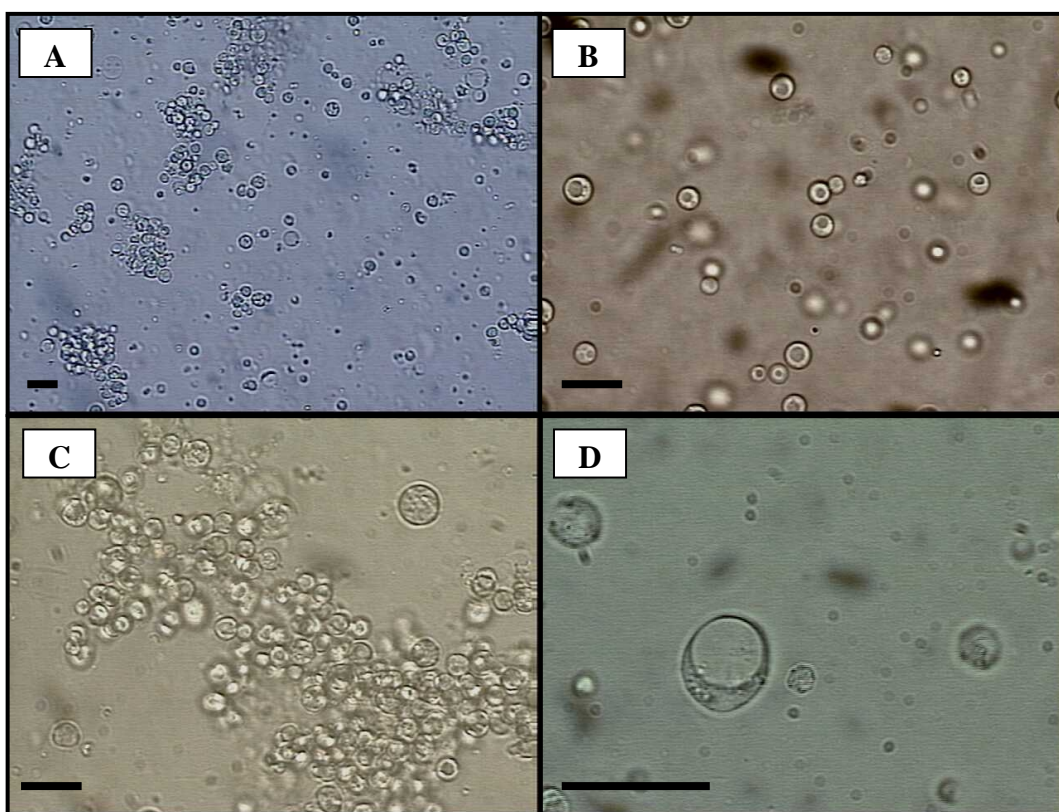
A protoplastização de *M. grisea* I-22 foi monitorada a cada 60 minutos, durante 6 horas de digestão. Em ambos os ensaios, protoplastos do I-22 puderam ser observados com apenas 1 hora de incubação, porém em baixo número (Figura 5). Aumento na produção de protoplastos foi constatado a partir da terceira hora de incubação. As maiores produções de protoplastos foram registradas com período de incubação de 3 a 6 horas.

Entre a terceira e a quinta hora de incubação, o número de protoplastos manteve-se estável, em torno de  $5,0 \times 10^7$ /mL. A partir da quinta hora de hidrólise enzimática, observou-se redução na liberação de protoplastos em ambos os ensaios (Figura 5).

Está representada na Figura 6 uma preparação de protoplastos do isolado I-22 obtida com 3 horas de incubação do micélio em estabilizador osmótico  $\text{MgSO}_4$  a 1,2 M /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 0,01 M (pH = 5,8) contendo 10 mg de *Lysing Enzymes* e 10 mg de *Cellulase Onozuka R10*.



**FIGURA 5.** Número de protoplastos de *Magnaporthe grisea*, isolado I-22, em função do tempo de digestão. Mistura de digestão: 100 mg de micélio, 10 mg de *Lysing Enzymes*, 10 mg de *Cellulase Onozuka R10* e 3 mL de  $MgSO_4$  a 1,2 M em tampão fosfato a 0,01 M (pH = 5,8). Protoplastização realizada a 28 - 30 °C, a 100 rpm. As barras representam o desvio padrão.



**FIGURA 6. A a D:** Fotomicrografias de protoplastos de *Magnaporthe grisea*, isolado I-22. Mistura de digestão: 100 mg de micélio, 10 mg de *Lysing Enzymes*, 10 mg de *Cellulase Onozuka R10* e 3 mL de  $MgSO_4$  a 1,2 M em tampão fosfato a 0,01 M (pH = 5,8). Protoplastização realizada por 3 horas a 28 - 30 °C, a 100 rpm. As barras na parte inferior das figuras correspondem a 10  $\mu m$ .

### **Regeneração dos protoplastos de *M. grisea***

A regeneração dos protoplastos em TB3 foi relativamente rápida, com as primeiras colônias surgindo no terceiro ou quarto dia de incubação. Contudo, não foi elevada, variando de 7,9 a 19,4 % (Tabela 1).

**TABELA 1.** Porcentagem de regeneração de protoplastos de *Magnaporthe grisea*, isolado I-22, obtidos com 3, 4 ou 5 horas de hidrólise enzimática.

Tempo de Digestão enzimática (h)*	Regeneração (%)				
	1º Ensaio		2º Ensaio		
3	15,05**	A	19,42	a	
4	11,77	B	16,43	b	
5	7,95	C	9,13	c	

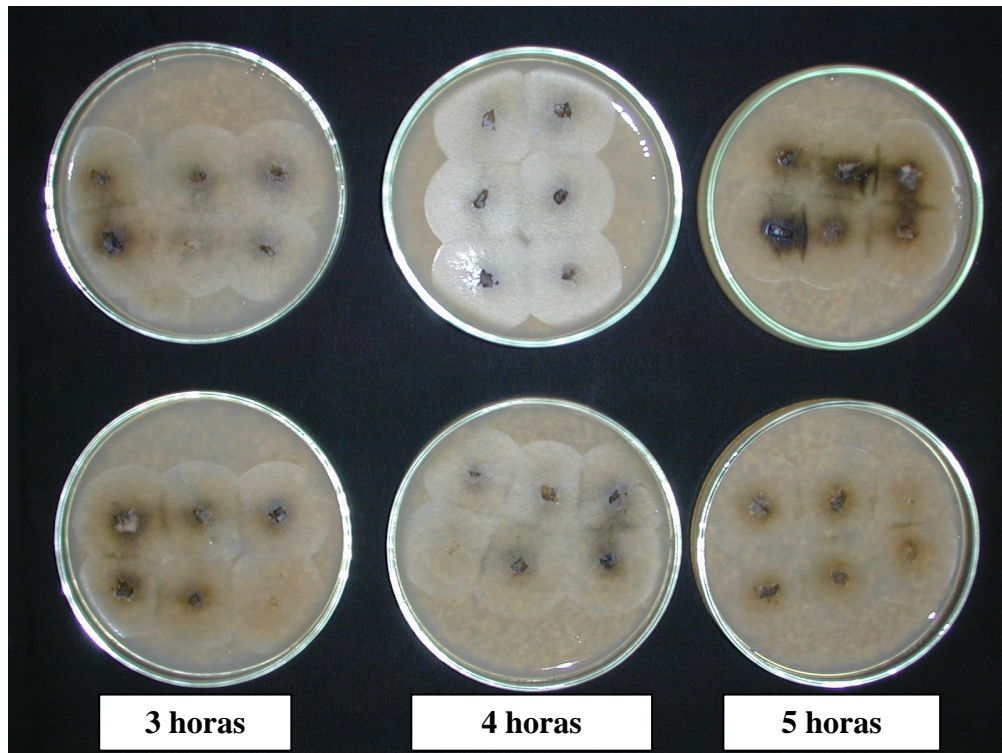
\* Mistura de digestão: 100 mg de micélio, 10 mg de *Lysing Enzymes*, 10 mg de *Cellulase Onozuka R10* e 3 mL de solução MgSO<sub>4</sub> a 1,2 M em tampão fosfato a 0,01 M (pH = 5,8). Protoplastização realizada a 28 - 30 °C, a 100 rpm.

\*\* Médias de 12 repetições e seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5 %.

A frequência de regeneração dos protoplastos do I-22 foi inversamente proporcional ao tempo de tratamento enzimático (Tabela 1). Maior porcentagem de regeneração foi obtida com protoplastos gerados com 3 horas de hidrólise enzimática. Em ambos os ensaios, tempos maiores de exposição ao sistema enzimático resultaram em redução da capacidade regenerativa dos protoplastos.

Independentemente do tempo de protoplastização, foi possível constatar crescimento micelial em todas as colônias que foram transferidas do meio TB3 para o FAA, com 24 horas de incubação (Figura 7). A melanização iniciou-se

após 72 horas de repicagem, e com 120 horas todas as colônias se apresentaram melanizadas.



**FIGURA 7.** Crescimento micelial de *Magnaporthe grisea*, isolado I-22, após a transferência das colônias do meio de regeneração (TB3) para o meio farinha de arroz-ágar (FAA). Avaliação realizada após 5 dias de incubação em BOD a 28 °C no escuro. Os retângulos na parte inferior da figura indicam o tempo de protoplastização. Duas repetições de cada tratamento foram apresentadas.

## DISCUSSÃO

Devido às variações na composição da parede celular, as enzimas hidrolíticas desempenham papel-chave na liberação de protoplastos, agindo diferenciadamente de acordo com a espécie fúngica e o estado fisiológico da cultura. Embora seja grande a lista de enzimas hidrolíticas, até recentemente, grande parte dos protocolos de protoplastização de fungos filamentosos, incluindo *M. grisea*, envolveu o emprego de *Novozym 234* (Talbot et al., 1993; Shi et al., 1995; Vazquez & Figueroa, 1996; Shabana & Charudattan, 1997; Sweigard et al., 1998; Balhadère et al., 1999; Kim et al., 2000). Com a atual indisponibilidade de *Novozym 234*, tornou-se necessário comparar a eficiência de outras enzimas disponíveis comercialmente na protoplastização de *M. grisea*.

Os ensaios de protoplastização do isolado I-21, realizados para avaliar a eficiência dos sistemas enzimáticos, apresentaram variações consideráveis na produção de protoplastos. Números relativamente menores de protoplastos foram obtidos no primeiro ensaio, no qual foi utilizado micélio cultivado por 72 horas. No segundo ensaio utilizou-se micélio com 48 horas de cultivo. Acredita-se que o maior tempo de cultivo foi o responsável pela menor liberação de protoplastos. A idade da cultura micelial influenciou grandemente a obtenção de protoplastos. Culturas fúngicas mais jovens tendem a liberar maior número de protoplastos (Hashiba & Yamada, 1982; Shabana & Charudattan, 1997; Kim et al., 2000). Alterações na parede celular, durante o crescimento do fungo, podem conferir maior resistência à lise (Peberdy et al., 1976). Os resultados sugeriram que, para ensaios de protoplastização, *M. grisea* deve ser cultivado no máximo por 48 horas.

Anteriormente, *Driselase* foi relatada como eficiente na protoplastização de *M. grisea* (Asai et al., 1986; Teraoka et al., 1992). Aqui, esta enzima não promoveu a liberação de protoplastos dos isolados I-21 e I-22. Características inerentes aos isolados, ao estado fisiológico das culturas, ao sistema enzimático e à composição do estabilizador osmótico podem ter contribuído para os resultados divergentes. Asai et al. (1986), por exemplo, utilizaram *M. grisea* cultivado em meio líquido Czapek-extrato de levedura e o estabilizador KCl a 0,6 M (pH = 5,8), sendo os melhores resultados obtidos com a combinação de *Driselase* e *Cellulase Onozuka* R10. Além disso, as preparações enzimáticas certamente pertenciam a lotes diferentes, o que implicou em variação na proporção relativa das enzimas. A produção de protoplastos de *Acremonium chrysogenum* variou com os lotes de *Cellulase* CP (*John and E. Sturge* Ltd.), possivelmente devido à variação no conteúdo protéico entre os três lotes testados (Hamlyn et al., 1981).

No geral, a utilização isolada de *Cellulase Onozuka* R10 promoveu a liberação de número reduzido de protoplastos. O desempenho inferior dessa enzima foi devido à baixa sensibilidade da parede celular de *M. grisea* a celulase, conforme já relatado por Asai et al. (1986).

Individualmente, *Lysing Enzymes* e *Glucanex* foram eficientes na obtenção de protoplastos de *M. grisea*. Contudo, o uso simultâneo de *Lysing Enzymes* ou *Glucanex* e *Cellulase Onozuka* R10 resultou em aumentos expressivos na produção de protoplastos. Muitas vezes, devido à complexidade e diversidade da parede celular das hifas, a protoplastização de fungos filamentosos tem sido facilitada pelo enriquecimento do complexo hidrolítico com outros complexos hidrolíticos (Hamly et al., 1981; Hashiba & Yamada, 1982; Asai et al., 1986;

Teraoka et al., 1992). A eficiência superior das combinações de enzimas é supostamente devido à ação sinérgica dos componentes líticos (Hashiba & Yamada, 1982). É possível que a atuação de um complexo enzimático torne o substrato do outro complexo mais acessível.

A melhor hidrólise dos constituintes da parede celular é alcançada adequando-se a proporção da massa micelial e dos componentes líticos. A composição da parede celular fúngica condicionará a concentração enzimática ou o tempo de digestão para a maior liberação de protoplastos (Anunciação, 1989). A relação micélio:enzima testada variou de 3,3:1 a 20:1, e a maior liberação de protoplastos do I-22 foi obtida com a relação de 5:1. Por sua vez, a melhor digestão do micélio I-21, usando *Glucanex*, foi alcançada com a relação de 6,6:1 (dados não apresentados). Sistemas líticos mais concentrados promoveram redução do número de protoplastos liberados de ambos os isolados I-21 e I-22. Esta redução foi atribuída à atividade enzimática excessiva sobre os protoplastos, o que levou ao rompimento da membrana plasmática.

O estabilizador osmótico é outro componente importante a considerar no estabelecimento do protocolo de protoplastização. O meio estabilizante deve promover condições favoráveis para a atividade enzimática e, principalmente, após a remoção da parede celular, o soluto deve garantir a integridade da célula até a síntese da nova parede. Estabilizadores osmóticos compostos por sorbitol ou sacarose são utilizados frequentemente em trabalhos que envolvem a liberação de protoplastos de *M. grisea* (Mitchell & Dean, 1995; Choi et al., 1997; Sweigard et al., 1998). Na protoplastização de I-22, observou-se que os estabilizadores salinos foram superiores aos estabilizadores compostos por esses açúcares. Efeito

semelhante foi reportado com espécies de *Fusarium* (Vazquez & Figueroa, 1996) e de *Penicillium* (Dias et al., 1997). Comumente, sais inorgânicos são mais eficientes na protoplastização de fungos filamentosos, enquanto açúcares ou açúcares-álcoois são mais apropriados para a liberação de protoplastos de leveduras (Lalithakumari et al. 1996). Contudo, é possível que o caráter mais ácido dos estabilizadores salinos tenha favorecido a protoplastização do I-22, uma vez que o pH é fator crítico para a produção de protoplastos, por influenciar a atividade do complexo enzimático e do estabilizador osmótico (Vega, 1990).

O tamanho dos protoplastos foi influenciado pelo tipo de estabilizador osmótico utilizado. Protoplastos aparentemente maiores foram obtidos quando sais foram empregados na composição dos estabilizadores. Segundo Peberdy & Gibson (1971), indução ou aumento de vacúolos nos protoplastos pode ocorrer principalmente quando a estabilização da protoplastização é promovida por sais.

A produção de protoplastos I-22 foi crescente até a quinta hora de incubação do micélio com o sistema lítico. A partir daí, observou-se redução da produção de protoplastos. Segundo Kim et al. (2000), incubações prolongadas com enzimas líticas podem levar a degeneração dos primeiros protoplastos liberados.

