

FRANCIS JÚLIO FAGUNDES LOPES

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE TRANSFORMAÇÃO  
PARA MANIPULAÇÃO DE GENES EM *Crinipellis pernicioso***

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL

2003

FRANCIS JÚLIO FAGUNDES LOPES

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE TRANSFORMAÇÃO  
PARA MANIPULAÇÃO DE GENES EM *Crinipellis pernicioso***

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

APROVADA: 29 de agosto de 2003

---

Prof<sup>a</sup> Elza Fernandes de Araújo  
(Conselheira)

---

Prof<sup>o</sup> Sérgio Hermínio Brommonschenkel  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup> Flávia Maria Lopes Passos

---

Prof<sup>o</sup> Maurício Dutra Costa

---

Prof<sup>a</sup> Marisa Vieira de Queiroz  
(Orientadora)

À minha mãe, por tudo que sou,  
Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Cada personagem desta estória foi singularmente importante, cada um à sua forma e tempo. Importante também foram os desafios, pois cada dificuldade superada foi um degrau para galgar um nível mais elevado de aprimoramento pessoal. Enfim mais uma etapa concluída, e o resultado desta vitória contou com a participação de todos aqueles que de alguma forma me apoiaram. Agradeço, assim...

À Universidade Federal de Viçosa pela formação de excelência concedida aos seus alunos.

À CAPES pelo apoio à pesquisa no Brasil.

À minha orientadora Marisa, pelo profissionalismo, otimismo, pelos ensinamentos e presença constante, fatores fundamentais à concretização deste trabalho.

À Professora Elza, pelo exemplo de competência, dinamismo, pelos valiosos ensinamentos e por todo apoio ao longo do meu percurso na UFV.

Ao Professor Sérgio com quem pude consolidar os conhecimentos acerca de genética da interação patógeno-planta e pela valiosa participação da banca de defesa de tese.

Aos Professores Maurício e Flávia, pelo aceite de participação da banca de defesa de tese.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, especialmente à Laura, Nilcéia e D. Aparecida, que com competência, disposição e simpatia, dão um suporte fantástico a cada trabalho desenvolvido no Departamento.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos: Janaína, Ronney, Swiany, Mariana, Daniel, Maycon, Juliana, Jorge, Rodrigo, Jildete, Ireninha, Patrícia, Ximena, Denise, Marcos, Gilvan, Klédna, além dos saudosos amigos: Adalgisa, Taís, Tânia, Simone Pio, Michele, Luciana Abreu e Júpiter. Obrigado a todos aqueles que com um gesto de amizade, cada um ao seu modo, fizeram a grande diferença em vários momentos. Agradecimento com um algo mais à Lú, Vivi e João.

Aos amigos dos demais laboratórios, pela excelente convivência.

Aos amigos “irmãos” Pedro e Walter, pela ótima convivência ao longo do mestrado, pelos momentos divertidos e também pelos momentos difíceis compartilhados com muita amizade.

Sou eternamente grato à minha mãe e à minha irmã que independente de qualquer coisa, estão sempre ao meu lado, me dando apoio e carinho nos momentos em que mais preciso.

Minha gratidão maior que a imensidão do céu é a Deus, razão do meu viver. Quem me amou primeiro, meu amigo fiel, pai e conselheiro.

## **BIOGRAFIA**

Francis Júlio Fagundes Lopes, filho de Antônio Lopes Pinto e Amélia de Campos Lopes, nasceu no dia 28 de setembro de 1977 em Ipatinga, Estado de Minas Gerais.

Em Fevereiro de 1997 ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, graduando-se com louvor como bacharel e licenciado, em agosto de 2001.

Iniciou a pós-graduação em nível de Mestrado, no programa de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa em agosto de 2001, defendendo tese em agosto de 2003.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	10
2.1. Microrganismos e manutenção das culturas.....	10
2.2. Vetores de transformação.....	10
2.3. Extração de Plasmídeos.....	10
2.4. Obtenção dos protoplastos.....	12
2.5. Transformação de <i>C. pernicioso</i> .....	12
2.6. Extração de DNA dos transformantes.....	13
2.7. Análises moleculares dos transformantes.....	14
2.8. Teste de estabilidade dos transformantes.....	14
2.9. Determinação do nível de resistência à higromicina B.....	14
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	15
3.1. Eficiência de transformação em função do promotor utilizado.....	15
3.2. Influência da forma do vetor, da presença de inibidores de nucleases e de REMI na eficiência de transformação.....	18
3.3. Estabilidade dos transformantes.....	25
3.4. Nível de resistência a higromicina B.....	25
3.5. Construção pHCP.....	28
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	29
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	30