A protoplastização é ferramenta valiosa para o estudo de fungos filamentosos. Mas para tanto, os protoplastos são requeridos em grande número, mínimo de  $10^6$ /mL, e é necessário ainda que exibam boa capacidade de regeneração. A frequência de regeneração é dependente da espécie fúngica, em geral, variando de 0,1 a 50 % (Peberdy, 1991, citado por Santos, 2001), praticamente não atingindo 100 % (Aguilar, 1991). A porcentagem de regeneração dos protoplastos do I-22 foi considerada baixa, máxima aproximada

de 20 %. Teraoka et al. (1992) relataram freqüência de regeneração de protoplastos de *M. grisea*, obtidos com *Driselase* e *Cellulase Onozuka R-10*, que variou de 60 a 70 %. No entanto, as avaliações foram feitas em meio líquido. Possíveis estresses durante o plaqueamento *pour plate* poderiam ter comprometido a regeneração dos protoplastos I-22. Temperatura elevada do TB3 poderia levar ao rompimento dos protoplastos, contribuindo para a baixa freqüência de regeneração. Em *Pisolithus tinctorius*, a semeadura dos protoplastos em meio solidificado, com temperaturas mais baixas, resultou no aumento da porcentagem de regeneração, de 1,5 % para 40 % (Anuniação, 1989).

A porcentagem de regeneração é em alguns casos baixa devido à presença de protoplastos anucleados (Lima et al., 2003). Obviamente, a falta de núcleo reflete em incapacidade de regeneração da parede celular. Em *Crinipellis perniciosus*, agente causal da vassoura-de-bruxa do cacaueteiro, foi constatada a presença de aproximadamente 60 % de protoplastos anucleados (Lima et al., 2003). Embora possa ter contribuído para a baixa freqüência de regeneração dos protoplastos I-22, a freqüência de protoplastos anucleados em *Magnaporthe grisea* parece ser relativamente menor. Dos 516 protoplastos do isolado P2 examinados por Tanaka et al. (1981), 45 (9 %) não apresentaram núcleo.

Existem evidências que a incubação em diferentes sistemas enzimáticos também influencia a capacidade de regeneração dos protoplastos. Protoplastos de *M. grisea* liberados com *Helicase (Pharmindustrie)* não regeneraram a parede celular (Asai et al., 1986). Assim, *Lysing Enzymes-Cellulase Onozuka R10* poderia ter provocado danos na membrana plasmática dos protoplastos I-22, comprometendo a regeneração da parede celular. Segundo Quicley et al. (1987,

citados por Vega, 1990), a presença de alta atividade proteolítica em *Novozym 234* poderia explicar, em parte, as baixas frequências de regeneração dos protoplastos algumas vezes obtidas com este complexo enzimático.

Apesar de não reduzir a produção, a hidrólise enzimática por 4 ou 5 horas gerou protoplastos com menor capacidade de regeneração da parede celular. Em *Suillus granulatus*, a regeneração dos protoplastos foi acentuadamente reduzida quando o tempo de digestão excedeu 1 hora (Dias et al., 1996). Talvez os resíduos de parede celular, presentes nos protoplastos liberados com menor tempo de digestão micelial, facilitam a síntese da nova parede durante a regeneração (Necas, 1971).

O sítio de origem dos protoplastos na hifa parental também poderia explicar a capacidade diferenciada de regeneração. Existe variabilidade quanto ao tamanho e presença de organelas (vacúolos e ribossomos, por exemplo) entre protoplastos liberados de regiões próximas e distais do ápice das hifas (Kim et al., 2000; Gibson & Peberdy, 1972, citados por Queiroz, 1988). É aceitável que protoplastos heterogêneos exibam diferenças quanto ao potencial de regeneração (Kim et al., 2000). Assumindo-se que a parede celular na região apical das hifas, recentemente sintetizada, é mais prontamente degradada e que o potencial para a síntese da parede seja maior nessa região (Kim et al., 2000), foi esperada maior capacidade de regeneração dos protoplastos I-22 liberados com 3 horas de digestão. Incubação adicional do micélio, provavelmente levou a protoplastização de regiões mais velhas da hifa, gerando preparação de protoplastos de qualidade inferior.

Semelhante a outros fungos filamentosos, os protoplastos de *M. grisea* podem apresentar diferentes padrões de regeneração (Tanaka et al., 1981). Normalmente, os protoplastos que seguem o padrão tipo 1, caracterizado pela formação de cadeias irregulares de células semelhantes às de leveduras, não regeneram completamente. Em determinado momento, as células sofrem autólise, sem reverterem à forma micelial normal. Colônias abortadas são comuns em sistemas de transformação de protoplastos, especialmente quando drogas fazem parte do meio seletivo (Tilburn et al., 1983, citados por Kimura et al., 1995). O ensaio de quantificação das colônias abortadas indicou que os protoplastos I-22 não exibiram o padrão de regeneração tipo 1.

Alguns fatores importantes foram analisados visando adequar as condições para a liberação e regeneração de protoplastos de *M. grisea*. Produção eficiente de protoplastos foi alcançada com a combinação *Lysing Enzymes-Cellulase Onozuka* R10 e o estabilizador osmótico à base de sulfato de magnésio. Maior frequência de regeneração foi verificada com os protoplastos obtidos com 3 horas de hidrólise enzimática. Considerando os resultados, o protocolo obtido com a adequação da protoplastização e regeneração poderá ser útil em programas de transformação e mutagênese REMI de *M. grisea*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, M.B.D. **Atividade celulolítica e protoplastização em *Humicola* sp. e *Trichoderma pseudokoningii* var. *rifai*** (Tese de Doutorado). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo. 1991.

ANUNCIACÃO, C.E. **Obtenção e regeneração de protoplastos do fungo micorrízico *Pisolithus tinctorius*** (Dissertação de Mestrado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 1989.

ASAI, T., OKUNO, T. & MATSUURA, K. Isolation and germination type of protoplasts of spores and hyphae of *Pyricularia oryzae*. **Annals of the Phytopathological Society of Japan** 52:843-849. 1986.

BACHMANN, B.J. & BONNER, D.M. Protoplasts from *Neurospora crassa*. **Journal of Bacteriology** 78:550-556. 1959.

BALHADÈRE, P.V., FOSTER, A.J. & TALBOT, N.J. Identification of pathogenicity mutants of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* by insertional mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 12:129-142. 1999.

CHOI, W. & DEAN, R.A. The adenylate cyclase gene *MAC1* of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development. **The Plant Cell** 9:1973-1983. 1997.

DIAS, E.S., ARAÚJO, E.F., GUIMARÃES, W.V. & MUCHOVEJ, R.M.C. Production and regeneration of protoplasts from the mycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 12:625-628. 1996.

DIAS, E.S., ARAÚJO, E.F., GUIMARÃES, W.V., COELHO, J.L.C. & SILVA, D.O. Production and regeneration of *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum* protoplasts. **Revista de Microbiologia** 28:116-120. 1997.

EMERSON, S. & EMERSON, M.R. Production, reproduction and reversion of protoplast-like structures in the osmotic strain of *Neurospora crassa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 44:668-671. 1958.

FARIÑA, J.I., MOLINA, O.E. & FIGUEROA, L.I.C. Formation and regeneration of protoplasts in *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126. **Journal of Applied Microbiology** 96:254-262. 2004.

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

HAMLIN, P.F., BRADSHAW, R.E., MELLON, F.M., SANTIAGO, C.M., WILSON, J.M. & PEBERDY, J.F. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. **Enzyme and Microbial Technology** 3:321-325. 1981.

HASHIBA, T. & YAMADA, M. Formation and purification of protoplasts from *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology** 72:849-853. 1982.

HOSOKAWA, D. & KOZAKA, T. Protoplasts isolation of *Pyricularia oryzae*. **Annals of the Phytopathological Society of Japan** 42:330. 1976. (Abstract).

KIM, B.K., KANG, J.H., JIN, M., KIM, H.W., SHIM, M.J. & CHOI, E.C. Mycelial protoplast isolation and regeneration of *Lentinus lepideus*. **Life Sciences** 66:1359-1367. 2000.

KIMURA, M., IZAWA, K., YONEYAMA, K., ARIE, T., KAMAKURA, T. & YAMAGUCHI, I. A novel transformation system for *Pyricularia oryzae*: adhesion of regenerating fungal protoplasts to collagen-coated dishes. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 59:1177-1180. 1995.

LALITHAKUMARI, D. Protoplasts - a biotechnological tool for plant pathological studies. **Indian Phytopathology** 49:199-212. 1996.

LIMA, J.O., SANTOS, J.K. dos, PEREIRA, J.F., RESENDE, M.L.V. de, ARAÚJO, E.F. de & QUEIROZ, M.V. de. Development of a transformation

system for *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom in cocoa plants. **Current Genetics** 42:236-240. 2003.

MITCHELL, T.K. & DEAN, R.A. The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **The Plant Cell** 7:1869-1878. 1995.

NECAS, O. Cell wall synthesis in yeast protoplasts. **Bacteriological Reviews** 35:149-170. 1971.

OU, S.H. **Rice Diseases**. 2<sup>nd</sup> ed. Commonwealth. Mycological Institute. 1985.

PEBERDY, J.F. & GIBSON, R.K. Regeneration of *Aspergillus nidulans* protoplasts. **Journal of General Microbiology** 69:325-330. 1971.

PEBERDY, J.F. Presidential address: fungi without coats - protoplasts as tools for mycological research. **Mycological Research** 93:1-20. 1989.

PEBERDY, J.F., BUCKLEY, C.E., DALTRY, D.C. & MOORE, P.M. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. **Transactions of the British Mycological Society** 67:23-26. 1976.

QUEIROZ, M.V. de. **O efeito da protoplastização na instabilidade mitótica de *Aspergillus nidulans*** (Dissertação de Mestrado). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo. 1988.

RUIZ-DÍEZ, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. **Journal of Applied Microbiology** 92:189-195. 2002.

SANTOS, J.K. **Obtenção e fusão de protoplastos de *Crinipellis pernicioso*, agente etiológico da vassoura de bruxa no cacauero (*Theobroma cacao* L.)** (Dissertação de Mestrado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 2001.

SCHIESTL, R.H. & PETES, T.D. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 88:7585-7589. 1991.

SHABANA, Y.M. & CHARUDATTAN, R. Preparation and regeneration of mycelial protoplasts of *Alternaria eichhorniae*. **Journal of Phytopathology** 145:335-338. 1997.

SHI, Z., CHRISTIAN, D. & LEUNG, H. Enhanced transformation in *Magnaporthe grisea* by restriction enzyme mediated integration of plasmid DNA. **Phytopathology** 85:329-333. 1995.

SWEIGARD, J.A., CARROLL, A.M., FARRALL, L., CHUMLEY, F.G. & VALENT, B. *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 11:404-412. 1998.

TALBOT, N.J., EBBOLE, D.J. & HAMER, J.E. Identification and characterization of *MPG1*, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **The Plant Cell** 5:1575-1590. 1993.

TANAKA, H., OGASAWARA, N. & KAMIMIYA, S. Protoplasts of *Pyricularia oryzae* P2: preparation and regeneration into hyphal form. **Agricultural and Biological Chemistry** 45:1541-1552. 1981.

TERAOKA, T., SHIMURA, Y., HOSOKAWA, D. & WATANABE, M. Giant protoplasts of *Pyricularia oryzae* Cavara. **Annals of the Phytopathological Society of Japan** 58:726-733. 1992.

VALENT, B., FARRALL, L. & CHUMLEY, F.G. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. **Genetics** 127:87-101. 1991.

VAZQUEZ, F. & FIGUEROA, L.I.C. de. Protoplasts formation in *Fusarium* species. **Biotechnology Techniques** 10:93-98. 1996.

VEGA, M.E. Aspectos genéticos da parameiose via fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Dissertação de Mestrado). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo. 1990.

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® myco-protein fungus, *Fusarium graminearum* A3/5, using the hygromycin B resistance plasmid pAN7-1. **Mycological Research** 101:871-877. 1997.

## ARTIGO 2

# INTEGRAÇÃO DE pAN7-1 NO GENOMA DE *Magnaporthe grisea* MEDIADA POR ENZIMA DE RESTRIÇÃO\*

CARLOS EDUARDO MARCHI<sup>1</sup>, SÉRGIO HERMÍNIO  
BROMMONSCHENKEL<sup>1</sup>, MARISA VIEIRA DE QUEIROZ<sup>2</sup> &  
EDUARDO SEITI GOMIDE MIZUBUTI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, <sup>2</sup>Departamento de Microbiologia, Universidade  
Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, MG, fax: (31) 3899-2629,  
e-mail: cemarchi@alunos.ufv.br

(Aceito para publicação em     /     /     )

Autor para correspondência: Carlos Eduardo Marchi

---

MARCHI, C.E., BROMMONSCHENKEL, S.H., QUEIROZ, M.V. de &  
MIZUBUTI, E.S.G. Integração de pAN7-1 no genoma de *Magnaporthe grisea*  
mediada por enzima de restrição. **Fitopatologia Brasileira.**

## RESUMO

Visando explorar a mutagênese insercional em *M. grisea*, foram avaliadas a transformação de protoplastos e a eficiência da integração de pAN7-1 no genoma

---

\* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Universidade Federal de Viçosa (2003).

do ascomiceto na presença da enzima de restrição *Hind*III. Os protoplastos de *M. grisea* I-22 foram prontamente transformados para a resistência à higromicina. Quando o vetor linearizado com *Hind*III foi usado para transformar o fungo na presença de *Hind*III, a eficiência de transformação foi 1,1 a 8,1 vezes superior ao tratamento sem a adição da endonuclease de restrição. No geral, a melhor concentração de *Hind*III foi 5 unidades/reação de transformação. Tal concentração promoveu a produção média de 332 transformantes/ $\mu\text{g}$  de pAN7-1/ $10^7$  protoplastos. A presença do gene de seleção *HPH* no genoma de 18 indivíduos resistentes à higromicina foi confirmada por PCR.

**Palavras-chave:** *Pyricularia grisea*, *P. oryzae*, brusone, transformação de fungos, integração mediada por enzimas de restrição, REMI.

## ABSTRACT

### INTEGRATION OF pAN7-1 INTO THE *Magnaporthe grisea* GENOME MEDIATED BY RESTRICTION ENZYME

To use insertional mutagenesis in *M. grisea*, we tested the transformation of protoplasts and analyzed the integration efficiency of pAN7-1 into the *M. grisea* genome mediated by the restriction endonuclease *Hind*III. The I-22 protoplasts were readily transformed for hygromycin resistance. When pAN7-1 was linearized with *Hind*III and used to transform fungal protoplasts in the presence of the corresponding enzyme, the transformation efficiency was increased 1.1 to 8.1-fold. The optimal *Hind*III concentration for enhanced transformation corresponded to 5 unit/transformation mix. This concentration led to average

frequency of 332 transformants/ $\mu\text{g}$  de pAN7-1/ $10^7$  protoplasts. The presence of selection gene *HPH* in the 18 transformants genome was confirmed by PCR.

---

Os vetores para a transformação de fungos filamentosos predominantemente se integram no genoma do hospedeiro via eventos de recombinação (Riach & Kinghorn, 1996; Mullins & Kang, 2001). Em geral, integrações de vetores sem homologia com o DNA do fungo ocorrem em sítios ectópicos no genoma, o que permite a utilização dessas moléculas para interromper e marcar fisicamente genes de interesse (Mullins et al., 2001; Recorbet et al., 2003). Esta metodologia, denominada mutagênese insercional mediada por transformação, tem sido amplamente explorada em fungos fitopatogênicos, possibilitando a clonagem de genes de patogenicidade (Talbot & McCafferty, 1995; Idnurm & Howlett, 2001).

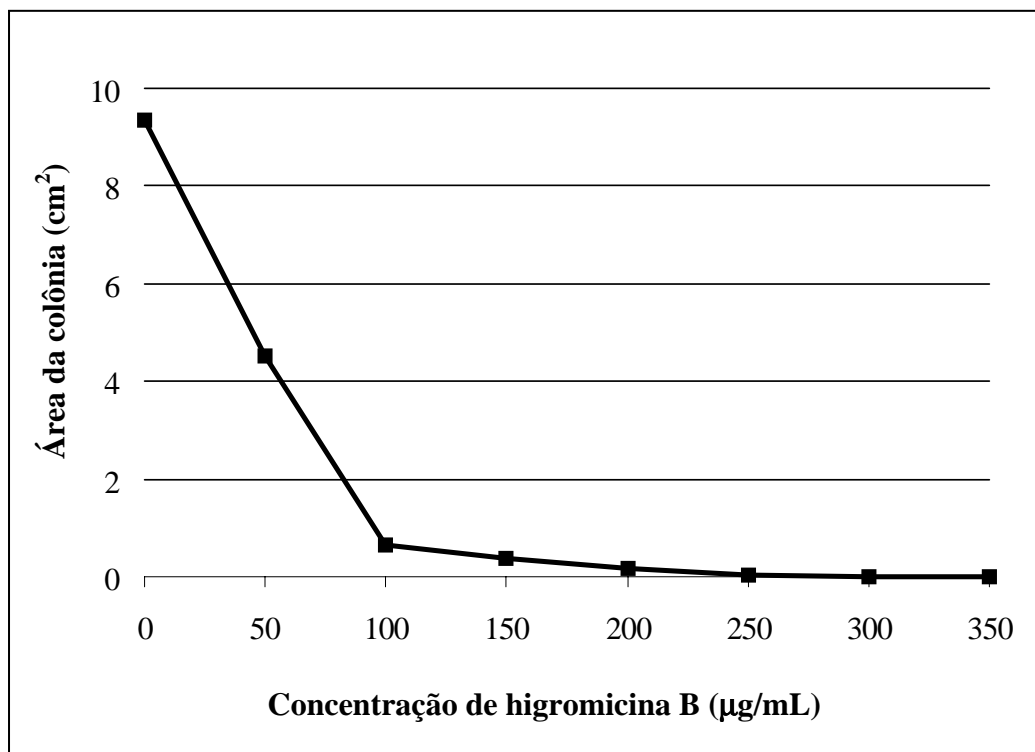
Inicialmente, a mutagênese insercional em *Magnaporthe grisea*, agente causal da brusone do arroz, foi limitada pela baixa eficiência de transformação usualmente alcançada (Valent & Chumley, 1991). Em anos recentes, entretanto, a frequência de transformantes tem sido elevada com o uso de enzimas de restrição para mediar a integração do DNA transformante (Schiestl & Petes, 1991). A técnica REMI (*Restriction Enzyme-Mediated Integration*), como ficou conhecida, elevou a frequência de integração do vetor pAN7-2 no genoma de *M. grisea*, acima de 10 vezes, quando as enzimas de restrição *Bam*HI ou *Bg*III foram utilizadas (Shi et al., 1995). Aumento menor na frequência de transformantes foi verificado quando *Hind*III mediu a integração do vetor (Shi et al., 1995).

As características de REMI, como transformação eficiente e predominância de eventos simples de integração, têm estimulado o uso desta técnica na investigação de genes envolvidos na patogenicidade de *M. grisea* (Shi et al., 1995; Sweigard et al., 1998; Balhadère et al., 1999; Fujimoto et al., 2002). Contudo, mutantes REMI com patogenicidade alterada não têm sido obtidos com pAN7-1, vetor amplamente empregado para a transformação de fungos filamentosos. Tampouco foram encontrados relatos do efeito de enzimas de restrição na integração de pAN7-1 no genoma do ascomiceto. Em *Mycosphaerella zeae-maydis*, por exemplo, a eficiência de REMI variou com o tipo de vetor empregado, e foi insatisfatória com pAN7-1 (Yun et al., 1998).

Como primeiro passo para a implantação de programa de mutagênese insercional, recentemente, o protocolo de protoplastização de *M. grisea* foi adequado (Marchi et al., 2003, Artigo 1). Os objetivos deste trabalho foram verificar a possibilidade de transformar os protoplastos obtidos segundo esse protocolo e a frequência de integração de pAN7-1 no genoma do fungo mediada pela endonuclease de restrição *HindIII*.

O plasmídeo pAN7-1 contém o gene *HPH*, que codifica para a resistência à higromicina, como marca de seleção (Punt et al., 1987). Por ser possível a ocorrência de isolados de *M. grisea* exibindo resistência ao antibiótico (Leung et al., 1995), a inibição do crescimento de *M. grisea* I-22, cedido pelo Laboratório de Fitopatologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, foi testada em meio farinha de arroz-ágar contendo higromicina em concentrações variadas. O crescimento micelial foi totalmente inibido em concentrações superiores a 250 µg/mL (Figura 1). Assim, a concentração de 300 µg/mL de

higromicina foi adotada para os ensaios de transformação. Em geral, a concentração do antibiótico usada para a seleção de transformantes de *M. grisea* tem correspondido a 200 - 300  $\mu\text{g/mL}$  (Shi et al., 1995; Rho et al., 2001; Viaud et al., 2002; Soanes et al., 2002). A manutenção dos transformantes foi feita em concentração menor, 100  $\mu\text{g}$  de higromicina/mL.



**FIGURA 1.** Sensibilidade de *Magnaporthe grisea* I-22 à higromicina B. O fungo foi cultivado em meio farinha de arroz-ágar contendo sete concentrações do antibiótico. Os tratamentos foram aplicados em seis repetições (placas de Petri), as quais foram mantidas em BOD a 30 °C. A área da colônia foi mensurada seis dias após a repicagem.

Determinada a potencialidade do sistema de seleção, o isolado I-22 foi submetido à protoplastização e, subseqüentemente, ao processo de transformação. Aproximadamente 100 mg de micélio úmido I-22 foram misturados a 3 mL de MgSO<sub>4</sub> a 1,2 M / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 0,01 M (pH = 5,8) contendo 10 mg de *Lysing Enzymes* (Sigma Chemicals Co.) e 10 mg de *Cellulase Onozuka R10* (Yakult Biochemical Co. Ltd.). A mistura foi agitada a 100 rpm por 3 horas, a 28 - 30 °C. O sistema de duas fases MgSO<sub>4</sub> a 1,2 M e sorbitol a 0,6 M (Marchi et al., 2003, Artigo 1) foi utilizado para a purificação dos protoplastos. Estes foram lavados e ressuspensos em tampão STC (sorbitol a 1 M, Tris-HCl a 0,05 M, CaCl<sub>2</sub> a 0,05 M, pH = 8,0) para a concentração final de 10<sup>7</sup> protoplastos/mL. A transformação foi conduzida em microtubo de 1,5 mL, onde 1 µg de pAN7-1 (circular ou linear), suspenso em 150 µL de STC (sacarose 20 %, Tris-HCl a 0,05 M, CaCl<sub>2</sub> a 0,05 M, pH = 8,0), foi misturado a 100 µL da suspensão de protoplastos. Na transformação REMI, 0 a 50 unidades (U) de *HindIII* foram simultaneamente adicionadas com o pAN7-1-*HindIII*. A mistura foi homogeneizada e mantida em gelo por 20 minutos. Após a adição de 1 mL de solução de polietileno glicol (PEG 3350 60 %, CaCl<sub>2</sub> a 0,025 M, Tris-HCl a 0,025 M, pH = 7,5) pré-aquecida a 37 °C, efetuou-se nova incubação em gelo por 20 minutos. O volume foi transferido para tubo corex 30 mL contendo 12 mL de meio de regeneração TB3 (sacarose 20 %, extrato de levedura 0,3 %, caseína hidrolisada 0,3 %) e mantido a 24 °C sob agitação (100 rpm) por 1 hora. Ao final, dividiu-se o volume entre placas de Petri, onde se verteu TB3 contendo 2 % de

ágar e 300 µg de higromicina/mL. Em seguida, as placas foram mantidas em incubadora a 30 °C.

Em todos os ensaios de transformação, os protoplastos obtidos segundo o protocolo de Marchi et al. (2003, Artigo 1) foram prontamente transformados para a resistência a higromicina (Tabela 1). As primeiras colônias resistentes ao antibiótico foram detectadas após o quarto e quinto dia de incubação.

**TABELA 1.** Número de transformantes de *Magnaporthe grisea*, isolado I-22, obtido com transformação convencional ou mediada por *HindIII*, utilizando o vetor pAN7-1.

Ensaio	C <sup>a</sup>	LI <sup>b</sup>	Unidades de <i>HindIII</i> adicionadas à reação <sup>c</sup>						
			0	5	10	20	30	40	50
A	13,3 <sup>d</sup>	120,0	713,3	nd <sup>e</sup>	nd	nd	nd	nd	133,3
B	3,3	11,0	72,5	85,7	89,0	nd	nd	nd	nd
C	34,7	55,4	108,9	nd	46,9	nd	nd	nd	nd
D	51,8	696,5	418,8	677,6	776,5	393,7	nd	nd	nd
E	14,1	35,9	183,7	232,6	72,8	68,5	44,6	33,7	59,8
<b>Média</b>	<b>23,4</b>	<b>183,8</b>	<b>299,4</b>	<b>332,0</b>	<b>246,3</b>	<b>231,1</b>	<b>44,6</b>	<b>33,7</b>	<b>96,6</b>

<sup>a</sup> pAN7-1 circular.

<sup>b</sup> pAN7-1-*HindIII* com inativação da enzima usada para a linearização (70 °C/15').

<sup>c</sup> pAN7-1-*HindIII* sem inativação da enzima usada para a linearização.

<sup>d</sup> Número de transformantes/µg de DNA/10<sup>7</sup> protoplastos.

<sup>e</sup> Não determinado.

A análise dos cinco ensaios de transformação permitiu constatar que o número de colônias resistentes à higromicina variou consideravelmente dentro dos tratamentos (Tabela 1). Variações na frequência de transformantes são comuns entre ensaios de transformação, poucas vezes conseguido-se reprodutibilidade. Analisando a Tabela 1, notou-se que, no geral, todos os tratamentos do ensaio B resultaram em menor produção de transformantes. Isto sugeriu que diferenças qualitativas e/ou quantitativas nas preparações de protoplastos poderiam ter contribuído para as oscilações na eficiência de transformação dentro dos tratamentos. Não foi possível afirmar com precisão que foram utilizadas células com a mesma condição biológica para a protoplastização, nem tampouco que foi utilizado o mesmo número de protoplastos na transformação. Nos procedimentos REMI, dentro de cada tratamento, também é possível que tenha ocorrido variações na quantidade de enzima utilizada nos ensaios de transformação. Além disso, variações na quantidade de DNA transformante poderiam ter colaborado para a frequência diferenciada de transformantes.

No geral, a linearização do vetor elevou a frequência de transformantes (Tabela 1). O pAN7-1 na forma linear (LI) foi cerca de oito vezes mais eficiente na transformação de *M. grisea* I-22 do que na forma circular (C). Embora o mecanismo não esteja esclarecido, o aumento da eficiência de transformação pela linearização do vetor tem sido demonstrado em outros sistemas como *Colletotrichum lindemuthianum* (Redman & Rodriguez, 1994), *Cochliobolus heterostrophus* (Lu et al., 1994), *Aspergillus oryzae* (Yaver et al., 1999) e *Penicillium griseoroseum* (Soares, 2002). Redman & Rodriguez (1994) acreditam que o vetor linearizado possa ser mais estável ou ter acesso facilitado ao núcleo.

Não ignorando a condição física do vetor, é provável que o tratamento térmico empregado em LI tenha promovido inativação parcial da enzima utilizada para a linearizar pAN7-1. Desta forma, o aumento da eficiência de transformação seria reflexo da atividade enzimática residual. Shi et al. (1995) observaram fenômeno semelhante ao transformarem o isolado Guy 11 de *M. grisea* com pAN7-2. Após a inativação total da enzima, esses autores obtiveram eficiência de transformação com o vetor linear similar a observada com o vetor circular, demonstrando a importância da atividade enzimática residual.

O efeito positivo da atividade enzimática residual na transformação de *M. grisea* I-22 foi mais evidente no tratamento onde não houve inativação térmica (Tabela 1). Nos ensaios A e B, mesmo sem a adição de *HindIII* na reação de transformação, houveram aumentos aproximados de seis e sete vezes na frequência de transformantes em relação a LI, respectivamente. Desconsiderando o ensaio D, em média esse aumento correspondeu a 4,9 vezes. Em *P. griseoroseum* a atividade enzimática residual, *XbaI*, também afetou positivamente a eficiência de transformação (Soares, 2002).

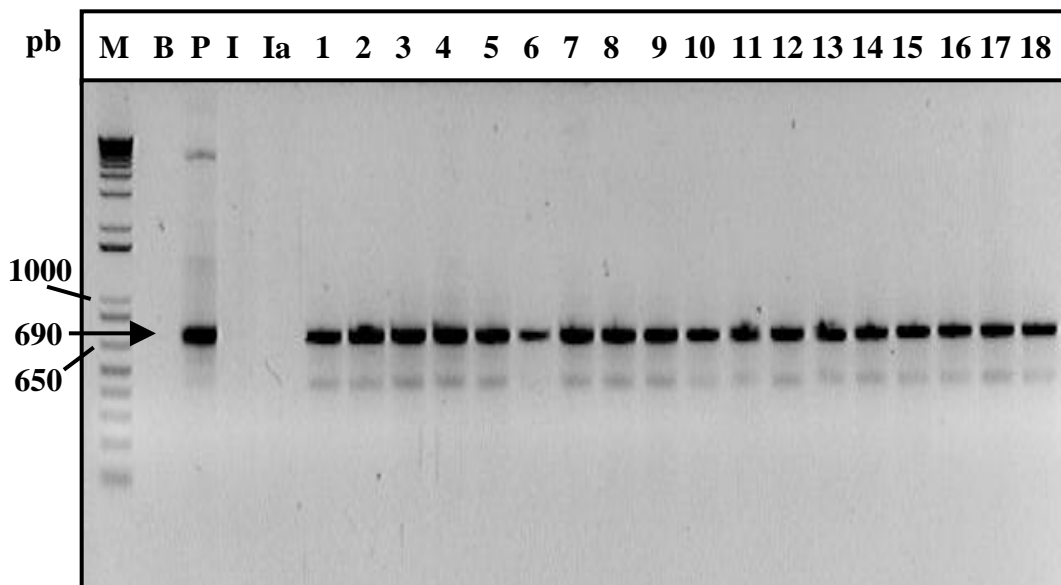
A frequência de transformante de I-22 foi influenciada pela adição de *HindIII* na mistura de transformação. Quando unidades de *HindIII* foram adicionadas à reação de transformação do fungo com pAN7-1-*HindIII* observou-se frequência de transformantes 1,1 a 8 vezes superior ao LI (Tabela 1). No geral, a adição de 5 U de *HindIII* por reação de transformação resultou na obtenção de maior número de transformantes, com eficiência de transformação cerca de duas vezes superior ao tratamento controle (LI). É possível que a concentração ótima de *HindIII* esteja entre 0 e 5 U/reação.

No ensaio A, a adição de 50 U de *HindIII* na reação promoveu pequeno aumento na produção de transformantes em relação ao tratamento sem adição de enzima (Tabela 1). O último ensaio reproduziu melhor a tendência de declínio na eficiência de transformação quando concentrações elevadas de enzima foram utilizadas. No geral, a adição de mais de cinco unidades de *HindIII* na reação de transformação reduziu o número de transformantes. Trinta ou quarenta unidades de enzima provocaram queda drástica do número de transformantes (Tabela 1). O efeito negativo de altas concentrações enzimáticas na frequência de transformantes foi anteriormente verificado em *M. grisea* (Shi et al., 1995). Quando 600 U de *HindIII* ou *BamHI*, por mL de reação, foram utilizadas para mediar a transformação de isolado Guy 11 com pAN7-2, a recuperação de transformantes foi menor do que a obtida com o vetor circular (Shi et al., 1995). Respostas semelhantes têm sido obtidas com outros fungos fitopatogênicos (Akamatsu et al., 1997; Linnemannstöns et al., 1999). Por exemplo, a reação de transformação de *Alternaria alternata* patótipo tomate com mais de 20 U de *HindIII* ou *XbaI* promoveu redução significativa do número de transformantes (Akamatsu et al., 1997).