## RESUMO

LOPES, Francis Júlio Fagundes, M.S. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2003.  
**Desenvolvimento de um sistema de transformação para manipulação de genes em *Crinipellis pernicioso*.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Conselheiros: Elza Fernandes de Araújo e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

O presente trabalho abordou a transformação genética em *C. pernicioso*, fungo causador da vassoura-de-bruxa no cacauieiro, investigando os fatores que podem influenciar a eficiência de transformação neste organismo, bem como a forma de integração do vetor no genoma do fungo. A transformação dos protoplastos foi realizada pelo método químico do PEG/CaCl<sub>2</sub> e a seleção dos transformantes foi feita com base na resistência à higromicina B. A eficiência de transformação foi analisada em função do promotor utilizado para expressar o gene marcador (se proveniente de basidiomiceto ou de ascomiceto), da forma do vetor (circular ou linear) e da presença de inibidores de nuclease (ácido aurintricarboxílico, putrecina e espermidina) na mistura de transformação. A técnica REMI (*restriction enzyme mediated integration*) foi realizada utilizando a enzima de restrição *Bam*HI. Também foi construído um vetor contendo o gene que confere resistência à higromicina B (*hph*) sob o comando do promotor do gene *gpd* de *Agaricus bisporus*, para experimentos futuros de mutagênese insercional. A utilização do promotor *gpd* de *Agaricus bisporus* resultou em uma eficiência de transformação cinco vezes superior àquela obtida quando o promotor *gpd* de *Aspergillus nidulans* foi utilizado. Além disso, os transformantes desenvolveram-se mais rapidamente, com redução do tempo necessário para visualização das colônias nas placas em comparação aos transformantes que continham o gene *hph* sob o controle do promotor *gpd* *Aspergillus*. Os inibidores de nucleases putrecina e ATA (ácido aurintricarboxílico) reduziram a eficiência de transformação nas condições utilizadas, enquanto que a presença de espermidina não exerceu influência quando comparado ao controle. A linearização do vetor não influenciou a eficiência de transformação e todos os transformantes resultantes desse tratamento que foram analisados por hibridização apresentaram um padrão complexo de integração, com duas ou mais cópias do plasmídeo inseridas em posições distintas no genoma. A mais elevada eficiência de transformação foi obtida com REMI, utilizando-se 10U da enzima de restrição *Bam*HI e 10 µg do vetor na forma circular. Nesta condição, foram obtidos cerca de 64 transformantes/µg de plasmídeo, cerca de três vezes mais transformantes que o tratamento onde *Bam*HI não esteve presente. Não foi verificada a influência da enzima de restrição promovendo a obtenção de transformantes com uma única cópia do vetor integrada. Os transformantes mostraram alto nível de resistência à higromicina (>500 µg/mL). Dos transformantes analisados quanto à estabilidade mitótica, 100% conservaram-se resistentes após a passagem por meio não seletivo durante 40 dias.

## ABSTRACT

LOPES, Francis Júlio Fagundes, M.S. Universidade Federal de Viçosa, August 2003.

**Development of a transformation system for gene manipulation in *Crinipellis pernicioso*.** Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Committee members: Elza Fernandes de Araújo and Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