É possível que altas concentrações de enzimas produzam danos genéticos irreversíveis que levam à inviabilidade celular (Riggle & Kumamoto, 1998). Contudo, Shi et al. (1995) não evidenciaram nenhum decréscimo na viabilidade dos protoplastos de *M. grisea* quando altas concentrações de enzimas de restrição foram usadas em procedimentos de transformação sem a presença do vetor, sugerindo que este fungo é capaz de reparar as quebras duplas do DNA causadas pela ação da enzima. Por outro lado, é possível que a clivagem enzimática

excessiva ocorra somente quando o DNA transformante está presente (Thon et al., 2000). Além disso, tem sido sugerido que a presença do vetor de transformação é necessária para o acesso da enzima de restrição ao interior do núcleo (Maier & Schäfer, 1999, citados por Thon et al., 2000). Outra possibilidade é a constante atividade da enzima nos sítios de reconhecimento, decrescendo a frequência de integração do vetor, e conseqüentemente a eficiência de transformação.

Dezoito indivíduos I-22 resistentes ao antibiótico higromicina, amostrados aleatoriamente, foram examinados para a presença do gene de seleção *HPH*. Após a extração, o DNA total foi submetido à técnica de PCR utilizando os oligonucleotídeos específicos *hph1* (CAGCGAGAGCCTGACCTATTGC) e *hph2* (GCCATCGGTCCAGACGGCCGCGC). O programa de amplificação consistiu de 1 ciclo de desnaturação por 2 minutos a 95 °C, seguido por 30 ciclos com 1 minuto de desnaturação (92 °C), 1 minuto para o anelamento dos oligonucleotídeos a 60 °C, e 90 segundos de polimerização a 72 °C. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1,4 %. O fragmento esperado de 690 pb, correspondente à região estrutural do gene de seleção *HPH*, foi amplificado em todos os 18 indivíduos, confirmando a condição de transformantes (Figura 2).



**FIGURA 2.** Perfil eletroforético dos amplicons de transformantes de *Magnaporthe grisea* I-22 (**1** a **18**), utilizando os oligonucleotídeos hph1 e hph2. **M:** marcador de tamanho 1 Kb *Plus* (Invitrogen®); **I** e **Ia:** *M. grisea* I-22 e I-21, respectivamente; **B:** reação controle, contendo todos os reagentes, exceto o DNA; **P:** pAN7-1. Os fragmentos de 1000 e 650 pares de base (pb) do marcador estão indicados na margem esquerda. A seta indica os amplicons de 690 pb esperados.

A presença de *HindIII* favoreceu a transformação de *M. grisea* I-22 com pAN7-1. Contudo, antes de pAN7-1 ser utilizado efetivamente como marcador físico na mutagênese REMI será necessário analisar o padrão de integração no genoma do ascomiceto, bem como a aleatoriedade desses eventos. A inserção de uma única cópia do vetor e a restauração das seqüências reconhecidas pela enzima

de restrição facilitam a recuperação dos genes de patogenicidade inativados. A aleatoriedade dos eventos de integração, por sua vez, aumenta a possibilidade de identificação dos genes de interesse. Análises de hibridização de DNA de transformantes *M. grisea* I-22 estão sendo conduzidas para determinar a frequência desses eventos.

A eficiência da transformação REMI em *M. grisea* envolvendo pAN7-2 foi dependente do tipo de enzima de restrição (Shi et al., 1995). Portanto, outras enzimas de restrição deverão ser analisadas no sistema *M. grisea*:pAN7-1. Além do mais, a alternância de enzimas no programa de mutagênese REMI é interessante porque garante maior aleatoriedade nas integrações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAMATSU, H., ITOH, Y., KODAMA, M., OTANI, H. & KOHMOTO, K. AAL-toxin-deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. **Phytopathology** 87:967-972. 1997.

BALHADÈRE, P.V., FOSTER, A.J. & TALBOT, N.J. Identification of pathogenicity mutants of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* by insertional mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 12:129-142. 1999.

FUJIMOTO, D., SHI, Y., CHRISTIAN, D., MANTANGHIHAN, J.B. & LEUNG, H. Tagging quantitative loci controlling pathogenicity in *Magnaporthe*

*grisea* by insertional mutagenesis. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 61:77-88. 2002.

IDNURM, A. & HOWLETT, B.J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. **Molecular Plant Pathology** 2:241-255. 2001.

LEUNG, H., LOOMIS, P. & PALL, M.L. Transformation of *Magnaporthe grisea* to phosphinothricin resistance using the bar gene from *Streptomyces hygroscopicus*. **Fungal Genetics Newsletter** 42:41-43. 1995.

LINNEMANNSTÖNS, P., VOB, T., HEDDEN, P., GASKIN, P. & TUDZYNSKI, B. Deletions in the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi* by restriction enzyme-mediated integration and conventional transformation-mediated mutagenesis. **Applied and Environmental Microbiology** 65:2558-2564. 1999.

LU, S., LYNGHOLM, L., YANG, G., BRONSON, C., YODER, O.C. & TURGEON, B.G. Tagged mutations at the *Tox1* locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 91:12649-12653. 1994.

MULLINS, E.D. & KANG, S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. **Cellular and Molecular Life Sciences** 58:2043-2052. 2001.

MULLINS, E.D., CHEN, X., ROMAINE, P., RAINA, R., GEISER, D.M. & KANG, S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. **Phytopathology** 91:173-180. 2001.

PUNT, P.J., OLIVER, R.P., DINGEMANSE, M.A., POUWELS, P.H. & VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. **Gene** 56:117-124. 1987.

RECORBET, G., STEINBERG, C., OLIVAIN, C., EDEL, V., TROUVELOT, S., DUMAS-GAUDOT, E., GIANINAZZI, S. & ALABOUVETTE, C. Wanted: pathogenesis-related marker molecules for *Fusarium oxysporum*. **New Phytologist** 159:73-92. 2003.

REDMAN, R.S. & RODRIGUEZ, R.J. Factors affecting the efficient transformation of *Colletotrichum* species. **Experimental Mycology** 18:230-246. 1994.

RHO, H.S., KANG, S. & LEE, Y.H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. **Molecules and Cells** 12: 407-411. 2001.

RIACH, M.B.R. & KINGHORN, J.R. Genetic transformation and vector developments in filamentous fungi. In: BOS, C. J. (Ed.) **Fungal genetics: principles and practice**. New York. Marcel Dekker Inc. 1996. pp. 209-233.

RIGGLE, P.J. & KUMAMOTO, C.A. Genetic analysis in fungi using restriction-enzyme-mediated integration. **Current Opinion in Microbiology** 1:395-399. 1998.

SCHIESTL, R.H. & PETES, T.D. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 88:7585-7589. 1991.

SHI, Z., CHRISTIAN, D. & LEUNG, H. Enhanced transformation in *Magnaporthe grisea* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. **Phytopathology** 85:329-333. 1995.

SOANES, D.M., KERSHAW, M.J., COOLEY, R.N. & TALBOT, N.J. Regulation of the *MPG1* gene in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 15:1253-1267. 2002.

SOARES, M.A. **Transformação e mutagênese insercional em *Penicillium griseoroseum* por REMI (integração mediada por enzima de restrição)** (Dissertação de Mestrado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 2002.

SWEIGARD, J.A., CARROLL, A.M., FARRALL, L., CHUMLEY, F.G. & VALENT, B. *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 11:404-412. 1998.

TALBOT, N.J. & McCAFFERTY, H.R.K. Identification and characterisation of pathogenicity genes from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Cahiers Options Méditerranéennes** 15:137-142. 1997.

THON, M.R., NUCKLES, E.M. & VAILLANCOURT, L.J. Restriction enzyme-mediated integration used to produce pathogenicity mutants of *Colletotrichum graminicola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 13:1356-1365. 2000.

VALENT, B. & CHUMLEY, F.G. Molecular genetic analysis of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Phytopathology** 29:443-467. 1991.

VIAUD, M.C., BALHADÈRE, P.V. & TALBOT, N.J. A *Magnaporthe grisea* cyclophilin acts as a virulence determinant during plant infection. **The Plant Cell** 14:917-930. 2002.

YAVER, D.S., LAMSA, M., MUNDS, R., BROWN, S.H., OTANI, S., FRANSSEN, L., JOHNSTONE, J.A. & BRODY, H. Using DNA-tagged

mutagenesis to improve heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*.  
**Fungal Genetics and Biology** 29:28-37. 2000.

YUN, S.H., TURGEON, B.G. & YODER, O.C. REMI-induced mutants of  
*Mycosphaerella zeae-maydis* lacking the polyketide PM-toxin are deficient in  
pathogenesis to corn. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 52:53-66.  
1998.

### ARTIGO 3

## MUTANTES INSERCIONAIS DE *Magnaporthe grisea* COM PATOGENICIDADE ALTERADA EM ARROZ\*

CARLOS EDUARDO MARCHI<sup>1</sup>, SÉRGIO HERMÍNIO  
BROMMONSCHENKEL<sup>1</sup>, MARISA VIEIRA DE QUEIROZ<sup>2</sup>, MÍRIAN DE  
FREITAS BORGES<sup>3</sup> & EDUARDO SEITI G. MIZUBUTI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, <sup>2</sup>Departamento de Microbiologia, Universidade  
Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, MG, fax: (31) 3899-2629,  
e-mail: cemarchi@alunos.ufv.br; <sup>3</sup>Delegacia Federal de Agricultura/MS,  
CEP 79002-182, Campo Grande, MS.

(Aceito para publicação em     /     /     )

Autor para correspondência: Carlos Eduardo Marchi

---

MARCHI, C.E., BROMMONSCHENKEL, S.H., QUEIROZ, M.V. de, BORGES,  
M. de F. & MIZUBUTI, E.S.G. Mutantes insercionais de *Magnaporthe grisea*  
com patogenicidade alterada em arroz. **Fitopatologia Brasileira.**

### RESUMO

Transformantes de *Magnaporthe grisea* resistentes à higromicina, obtidos  
principalmente por procedimentos REMI, foram avaliados quanto à habilidade em

---

\* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Universidade Federal de Viçosa (2003).

causar doença em arroz. A partir de testes de patogenicidade envolvendo 125 transformantes foi possível selecionar cinco mutantes com alterações consistentes na patogênese. Dois desses mutantes, T108 e T93, causaram poucas lesões em folhas de arroz, enquanto o mutante T251 não foi patogênico. A alteração na patogenicidade de T108 foi acompanhada pela menor capacidade de desenvolvimento *in vitro*. Quando inoculado em plantas de arroz, o mutante T41 apresentou agressividade reduzida, caracterizada por lesões arredondadas de tamanho limitado. Por sua vez, o período de incubação para o mutante T72 foi maior que o do isolado selvagem. Além disso, atrasos na germinação de conídios e na formação de apressórios foram detectados em T72. Os mutantes T93 e T251 apresentam fenótipos semelhantes quando em cultura, caracterizados pela pigmentação marrom. Análises *Southern blots* de quatro mutantes indicaram que em 50 % dos casos, T108 e T251, apenas uma cópia de pAN7-1 se integrou em um único sítio no genoma. No mutante T251 ocorreu evento REMI propriamente dito. Os mutantes T41 e T93 apresentaram padrões de integração mais complexos.

**Palavras-chave:** *Pyricularia grisea*, *P. oryzae*, brusone, mutagênese insercional, integração mediada por enzima de restrição, REMI, genes de patogenicidade.

## ABSTRACT

### INSERTIONAL MUTANTS OF *Magnaporthe grisea* IMPAIRED IN PATHOGENICITY TO RICE

Hygromycin-resistant transformants of *Magnaporthe grisea*, generated mainly by REMI, were screened for the ability to infect rice plants. Out of 125

transformants five showed changes in pathogenicity. The T108 and T93 mutants caused fewer lesions in rice leaves, while the T251 mutant was non-pathogenic. The pathogenicity alteration in T108 was accompanied by a reduced development in culture. The T41 mutant caused small and limited round lesions. The incubation period of the T72 mutant was longer than of wild type. Furthermore, late germination and appressorium formation was detected in the T72 mutant. The T93 and T251 mutants had similar phenotypes, characterized by a brown-pigmented colony. Four mutants (T41, T93, T108 and T251) were examined by Southern blots, and T108 and T251 contained one copy of the vector integrated at a single site in the genome. REMI event occurred in the T251 mutant. More complex integration events were observed in the T41 and T93 mutants.

---

## INTRODUÇÃO

A brusone, causada pelo fungo *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr. (anamorfo: *Pyricularia grisea*, *P. oryzae*), é a doença mais importante da cultura do arroz no Brasil, constituindo um dos fatores limitantes para a produtividade (Prabhu et al., 1999).

A compreensão mais detalhada dos mecanismos genéticos que governam a patogenicidade de *M. grisea* em arroz pode auxiliar no delineamento de novas e eficientes estratégias de manejo da doença. Alguns componentes importantes da patogênese estão identificados, principalmente aqueles envolvidos em eventos pré-penetração (Talbot, 1995; Howard & Valent, 1996; Hamer & Talbot, 1998;

Idnurm & Howlett, 2001). Porém, pouco se conhece sobre os mecanismos que regulam o crescimento do fungo no interior dos tecidos e os demais estágios finais da infecção da planta.

Mutagênese insercional mediada por transformação tem sido estratégia adotada para a identificação de genes de patogenicidade de *M. grisea* (Shi & Leung, 1995; Sweigard et al., 1998; Lau & Hamer, 1998; Urban et al., 1999; Balhadère et al., 1999; Clergeot et al., 2001; Fujimoto et al., 2002). A técnica conhecida como integração mediada por enzima de restrição ou REMI, *Restriction Enzyme-Mediated Integration* (Schiestl & Petes, 1991), merece destaque em função da eficiência de transformação e da predominância de integrações simples (Shi et al., 1995; Shi & Leung, 1995; Sweigard et al., 1998; Balhadère et al., 1999; Fujimoto et al., 2002).

A técnica REMI envolve a transformação do organismo com o DNA transformante linear na presença de enzima de restrição, geralmente a mesma enzima utilizada para a linearização do vetor (Sweigard, 1996). Como resultado, são formadas extremidades coesivas compatíveis entre o vetor e o DNA genômico, o que catalisa o evento de integração.

A utilização de REMI tem possibilitado a marcação física e clonagem de genes de *M. grisea* que exercem papel na produção de estruturas de infecção, respostas ao ambiente e sinalização celular (Idnurm & Howlett, 2001). Exemplos dessas classes de genes incluem *PTH11* (que codifica para proteína transmembrana, envolvida no reconhecimento de superfície e formação de apressório), *PTH3* (com homologia a imidazol glicerol fosfato desidratase de *Saccharomyces cerevisiae*, envolvido na síntese de histidina), *MET1* (envolvido

na biossíntese de metionina), *PTH9* (que expressa uma trehalase neutra, a qual em outros fungos está envolvida na proteção contra estresse e germinação de esporos) e *PTH4* (previamente identificado como *CPKA*, que codifica para proteína quinase dependente de cAMP, envolvida na função do apressório). Genes que desempenham função na conidiogênese, os genes *CON*, também têm sido relatados (Shi & Leung, 1995; Sweigard et al., 1998; Balhadère et al., 1999).

Recentemente, visando a identificação de novos genes que atuam papel na patogenicidade de *M. grisea* em arroz, a mutagênese REMI foi adequada para o emprego do vetor pAN7-1 e a enzima *HindIII* (Marchi et al., 2003, Artigo 2). Tal esforço resultou na criação de uma coleção de transformantes insercionais, principalmente gerados por REMI. A caracterização de cinco mutantes de *M. grisea* com alterações na patogenicidade em arroz foi o objetivo deste trabalho.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ***Magnaporthe grisea* e condições de cultivo**

Foi utilizado o isolado I-22 de *M. grisea*, patogênico a plantas de arroz, gentilmente cedido pelo Laboratório de Fitopatologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

O fungo foi cultivado em meio de farinha de arroz-ágar (FAA - 20 g de farinha de arroz com casca, 5 g de sacarose, 15 g de ágar, 1 L de água destilada) por 5 a 7 dias, em BOD a 28 °C no escuro. Para a preservação do fungo em longo

prazo, pedaços (4 cm<sup>2</sup>) de papel manteiga colonizados pelo micélio foram mantidos a - 80 °C (Valent et al., 1991).

A produção de conídios foi obtida após submeter *M. grisea* a condições de estresse. Para isso, removeu-se o micélio superficial de culturas do fungo com 7 a 10 dias de idade, com pincel e água destilada. Após enxágüe em água destilada, as placas de cultura foram cobertas com filme plástico transparente perfurado e mantidas em temperatura ambiente por 4 a 6 dias, com fotoperíodo de 12 horas.

### **Produção de protoplastos**

Protoplastos do fungo foram obtidos misturando-se 100 mg de micélio úmido a 3 mL de estabilizador osmótico MgSO<sub>4</sub> a 1,2 M / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 0,01 M (pH = 5,8) contendo 10 mg de *Lysing Enzymes* (Sigma Chemicals Co.) e 10 mg de *Cellulase Onozuka R10* (Yakult Biochemical Co. Ltd.). Após 3 horas de agitação a 100 rpm, a 30 °C, os protoplastos foram purificados por meio de sistema de duas fases líquidas (Marchi et al., 2003, Artigo 1). Brevemente, os protoplastos liberados no estabilizador a base de sulfato de magnésio foram colocados em tubo corex (15 mL) e, suavemente, adicionaram-se 4 mL de estabilizador ST (sorbitol a 0,6 M, Tris-HCl a 0,1 M, pH = 8,0). Após centrifugação em rotor de caçamba (3000 rpm por 5 minutos), os protoplastos se agregaram na interface dos estabilizadores osmóticos. Com pipeta, os protoplastos foram transferidos para outro tubo corex e 2 mL de estabilizador STC (sorbitol a 1 M, Tris-HCl a 0,05 M, CaCl<sub>2</sub> a 0,05 M, pH = 8,0) foram adicionados. Os protoplastos foram precipitados por centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos e,

em seguida, lavados três vezes em STC. Os protoplastos foram ressuspensos em STC para a concentração final de  $10^7$ /mL.

### **Transformação fúngica**

Para a transformação de *M. grisea*, 100  $\mu$ L de suspensão  $10^7$  protoplastos/mL foram transferidos para microtubo de 1,5 mL contendo 150  $\mu$ L de STC (sacarose 20 %, Tris-HCl a 0,05 M,  $\text{CaCl}_2$  a 0,05 M, pH = 8,0) e 1  $\mu$ g de pAN7-1, na forma circular ou linear. No procedimento REMI, 0 a 50 unidades (U) de *Hind*III foram simultaneamente adicionadas com o plasmídeo previamente linearizado com *Hind*III. A mistura foi homogeneizada e mantida em gelo por 20 minutos. Após a adição de 1 mL de solução de polietileno glicol (PEG 3350 60 %,  $\text{CaCl}_2$  a 0,025 M, Tris-HCl a 0,025 M, pH = 7,5) pré-aquecida a 37 °C, efetuou-se nova incubação em gelo por 20 minutos. A mistura foi transferida para tubo corex 30 mL contendo 12 mL de meio de regeneração TB3 (sacarose 20 %, extrato de levedura 0,3 %, caseína hidrolisada 0,3 %) e agitada a 100 rpm por 1 hora, a 24 °C. Ao final, o volume do tubo foi semeado em quatro placas de Petri pela técnica do cultivo em mistura (*pour plate*), utilizando-se TB3 acrescido de 2 % de ágar e higromicina (300  $\mu$ g/mL). Posteriormente, as placas foram mantidas em incubadora a 28 °C. As colônias transformantes geradas foram transferidas para placas de Petri com FAA contendo 100  $\mu$ g de higromicina/mL, e mantidas em incubadora a 28 °C.

### **Estabilidade mitótica**

Os mutantes selecionados foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA (200 g de batata, 20 g de dextrose, 20 g de ágar, 1 L de água destilada) e permitidos a crescer por 7 dias a 28 °C. Concluído o tempo, foram transferidos para outra placa contendo BDA, e assim sucessivamente por cinco gerações. Após as transferências seriadas, testou-se a capacidade de crescimento dos mutantes em BDA contendo 200 µg de higromicina/mL. Cada mutante foi repicado para quatro placas de Petri por geração.

### **Extração de DNA**

O isolado selvagem I-22 e os mutantes para a patogenicidade foram cultivados em meio completo (0,5 % de sacarose, 0,3 % de extrato de levedura, 0,3 % de caseína hidrolisada), sob agitação (130 - 150 rpm) durante 10 - 14 dias a 28 °C, no escuro. As extrações de DNA foram realizadas conforme Scheuermann (2002). Brevemente, o micélio, uma vez seco e macerado em nitrogênio líquido, foi transferido para tubo de microcentrífuga e misturado com 750 µL de tampão de extração (CTAB a 55 mM, Tris a 100 mM, pH 8,0, EDTA a 10 mM, NaCl a 0,7 M) e 15 µL de mercaptoetanol. Após incubação a 65 °C por 30 minutos, foram acrescentados 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 14.000 rpm. A fase aquosa superior foi transferida para outro microtubo, adicionados 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), e a mistura foi centrifugada novamente. A fase líquida foi transferida para microtubo contendo 750 µL de isopropanol (- 20 °C), incubada

em gelo por 10 minutos e centrifugada. Em seguida, o precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70 % (- 20 °C), seco e ressuspendido em 50 µL de tampão TE (Tris a 10 mM, pH 8,0, EDTA a 1 mM). A concentração do DNA foi estimada por comparação com padrões de DNA. As amostras de DNA foram armazenadas a - 20 °C.

### ***Polymerase Chain Reaction (PCR)***

Transformantes de *M. grisea* I-22 que apresentaram alterações na patogenicidade em arroz foram examinados para a presença do gene de seleção *HPH*. Após a extração, o DNA total foi submetido à técnica de PCR utilizando os oligonucleotídeos específicos hph1 (CAGCGAGAGCCTGACCTATTGC) e hph2 (GCCATCGGTCCAGACGGCCGCGC). O programa de amplificação consistiu de 1 ciclo de desnaturação de 2 minutos a 95 °C, seguido por 30 ciclos com 1 minuto de desnaturação (92 °C), 60 segundos para o anelamento dos oligonucleotídeos a 60 °C, e 90 segundos de polimerização a 72 °C. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1,4 %.

### ***Southern blot***

Aproximadamente 2,5 µg de DNA do indivíduo selvagem e dos mutantes selecionados foram digeridos com a enzima *HindIII*, *ClaI* ou *EcoRV*. Os fragmentos de digestão foram fracionados em gel de agarose a 0,8 % e transferidos para membrana de náilon (*Stratagene*® ou *Hybond-N*) de acordo com Sambrook et al. (1989). A marcação da sonda (pAN7-1), hibridização e detecção do sinal foram realizadas com o *Gene Images Random-Prime Labelling Module*

*Kit* e *CPD-Star Detection Module* (Amersham), segundo as instruções do fabricante. Para a marcação da sonda com  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-CTP utilizou-se o sistema *Rediprime II* (Amersham), conforme instruções do fabricante.

### **Testes de patogenicidade**

Foram utilizadas as cultivares comerciais Epagri-106 e Epagri-109, gentilmente cedidas pela EPAGRI, SC. Enquanto Epagri-106 é suscetível ao isolado I-22, Epagri-109 é resistente. A semeadura foi realizada em vasos plásticos contendo mistura de solo e substrato *Plantmax*® (1:1). As adubações de cobertura foram realizadas conforme recomendações para a cultura.

Os transformantes de *M. grisea* selecionados foram submetidos aos ensaios de patogenicidade em plantas de arroz, sob condições de câmara de crescimento a 26 °C e fotoperíodo de 12 horas. As inoculações foram realizadas em plantas no estágio de 3 ou 4 folhas ( $\pm$  21 dias), com suspensão de 1,0 - 1,5 x 10<sup>5</sup> conídios/mL. Inicialmente, a seleção foi feita utilizando-se apenas uma repetição (1 vaso com 5 plantas). Os transformantes com possíveis alterações na patogenicidade ou virulência foram selecionados para novo ensaio, com 10 repetições (10 vasos com 5 plantas cada).

A reação das plantas Epagri-106 foi avaliada 10 dias após inoculação, sendo registrados os componentes: período de incubação (PI), número de lesões (NL), formato das lesões (FL), área das lesões (AL) e severidade (S). O PI, tempo decorrido desde a inoculação até o aparecimento dos primeiros sintomas, foi avaliado de 8 em 8 horas, sendo considerado concluído quando 50 % das plantas apresentaram sintomas. As avaliações do NL e FL foram de caráter qualitativo.

Transformantes que causaram número reduzido de lesões ou lesões com formatos atípicos foram considerados mutantes para a patogenicidade. Para o cálculo da AL foram amostradas 20 lesões por repetição, mensurando-se o comprimento (C) e a largura (L) das mesmas. A área da lesão foi obtida segundo a fórmula:  $AL \text{ (mm}^2\text{)} = \pi \times C/2 \times L/2$ . A severidade da doença foi avaliada utilizando-se escala diagramática com 10 notas (IRRI, 2002). Em Epagri-109 avaliou-se apenas a incidência de brusone.

### **Crescimento *in vitro*, germinação de conídios e diferenciação de apressórios**

O crescimento do fungo, mensurado como área da colônia (mm<sup>2</sup>), foi avaliado em culturas crescidas em meio completo (MC - BDA) ou meio mínimo (MM - Crawford et al., 1986) a 28 °C no escuro por 11 e 13 dias, respectivamente. Cada mutante foi repicado para 5 placas de Petri/meio de cultura.

A germinação e o desenvolvimento de estruturas de infecção foram monitoradas em epiderme de cebola conforme protocolo de Balhadère et al. (1999). Brevemente, 20 µL de suspensão 10<sup>5</sup> conídios/mL foram distribuídos sobre a superfície hidrofóbica da epiderme de cebola, disposta em lâmina de vidro. Prepararam-se 4 lâminas por mutante, as quais foram incubadas em câmara úmida à temperatura ambiente. Durante 20 horas de incubação, as epidermes foram examinadas periodicamente, e as frequências de conídios germinados e conídios com apressórios determinadas em microscópio óptico, amostrando-se 200 conídios por lâmina.

### **Definições operacionais**

O processo patogênico de *M. grisea* é complexo e envolve muitos genes. Por convenção, todos os genes requeridos para o desenvolvimento da doença, mas não essenciais para o patógeno completar seu ciclo de vida *in vitro*, foram aqui mencionados como “genes de patogenicidade” (Idnurm & Howlett, 2001). O termo “genes de avirulência” ou “AVR” foi empregado para designar alelos de genes do fungo que condicionam a especificidade em nível de cultivares (Valent et al., 1991). A intensidade da doença durante período determinado de tempo foi referida como “agressividade”.

## **RESULTADOS**

### **Identificação e caracterização fenotípica dos mutantes**

A patogenicidade e virulência de 125 transformantes de *M. grisea* I-22, principalmente gerados por REMI, foram avaliadas em plantas de arroz. Nenhum dos transformantes foi capaz de infectar Epagri-109, cultivar resistente ao I-22, indicando que não houve ganho de virulência por mutações em genes AVR. Contudo, foi possível identificar cinco mutantes com alterações consistentes na patogenicidade em Epagri-106, cultivar suscetível ao I-22, sugerindo a inativação de genes de patogenicidade. Esses mutantes apresentaram fenótipos distintos, os quais não variaram consideravelmente nos ensaios realizados em épocas diferentes (Tabela 1).

**TABELA 1.** Características fenotípicas dos mutantes de *Magnaporthe grisea* I-22 com alterações na patogenicidade em arroz.

Indivíduo	Fenótipo <sup>1</sup>	Crescimento <i>in vitro</i> (mm <sup>2</sup> ) <sup>2</sup>		Germinação (%) <sup>3</sup>	Apressório (%) <sup>4</sup>	Área da lesão (mm <sup>2</sup> ) <sup>5</sup>	Severidade <sup>6</sup>
		MC	MM				
<b>I-22</b>	Tipo selvagem	3348,23 <sup>7</sup> a	2095,46 a	91,82 a	91,92 a	2,26 a	8
<b>T41</b>	Lesões de menor tamanho	4256,47 a	2697,26 a	93,93 a	90,46 a	0,34 b	3
<b>T93</b>	Menor número de lesões	3945,53 a	2915,84 a	90,38 a	87,30 a	1,95 a	na <sup>9</sup>
<b>T108</b>	Menor número de lesões	897,71 b	222,23 b	88,42 a	89,86 a	0,67 b	na
<b>T251</b>	Não patogênico	3481,91 a	1999,46 a	89,85 a	89,57 a	na	na
<b>T72</b>	Desenvolvimento retardado	nd <sup>8</sup>	nd	28,18 b	0 b	nd	nd

<sup>1</sup> Fenótipo predominante quando inoculado em plantas de arroz Epagri-106. Avaliação aos 10 dias após inoculação.

<sup>2</sup> Área da colônia em meio completo (MC - BDA) ou meio mínimo (MM) aos 11 e 13 dias de incubação a 28 °C, respectivamente.

<sup>3</sup> Porcentagem de conídios germinados em epiderme de cebola, com 2 horas de incubação a temperatura ambiente.

<sup>4</sup> Porcentagem de conídios com apressórios diferenciados, em epiderme de cebola, com 8 horas de incubação a temperatura ambiente.

<sup>5</sup> Área da lesão =  $\pi \times (\text{comprimento da lesão}/2) \times (\text{largura da lesão}/2)$ .

<sup>6</sup> Nota 3 = pequenas lesões arredondadas ou ligeiramente alongadas, com centro cinzento, borda marrom, com n<sup>o</sup> significativo de lesões nas folhas superiores; Nota 8 = 51 - 75 % da área foliar lesionada e presença de muitas folhas mortas (IRRI, 2002).

<sup>7</sup> Valores correspondem a médias, as quais seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5 %.

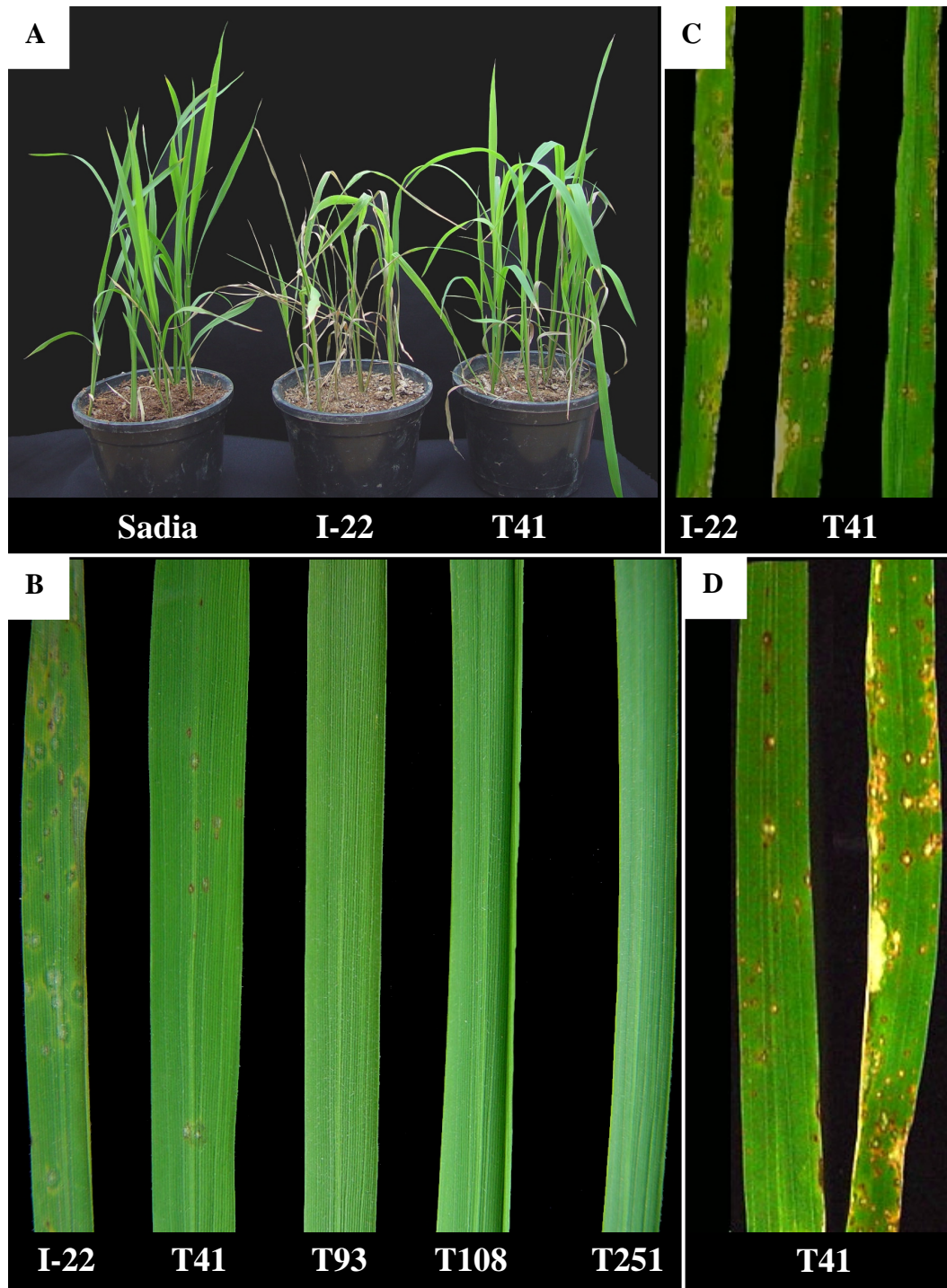
<sup>8</sup> Não determinado.

<sup>9</sup> Não aplicável.

Plantas de arroz inoculadas com o transformante T93 ou T108 desenvolveram poucas lesões típicas da brusone. Em determinados ensaios, as plantas inoculadas com esses transformantes não desenvolveram sintomas da doença (Figura 1B). Quando lesões de T108 foram detectadas em Epagri-106, essas apresentaram áreas reduzidas, média de 0,67 mm<sup>2</sup>, em relação às lesões de 2,26 mm<sup>2</sup> observadas em plantas inoculadas com o isolado selvagem (Tabela 1). O mutante T93 foi obtido por procedimentos REMI, sendo que a integração do vetor foi mediada por 50 U de *HindIII*. Já o mutante T108 foi gerado por transformação convencional envolvendo pAN7-1 linearizado e a inativação da enzima usada para clivagem do vetor.

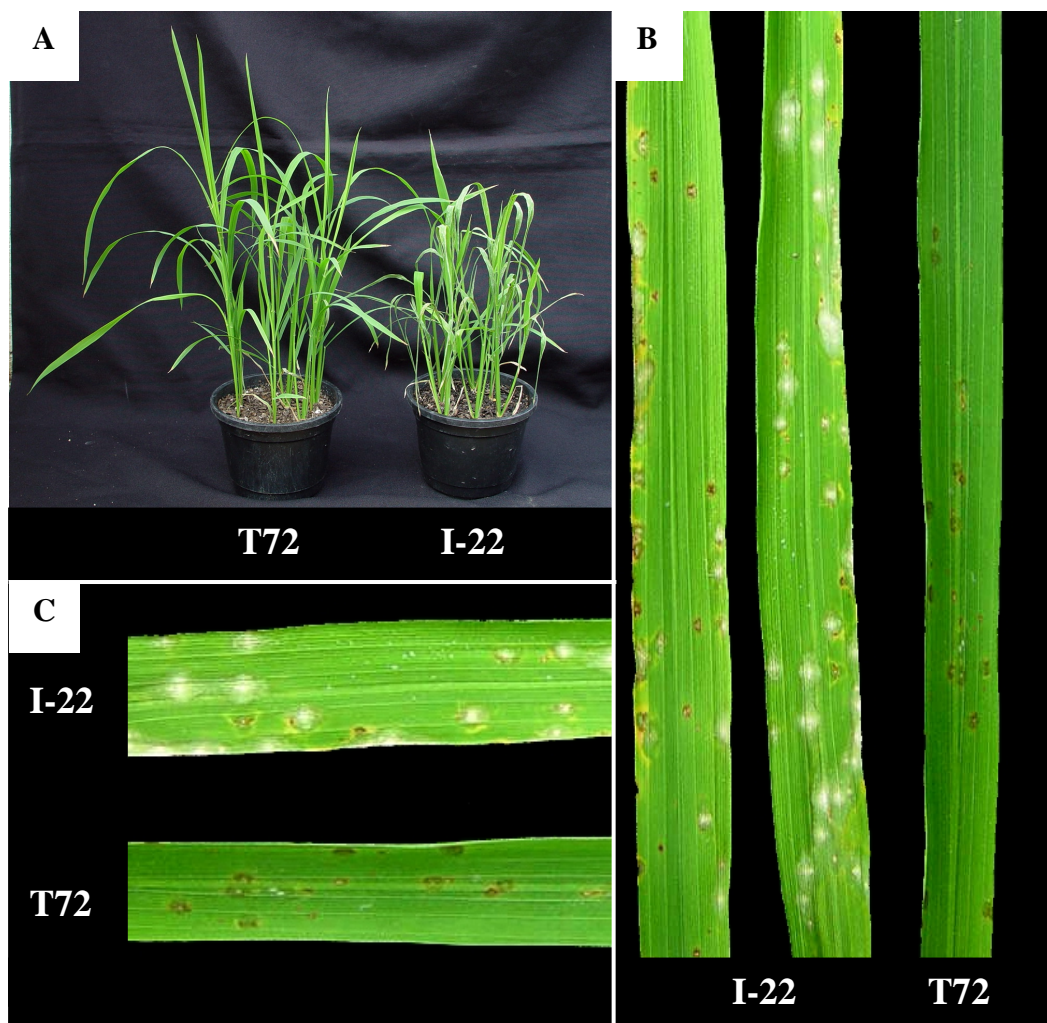
Inicialmente, o processo de doença desencadeado por T41 foi semelhante ao observado com o indivíduo selvagem, sendo possível a visualização dos primeiros sintomas 64 horas após a inoculação. No entanto, o desenvolvimento dos sintomas foi alterado (Figura 1A). Não foram observados halos cloróticos circundando as lesões, as quais foram atípicas, apresentando formatos arredondados e, além disso, áreas reduzidas, média 0,34 mm<sup>2</sup> (Figuras 1B, 1C e 1D; Tabela 1). O mutante T41 foi gerado por procedimentos convencionais de transformação, não havendo a inativação da enzima de restrição utilizada para a linearização de pAN7-1.

Um mutante não patogênico, T251, foi obtido com a transformação REMI envolvendo 30 U de *HindIII*. Em todas as inoculações, o mutante T251 não infectou Epagri-106 (Figura 1B).



**FIGURA 1.** Patogenicidade de mutantes de *Magnaporthe grisea* I-22 em plantas de arroz Epagri-106. **A.** Aspecto geral de plantas inoculadas com I-22 ou T41. **B.** Folhas inoculadas com os mutantes. **C e D.** Detalhes das lesões causadas por T41 em estágio avançado.

As características do mutante T72 foram diferentes dos demais. Plantas inoculadas com T72 desenvolveram menor número de lesões (Figuras 2B e 2C), e apresentaram atraso no desenvolvimento dos sintomas (Figura 2A). Enquanto I-22 completou o PI com aproximadamente 64 horas, T72 apresentou PI mais longo, com cerca de 88 horas. O T72 foi gerado pela transformação de I-22 com pAN7-1 linear na presença de atividade *Hind*III, enzima usada para a linearização do vetor.



**FIGURA 2.** Patogenicidade do mutante T72 de *Magnaporthe grisea* I-22 em plantas de arroz Epagri-106. **A.** Aspecto geral de plantas inoculadas com I-22 ou T72. **B e C.** Detalhes das lesões causadas por T72.

### **Estabilidade mitótica dos mutantes**

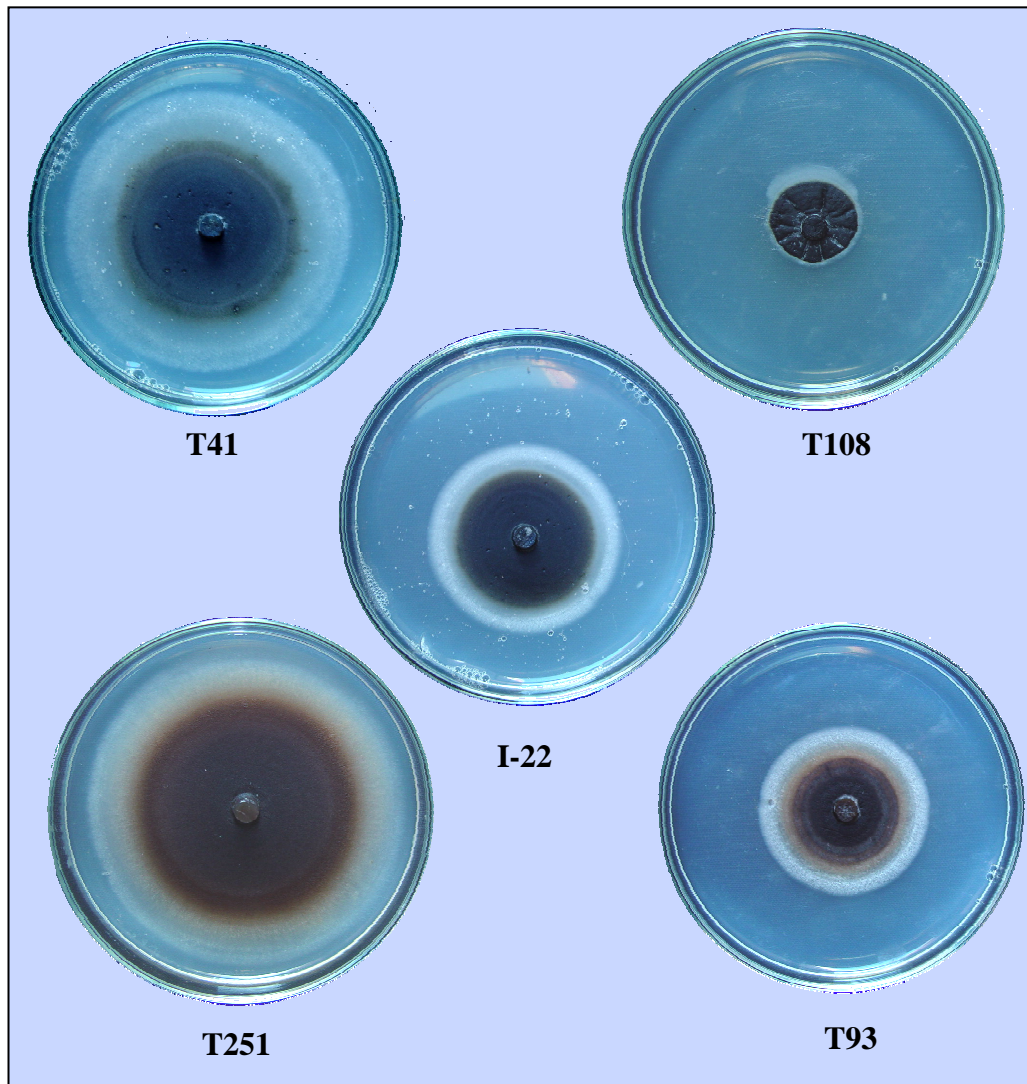
A estabilidade mitótica dos mutantes T41, T93, T108 e T251 foi avaliada cultivando-os sucessivamente em meio de cultura sem o agente de seleção. Após cinco gerações de cultivo nessas condições, cerca de 35 dias, os mutantes foram transferidos para o meio seletivo. Todos os mutantes foram resistentes ao antibiótico higromicina, indicando que as integrações de pAN7-1 no genoma foram mitoticamente estáveis. Quando plantas de arroz foram inoculadas com T41, T93, T108 ou T251, oriundos da última geração de cultivo do ensaio de estabilidade mitótica, verificaram-se os mesmos fenótipos apresentados na Figura 1.

### **Crescimento *in vitro*, germinação de conídios e diferenciação de apressórios**

Estudou-se o efeito das mutações no crescimento vegetativo dos mutantes T41, T93, T108 e T251. O crescimento dos mutantes T41, T93 e T251 em MC foi semelhante ao crescimento do indivíduo selvagem (Tabela 1; Figura 3). Em contrapartida, o mutante T108 teve crescimento reduzido, cerca de 73 % menor que o crescimento de I-22 (Tabela 1; Figura 3). O padrão de crescimento dos mutantes em MM foi semelhante ao observado no cultivo em MC. Os mutantes T41, T93 e T251 cresceram de forma similar ao I-22, enquanto o crescimento de T108 foi reduzido (Tabela 1).

Quando cultivado *in vitro*, o mutante T93 apresentou pigmentação marrom, em contraste com a coloração negra da cultura do isolado selvagem (Figura 3). Surpreendentemente, o fenótipo pigmentação manifestado por culturas do mutante

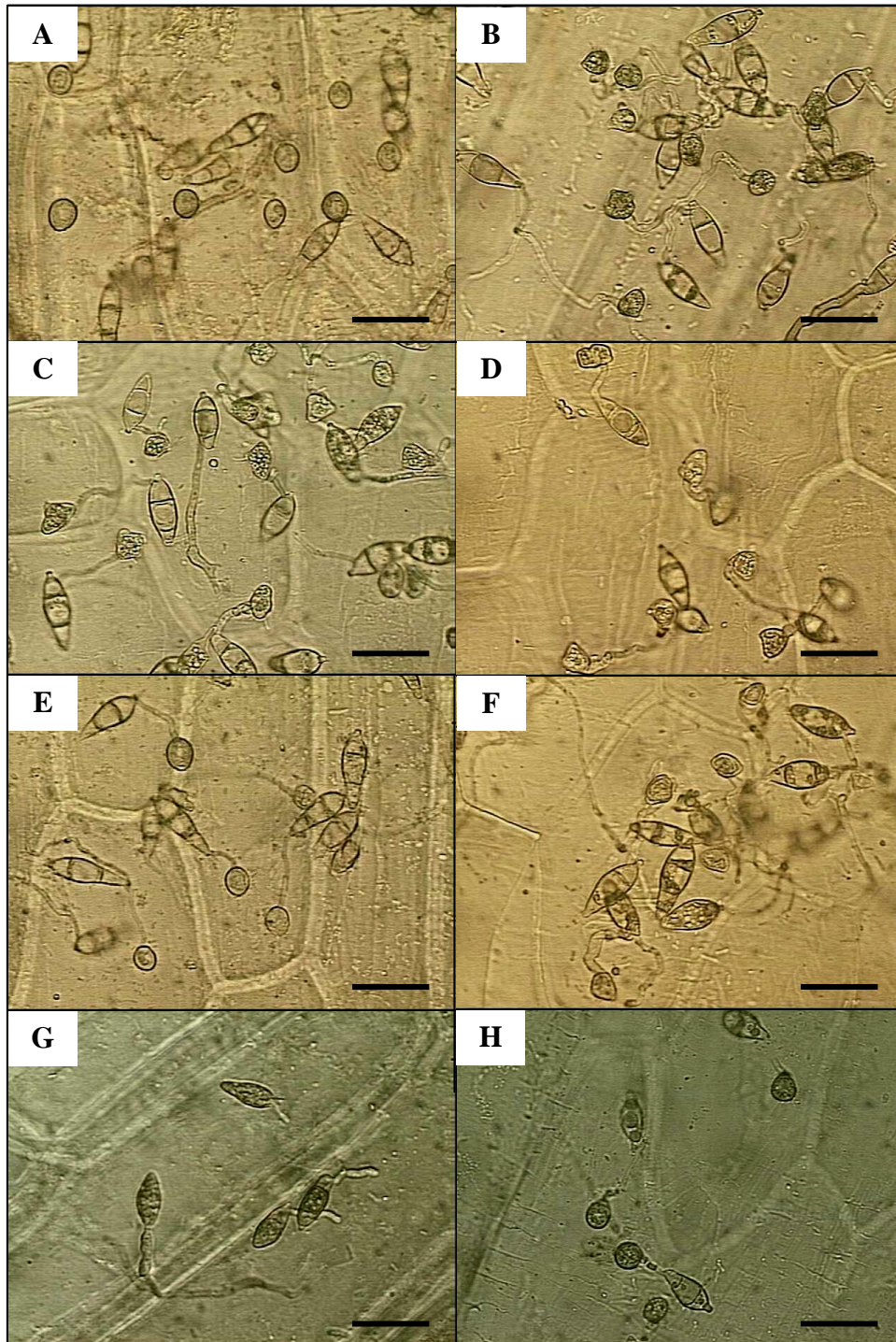
T251 foi semelhante ao observado em culturas T93. Os mutantes T93 e T251 foram obtidos em ensaios REMI independentes.



**FIGURA 3.** Mutantes de *Magnaporthe grisea* I-22 cultivados em meio completo (MC - BDA), 11 dias após a repicagem. O mutante T108 apresentou crescimento vegetativo reduzido, enquanto os mutantes T93 e T251 apresentaram pigmentação marrom.

Ensaio em epiderme de cebola foram realizados para avaliar a germinação de conídios e a diferenciação de apressórios (Figura 4). Com duas horas de incubação foi possível observar cerca de 92 % de germinação dos conídios de I-22 (Tabela 1). Também foi possível observar a germinação dos conídios de todos os mutantes, a qual variou de 88 a 94 %, exceto para o mutante T72, o qual apresentou germinação média de 28 %. Após 8 horas de incubação dos conídios, foi possível constatar diferenciação de apressórios em I-22 da ordem de 92 %. As porcentagens de diferenciação de apressórios dos mutantes T41, T93, T108 e T251 foram semelhantes, variando de 87 a 90 % (Tabela 1). Nenhum apressório foi formado pelo mutante T72 após 8 horas de incubação. Somente com 20 horas de incubação T72 apresentou mais de 50 % de conídios germinados, porém a formação de apressórios permaneceu baixa (24,5 %).

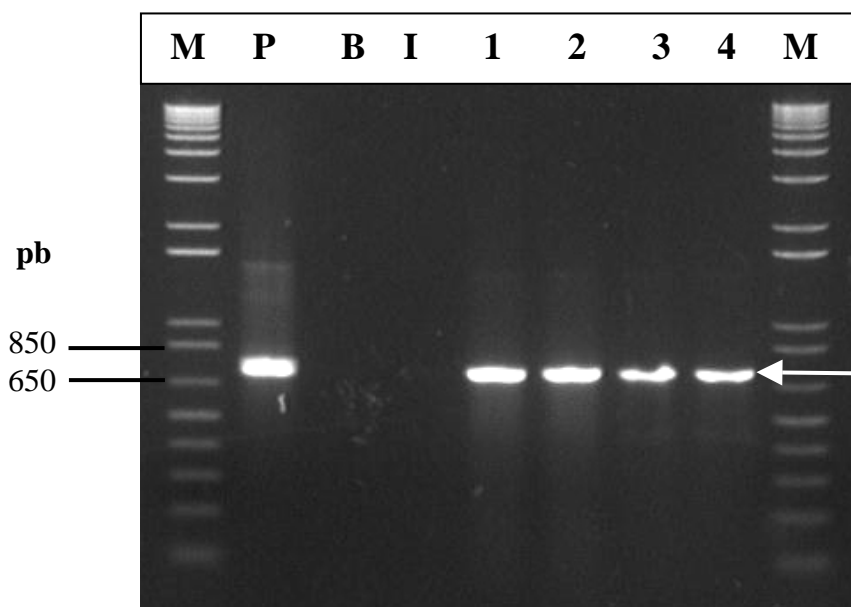
Ao microscópio óptico, os apressórios produzidos por I-22 foram robustos, bem definidos e melanizados (Figura 4A). Embora tenha sido comum a ocorrência de apressórios aparentemente anormais em todos os mutantes, houve fração considerável desta classe de apressórios no mutante T93 (Figuras 4C e 4D). Grande parte dos apressórios formados por T93 apresentou forma irregular, diferente da observada em I-22 (Figura 4A). Embora em menor proporção, apressórios com formas irregulares também foram comuns em T251 (Figura 4F). Os apressórios de T72, apesar de demorarem mais tempo para serem diferenciados (Figura 4G), foram morfológicamente normais, muito similares aos apressórios de I-22 (Figura 4H).



**FIGURA 4.** Diferenciação e morfologia dos apressórios de mutantes de *Magnaporthe grisea* I-22, em epiderme de cebola. **A:** I-22. **B:** T41. **C e D:** T93. **E:** T108. **F:** T251. **G e H:** T72. **A a G e H** com 8 e 20 horas de incubação, respectivamente. Barras equivalem a 20  $\mu\text{m}$ .

### Análise molecular do padrão de integração de pAN7-1

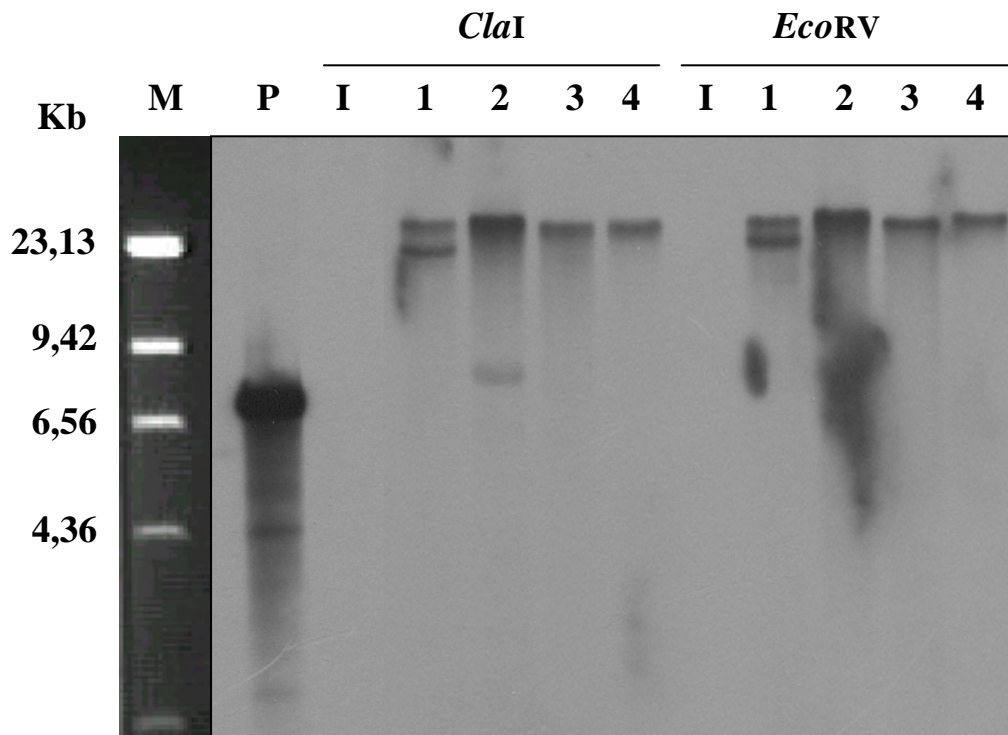
Para verificar a presença de pAN7-1 no genoma dos mutantes de *M. grisea* I-22, PCR foi conduzida com os oligonucleotídeos hph1 e hph2, que anelam especificamente na região estrutural do gene *HPH*, utilizado como marcador de seleção. Reações positivas foram detectadas pela presença de amplicons de 690 pb. Todos os mutantes analisados, T41, T93, T108 e T251, apresentaram o fragmento correspondente à presença do gene *HPH* (Figura 5).



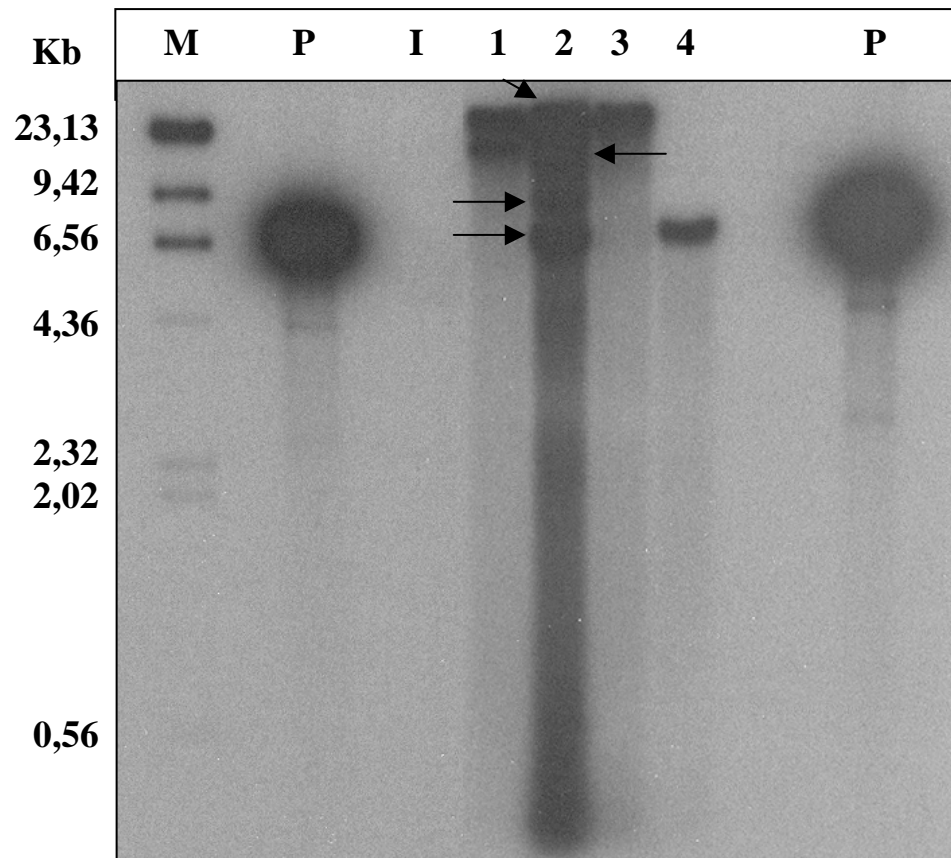
**FIGURA 5.** Perfil eletroforético dos amplicons dos mutantes de *Magnaporthe grisea* I-22, utilizando os oligonucleotídeos hph1 e hph2. **M:** marcador de tamanho 1 Kb *Plus* (*Invitrogen*®); **P:** pAN7-1; **B:** reação controle, contendo todos os reagentes, exceto o DNA; **I:** *M. grisea* I-22; **1:** T41; **2:** T93; **3:** T108 e **4:** T251. Os fragmentos de 850 e 650 pares de base (pb) do marcador estão indicados na margem esquerda. A seta indica os amplicons de 690 pb esperados.

*Southern blots* foram conduzidos para determinar o padrão de integração de pAN7-1 nos mutantes T41, T93, T108 e T251. A clivagem do DNA dos mutantes com *EcoRV* ou *ClaI* revelou o mesmo padrão de integração do vetor (Figura 6). A inserção do vetor de transformação ocorreu em dois sítios no genoma de T41 (Figura 6, linha 1). O mutante T93 também apresentou dois fragmentos com homologia a pAN7-1, sendo o fragmento maior com sinal aparentemente mais intenso (Figura 6, linha 2). Os mutantes T108 e T251 apresentaram apenas um fragmento com homologia a pAN7-1, sugerindo um único sítio de integração no genoma (Figura 6, linhas 3 e 4).

Para determinar a ocorrência de integrações *in tandem* ou a restauração do sítio de restrição, no caso de mutantes REMI, o DNA foi clivado com *HindIII*, a enzima usada para a transformação REMI, e hibridizado com pAN7-1. O padrão de integração do vetor no genoma dos mutantes T41, T93, T108 e T251 foi diferente (Figura 7). O mutante T41 apresentou dois fragmentos com homologia a pAN7-1, com tamanhos superiores a 6,75 Kb (Figura 7, linha 1). Padrão de integração mais complexo foi observado em T93. O mutante apresentou quatro fragmentos com homologia ao vetor, sendo um fragmento com 6,75 Kb (Figura 7, linha 2). Apenas um fragmento com homologia a pAN7-1, com tamanho superior a 6,75 Kb, foi detectado para o mutante T108 (Figura 7, linha 3). A hibridização do DNA de T251 também revelou a presença de apenas um fragmento com homologia a pAN7-1 (Figura 7, linha 4). O padrão de integração do vetor no mutante T251 foi o único a sugerir a ocorrência de restauração dos sítios de restrição de *HindIII*, ou seja, evento REMI.



**FIGURA 6.** Padrão de integração do vetor em mutantes de *Magnaporthe grisea* I-22 analisado por *Southern blot*, utilizando como sonda pAN7-1 marcado com dUTP-fluoresceína. O DNA total foi clivado com *ClaI* ou *EcoRV*. **M:**  $\lambda$ DNA clivado com *HindIII*. **P:** pAN7-1 linearizado com *HindIII*. **I:** I-22. Linhas **1, 2, 3** e **4** correspondem a T41, T93, T108 e T251, respectivamente. O tamanho (Kb) dos fragmentos  $\lambda$ DNA-*HindIII* estão indicados na margem esquerda.



**FIGURA 7.** Padrão de integração do vetor em mutantes de *Magnaporthe grisea* I-22 analisado por *Southern blot*, utilizando como sonda pAN7-1 marcado com  $\alpha$ - $^{32}$ P-CTP. O DNA total foi clivado com *Hind*III. **M:**  $\lambda$ DNA clivado com *Hind*III. **P:** pAN7-1 linearizado com *Hind*III. **I:** I-22. Linhas **1, 2, 3** e **4** correspondem a T41, T93, T108 e T251, respectivamente. O tamanho (Kb) dos fragmentos  $\lambda$ DNA-*Hind*III estão indicados na margem esquerda. As setas indicam os fragmentos de T93 com homologia a pAN7-1.

## DISCUSSÃO

Da coleção de 500 transformantes insercionais de *M. grisea* I-22, principalmente gerados por mutagênese REMI, 125 foram avaliados quanto a patogenicidade e a virulência em plantas de arroz.

Inoculações foram realizadas em Epagri-109, a qual é resistente ao isolado I-22, visando identificar genes AVR de *M. grisea* envolvidos na especificidade de cultivares. Contudo, nenhum transformante foi capaz de infectar essa cultivar. Obviamente, o número reduzido de transformantes analisado contribuiu para a falta de êxito. A carência de informações sobre a base genética da resistência no hospedeiro também dificultou a detecção de mutantes virulentos. A presença de mais de um gene de resistência (R) em Epagri-109, prevenindo a infecção pelo isolado I-22, tornaria mais árdua a identificação de genes AVR. Segundo a hipótese, sustentado pela teoria gene-a-gene (Flor, 1971), seriam necessárias as inativações de todos os genes AVR do fungo cujos produtos estariam relacionados com os produtos dos genes R presentes em Epagri-109.

Foram obtidos mutantes com defeitos na patogenicidade em plantas Epagri-106, a qual é suscetível ao I-22. Cinco transformantes apresentaram fenótipo de patogenicidade alterado consistentemente. Surpreendentemente, a recuperação de 4 % de mutantes para a patogenicidade foi elevada em comparação aos índices relatados em trabalhos anteriores. Mutações para a patogenicidade têm sido identificadas em 0,4 a 0,5 % dos transformantes analisados (Sweigard et al., 1998; Balhadère et al., 1999). Um dos fatores associados à maior eficiência correspondeu aos métodos empregados. As

pesquisas de Sweigard et al. (1998) e Balhadère et al. (1999) foram conduzidas com cevada. Enquanto os primeiros autores utilizaram sistema inicial de seleção onde as condições não foram controladas completamente, Balhadère et al. fizeram seleção inicial em folhas destacadas. Como resultado, as condições experimentais podem ter reduzido a identificação de mutantes. A utilização de folhas destacadas pode, por exemplo, ter prejudicado a detecção dos mutantes com defeitos no processo de adesão ao hospedeiro.

O estabelecimento da doença no hospedeiro é processo complexo, onde muitas estruturas e moléculas estão envolvidas. Provavelmente, os mutantes identificados apresentaram defeitos em genes importantes para diferentes etapas da patogênese. Em determinadas ocasiões, o mutante T108, por exemplo, não foi patogênico ao arroz. Além disso, quando cultivado em MC e comparado com I-22, apresentou crescimento vegetativo reduzido em 73 %. Em outras ocasiões, T108 causou doença, porém foi menos agressivo, provocando nas folhas lesões com tamanhos reduzidos, o que foi condizente com o menor crescimento em meio de cultura. Fujimoto et al. (2002) recuperaram um mutante insercional semelhante a T108, mutante *pat194*, o qual apresentou crescimento radial reduzido, porém com germinação e esporulação aparentemente normais. Contudo, a caracterização detalhada do gene inativado em *pat194* ainda não foi reportada.

Componente essencial para patogenicidade de *M. grisea* é a melanina. Este pigmento está diretamente relacionado com a função do apressório. Mutações em genes envolvidos na biossíntese de melanina resultam em perda de patogenicidade (Talbot, 1995; Howard & Valent, 1996). O mutante T251 não foi patogênico, e a sua pigmentação marrom, quando em cultura, sugeriu possível alteração na rota

biossintética de melanina. O tubo germinativo de T251 diferenciou o apressório, o que sustenta a hipótese de defeitos na função da estrutura de infecção. Surpreendentemente, o mutante T93 também apresentou coloração marrom quando cultivado *in vitro*, indistinguível de T251. O mutante T93, apesar de capaz de diferenciar apressórios, apresentou elevada proporção de estruturas com formas irregulares, o que pode ter contribuído para o fracasso no estabelecimento de doença. Alterações morfológicas de apressórios podem ser devido à perda da rigidez da célula, ou devido à inabilidade de gerar turgor (Howard et al., 1991, citados por Talbot & McCafferty, 1997).

Os mutantes T251 e T93 foram gerados por procedimentos REMI independentes. Alguns relatos apontam para REMI mediando integrações no mesmo gene (Lu et al., 1994; Sweigard et al., 1998). Contudo, ainda é polêmica a aleatoriedade dos eventos de integração em REMI. A análise das seqüências interrompidas em T251 e T93 poderá gerar novas evidências para a discussão.

Ao contrário dos demais, o T72 não apresentou alterações morfológicas visíveis. Das características avaliadas, a única que divergiu de I-22 foi o período de incubação. Comparado ao I-22, T72 apresentou período de incubação mais longo (88 horas). O T72 também precisou de tempo maior para germinar os conídios e diferenciar os apressórios em epidermes de cebola. Considera-se que T72 é exemplo raro de mutante de *M. grisea* com alterações no período de incubação. A caracterização mais detalhada de T72 encontra-se em progresso.

A maior parte das investigações sobre a patogenicidade de *M. grisea* resultou no acúmulo de informações acerca dos eventos pré-penetração e penetração (Talbot, 1995; Howard & Valent, 1996; Hamer & Talbot, 1998;

Idnurm & Howlett, 2001), talvez por consequência do grande número de genes que certamente estão envolvidos nessas etapas e da maior facilidade de identificação dos mutantes. Alguns eventos que antecedem a penetração do fungo envolvem a diferenciação de estruturas especiais de infecção e o acúmulo de melanina nas paredes do apressório. Defeitos em ambas as etapas resultariam em fenótipo não patogênico. Os mutantes aqui descritos ilustraram essa realidade: dos cinco identificados, três mutantes apresentaram dificuldades em iniciar o processo patogênico. Hipoteticamente, é possível que os mutantes T93, T108 e T251 tenham apresentado problemas na diferenciação ou na função do apressório.

Pouco é conhecido sobre a fisiologia do crescimento invasivo de *M. grisea*, da regulação do crescimento no interior dos tecidos do hospedeiro ou sobre os estágios finais da infecção. Devido à menor agressividade, T41 pode constituir fonte para ampliar o conhecimento da maquinaria pós-penetração que rege a patogenicidade do ascomiceto.

As dimensões dos bordos marrom-avermelhados em lesões de *M. grisea* estão relacionadas com o grau de resistência do hospedeiro, sendo estreitas em cultivares suscetíveis (Ou, 1985; Bedendo, 1997). Os bordos proeminentes das lesões causadas por T41 sugeriram dificuldade em superar possíveis reações de defesas da planta. Identificado por Urban et al. (1999), o gene *ABC1* de *M. grisea* parece estar envolvido na supressão de defesas do hospedeiro. Codificador de transportador *ABC*, esse gene foi suposto agir como bomba de efluxo para detoxificação de compostos antimicrobianos sintetizados pelo arroz.

Lesões causadas por T41 não foram circundadas por halos cloróticos. Tais áreas são caracterizadas por infiltrações de substâncias tóxicas secretadas pelo

fungo (Yoshii, 1937, citado por Ou, 1985), e denotam o avanço da infecção (Talbot, 1995). Se a patogênese de T41 foi realmente dificultada pela ausência de compostos fitotóxicos, estes podem atuar como fatores de patogenicidade em estágios mais avançados, embora pareçam ser irrelevantes nos estágios iniciais da doença (Hamer & Talbot, 1998).

O mutante T108 pode constituir outra ferramenta para a identificação de genes de patogenicidade que atuam papel na expressão dos sintomas da doença, pois quando foi patogênico causou sintomas com menor intensidade.

Defeitos na patogenicidade podem ser provocados por mutações espontâneas ou por mutações induzidas pelo processo de transformação. Assim, é importante a correlação do fenótipo mutante com o evento de integração do vetor. Quando a espécie fúngica apresenta limitações para a ocorrência de reprodução sexuada, torna-se necessária à recuperação das seqüências inativadas.

Visando a recuperação do vetor e a posterior clonagem dos genes possivelmente envolvidos na patogenicidade, inicialmente foram conduzidas análises *Southern blots* para determinar o padrão de integração do vetor. O uso *ClaI* ou *EcoRV*, as quais não possuem sítios de restrição em pAN7-1, permitiu detectar o número de sítios de integração do vetor no genoma dos mutantes. Foram esperados fragmentos com homologia a pAN7-1 com tamanho superior a 6,75 Kb, o tamanho do vetor. O uso de *HindIII*, enzima usada em REMI, permitiu a detecção de integrações múltiplas cópias *in tandem*, bem como de eventos REMI propriamente ditos. Esses fenômenos foram detectados pela presença de fragmentos com homologia a pAN7-1 com tamanho igual a 6,75 Kb.

Com exceção de T108, a origem dos mutantes foi mediada por *HindIII*, mesmo que residual. Contudo, apenas em T251 ocorreu evento REMI. Nesse mutante, pAN7-1 foi integrado no genoma via um único sítio de restrição para *HindIII*, possivelmente na forma de única cópia. As análises *Southern blots* indicaram duas integrações do tipo única cópia para o mutante T41, sendo que em ambas as integrações, pelo menos um dos sítios de restrição para *HindIII* não foi restaurado pelo sistema de reparo de DNA da célula. Para o mutante T93, os resultados sugeriram a inserção de pAN7-1 em dois sítios no genoma: um sítio com integração do tipo única cópia e outro com integração na forma de concatâmeros (fragmento maior com sinal mais intenso na radiografia obtida com o DNA-*ClaI* ou DNA-*EcoRV* do mutante). Único fragmento com homologia a pAN7-1 foi detectado a partir das hibridizações do DNA de T108. Visto que T108 foi originado por transformação convencional, é possível que a inserção do vetor não tenha ocorrido em sítio *HindIII*.

Esforços iniciais para isolar as seqüências inativadas usando o protocolo de Kuspa & Loomis (1992) não foram bem sucedidos. As colônias de *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  continham apenas o vetor pAN7-1 vazio (sem as seqüências genômicas flanqueadoras) ou um plasmídeo de tamanho menor, com deleção do fragmento *EcoRI* (dados não apresentados). Bölker et al. (1995) enfrentaram problemas semelhantes na recuperação do vetor pSMUT do genoma de *Ustilago maydis*. A causa atribuída pelos autores foi a recombinação dentro de fragmentos contendo cópias múltiplas do vetor. Ensaios de recuperação do vetor estão sendo conduzidos com outras bactérias e outras enzimas. Pelo menos para T251, que apresentou evento REMI, a recuperação da seqüência inativada poderá ser

efetuada com PCR invertida (Clergeot et al., 2001), utilizando oligonucleotídeos que anelam nas extremidades de pAN7-1.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALHADÈRE, P.V., FOSTER, A.J. & TALBOT, N.J. Identification of pathogenicity mutants of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* by insertional mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 12:129-142. 1999.

BEDENDO, I.P. Doenças do arroz. In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A. & REZENDE, J.A.M. (Eds.) **Manual de fitopatologia, volume 2: doenças das plantas cultivadas**. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo. Editora Agronômica Ceres Ltda. 1997. pp. 84-87.

BÖLKER, M., BÖHNERT, H.U., BRAUN, K.H., GÖRL, J. & KAHMANN, R. Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). **Molecular and General Genetics** 248:547-552. 1995.

CLERGEOT, P.H., GOURGUES, M., COTS, J., LAURANS, F., LATORSE, M.P., PÉPIN, R., THARREAU, D., NOTTEGHEM, J.L. & LEBRUN, M.H. *PLS1*, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. **Proceedings of the**

**National Academy of Sciences of the United States of America** 98:6963-6968.  
2001.

CRAWFORD, M.S., CHUMLEY, F.G., WEAVER, C.G. & VALENT, B.  
Characterization of the heterokaryotic and vegetative diploid phases of  
*Magnaporthe grisea*. **Genetics** 114:1111-1129. 1986.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of  
Phytopathology** 9:275-296. 1971.

FUJIMOTO, D., SHI, Y., CHRISTIAN, D., MANTANGHIHAN, J.B. &  
LEUNG, H. Tagging quantitative loci controlling pathogenicity in *Magnaporthe  
grisea* by insertional mutagenesis. **Physiological and Molecular Plant  
Pathology** 61:77-88. 2002.

HAMER, J.E. & TALBOT, N.J. Infection-related development in the rice blast  
fungus *Magnaporthe grisea*. **Current Opinion in Microbiology** 1:693-697.  
1998.

HOWARD, R.J. & VALENT, B. Breaking and entering: host penetration by the  
fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **Annual Review in Microbiology**  
50:491-512. 1996.

IDNURM, A. & HOWLETT, B.J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. **Molecular Plant Pathology** 2:241-255. 2001.

IRRI. **Standard evaluation system for rice (SES)**. Los Baños. International Rice Research Institute. 2002.

KUSPA, A. & LOOMIS, W.F. Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 89:8803-8807. 1992.

LAU, G.W. & HAMER, J.E. Acropetal: A genetic locus required for conidiophore architecture and pathogenicity in the rice blast fungus. **Fungal Genetics and Biology** 24:228-239. 1998.

LU, S., LYNGHOLM, L., YANG, G., BRONSON, C., YODER, O.C. & TURGEON, B.G. Tagged mutations at the *Tox1* locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 91:12649-12653. 1994.

OU, S.H. **Rice Diseases**. 2<sup>nd</sup> ed. Commonwealth. Mycological Institute. 1985.

PRABHU, A.S., FILIPPI, M.C. & RIBEIRO, A.S. Doenças e seu controle. In: VIEIRA, N.R. de A., SANTOS, A.B. dos & SANT'ANA, E.P. (Eds.) **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás. Embrapa Arroz e Feijão. 1999. pp. 262-307.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2<sup>nd</sup> ed. New York. Cold Spring Harbor laboratory Press. 1989.

SCHEUERMANN, K.K. **Análise da variabilidade de *Magnaporthe grisea* no estado de Santa Catarina** (Dissertação de Mestrado). Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2002.

SCHIESTL, R.H. & PETES, T.D. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 88:7585-7589. 1991.

SHI, Z. & LEUNG, H. Genetic analysis of sporulation in *Magnaporthe grisea* by chemical and insertional mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 8:949-959. 1995.

SHI, Z., CHRISTIAN, D. & LEUNG, H. Enhanced transformation in *Magnaporthe grisea* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. **Phytopathology** 85:329-333. 1995.

SWEIGARD, J. A REMI primer for filamentous fungi. **International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions Reporter**. Spring. 1996. pp. 3-5.

SWEIGARD, J.A., CARROLL, A.M., FARRALL, L., CHUMLEY, F.G. & VALENT, B. *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 11:404-412. 1998.

TALBOT, N.J. & McCAFFERTY, H.R.K. Identification and characterisation of pathogenicity genes from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Cahiers Options Méditerranéennes** 15:137-142. 1997.

TALBOT, N.J. Having a blast: exploring the pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. **Trends in Microbiology** 3:9-16. 1995.

URBAN, M., BHARGAVA, T. & HAMER, J.E. An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. **The EMBO Journal** 18:512-521. 1999.

VALENT, B., FARRALL, L. & CHUMLEY, F.G. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. **Genetics** 127:87-101. 1991.

## CONCLUSÕES GERAIS

A protoplastização de *Magnaporthe grisea*, isolado I-22, foi melhorada pela utilização simultânea de *Lysing Enzymes* e *Cellulase Onozuka R-10* em tampão fosfato a 0,01 M contendo  $MgSO_4$  a 1,2 M (pH=5,8). A baixa regeneração dos protoplastos, em relação às porcentagens de 60 e 70 % anteriormente descritas para *M. grisea*, pode ter sido reflexo, entre outras coisas, das características inerentes ao isolado ou das condições experimentais, incluindo o sistema lítico, o meio de regeneração e o método de plaqueamento dos protoplastos. Maior frequência de regeneração (19,4 %) foi obtida com protoplastos liberados com 3 horas de hidrólise enzimática.

O protocolo de protoplastização de *M. grisea*, uma vez adequado, permitiu a obtenção de protoplastos que foram prontamente transformados para a resistência à higromicina. A transformação de *M. grisea* I-22 com o pAN7-1 linear foi mais eficiente do que a utilização do vetor na forma circular. Não ignorando a condição física do vetor, é provável que a atividade da enzima *HindIII*, utilizada para linearizar pAN7-1, não tenha sido inativada completamente, o que promoveu o aumento da eficiência de transformação. O efeito positivo da atividade enzimática residual na transformação do I-22 foi mais evidente no tratamento que não envolveu a inativação térmica da enzima utilizada para a clivagem do vetor.

A integração do vetor no genoma de *M. grisea* foi catalisada pela presença de enzima de restrição na reação, ilustrando a potencialidade de pAN7-1 como marcador físico de mutações em mutagênese REMI. Maior frequência de transformantes foi constatada quando 5 unidades de *HindIII* foram adicionadas à reação de transformação. No entanto, é possível que a concentração ótima de *HindIII* resida entre 0 e 5 unidades da enzima. Concentrações elevadas de *HindIII* levaram ao decréscimo da eficiência de transformação, possivelmente devido ao excesso de danos genéticos irreversíveis causados na célula ou às sucessivas clivagens no sítio de integração de pAN7-1.

A mutagênese insercional de *M. grisea* I-22 foi bem sucedida, promovendo a recuperação de 4 % de mutantes com patogenicidade alterada em arroz. Os mutantes identificados apresentaram características fenotípicas distintas. Aliado às análises *Southern blots*, esses resultados sugeriram possível aleatoriedade nos eventos de integração de pAN7-1 no genoma de *M. grisea*. Ensaios de correlação entre o fenótipo mutante e a evento de integração serão necessários para determinar as mutações marcadas fisicamente pelo vetor.

Diante da escassez de informações, os mutantes T41 e T108, que foram menos agressivos, podem constituir fontes para ampliar o conhecimento da maquinaria pós-penetração que rege a patogenicidade. No caso de T41, é possível que tenham ocorrido defeitos na síntese de compostos fitotóxicos, dificultando o avanço da colonização dos tecidos, ou defeitos nos mecanismos para suplantar as defesas do hospedeiro.

O mutante T72 não exibiu alterações morfológicas visíveis, porém apresentou período de incubação mais longo (88 horas). Atrasos na germinação de

conídios e na diferenciação de apressórios também foram observados. Considera-se que T72 é exemplo raro de mutante de *M. grisea* com alterações no período de incubação.

Em síntese: (1) protoplastos de *M. grisea* puderam ser eficientemente obtidos com o uso simultâneo de *Lysing Enzymes* e *Cellulase Onozuka R-10* em solução tamponante contendo  $MgSO_4$  1,2 M, e aqueles liberados com 3 horas de hidrólise enzimática apresentaram maior capacidade de regenerar a parede celular; (2) protoplastos obtidos desta maneira foram prontamente transformados com pAN7-1, sendo que o uso de enzima de restrição (*HindIII*) elevou a frequência de integração do vetor e (3) mutantes insercionais foram recuperados com grande eficiência, os quais poderão ser explorados para a melhor compreensão da patogenicidade de *M. grisea* em arroz.