The present work has investigated the different conditions that may influence the transformation efficiency and the way transforming DNA integrates into the genome of the fungus *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of the witches' broom disease of cacao. Protoplast transformation was done by the PEG/CaCl<sub>2</sub> method. Transformant colonies were selected for resistance to hygromycin B. The transformation efficiency was related to the type of promoter used to express the *hph* gene (either from an ascomycete or from a basidiomycete fungus), vector shape (linear or circular forms), and the presence of nuclease inhibitors (aurintricarboxylic acid, putrescine or spermidine) in the transformation mix. The REMI (restriction enzyme-mediated integration) technique was employed using *Bam*HI. For future experiments of insertional mutagenesis, a plasmid containing the *hph* gene controlled by the *gpd* gene from *Agaricus bisporus* was constructed. The use of the *gpd* promoter from *Agaricus bisporus* resulted in a five-fold increase in transformation efficiency compared to that obtained with the *gpd* promoter from *Aspergillus nidulans*. In addition, these transformants showed faster growth than those containing *gpd* from *Aspergillus*. Putrescine and ATA (aurintricarboxylic acid) decreased the transformation efficiency, while spermidine did not have any influence in comparison to the control. Vector linearization was not effective and a complex pattern of plasmid integrations resulted from this procedure, with two or more copies integrated throughout the genome. The highest efficiency was obtained with REMI (10U of *Bam*HI added prior to transformation with 10 µg of circular vector). An efficiency of 64 transformants/µg of plasmid was obtained in this treatment. Under the analyzed conditions, *Bam*HI did not induce single copy integrations in *Crinipellis pernicioso*, although an approximate three-fold increase in the transformation efficiency was obtained. The transformants were highly resistant to hygromycin (> 500 µg/mL). All transformants analyzed were mitotically stable after successive transfers to nonselective media for 40 days.

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças causadas por organismos fitopatogênicos continuamente ameaçam a produção mundial de alimentos. Muitas doenças são recorrentes, ou devido à evolução dos patógenos para suplantar a resistência de variedades de plantas liberadas no mercado, ou resultado da migração dos patógenos para novas áreas. Os fungos fitopatogênicos, em particular, podem ocasionar perdas severas que resultam em sérios prejuízos econômicos. Além dos prejuízos econômicos, certos fungos fitopatogênicos produtores de micotoxinas constituem uma séria ameaça à saúde de pessoas e animais (SINHA e BHATNAGER, 1998).

A vassoura-de-bruxa do cacau é uma doença causada pelo fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, que vem prejudicando a produção de cacau na América Latina. O fungo é nativo da Amazônia e está presente em grande parte dos cacauzeiros cultivados na América do Sul e em várias ilhas do Caribe. A vassoura-de-bruxa ocorre nos seguintes países: Bolívia, Brasil, Peru e Venezuela (relatos antigos), Suriname (1985), Guiana (1906), Colômbia (1917), Equador (1921), Trinidad (1928), Tobago (1939), Granada (1948), São Vicente (1988), Panamá (1989) e particularmente no estado da Bahia (1989) (PURDY e SCHMIDT, 1996).

De 1993 a 1994, os cinco países líderes em produção de sementes secas de cacau foram: a Costa do Marfim (800.000 toneladas), Brasil (282.000 toneladas), Gana (245.000 toneladas), Indonésia (245.000 toneladas) e Malásia (220.000 toneladas). Em 1994, o Brasil foi o maior produtor das Américas (WAKELING, 1994 In: Purdy e Schmidt, 1996). Em maio de 1989, a doença foi detectada pela primeira vez na Bahia, o principal produtor de cacau no Brasil. A produção baiana sofreu uma queda de 60% no período de 1990 a 1994. Com a derrocada da cacauicultura na microregião do cacau na Bahia, o Brasil caiu de segundo para sexto produtor mundial de cacau. Hoje o Brasil ocupa a quarta posição da produção de cacau no mundo (<http://www.fao.org>) e a produção vem se recuperando graças ao investimento do governo federal em pesquisas e na recuperação ou expansão de áreas destinadas à cacauicultura (<http://www.herbario.com.br>).

O fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, pertence à ordem Agaricales, família Thricholomataceae e talvez seja o maior patógeno do cacauzeiro que provavelmente se desenvolveu concomitantemente com *Theobroma cacao* (POUND, 1943).

O sintoma característico da vassoura-de-bruxa é a formação de brotos hipertrofiados e o inchamento das regiões terminais da planta, conferindo um aspecto de vassouras às

almofadas florais. Os frutos ficam com a forma modificada, vindo a secar e a apodrecer (TOVAR, 1991).

Além de causar a vassoura-de-bruxa no cacauero e em seus parentes selvagens relacionados (biótipo C), *C. pernicioso* também causa os sintomas da doença em *Solanum* spp. (biótipo S) e em vários outros hospedeiros solanáceos (BASTOS e EVANS, 1985), bem como em *Bixa orellana*, família Bixaceae (biótipos C e B) no Brasil (BASTOS e ANDEBRHAN, 1986). O fato do biótipo C causar os sintomas da vassoura-de-bruxa em *Bixa orellana*, juntamente com evidências de características culturais e de dados moleculares, sugere que os biótipos C e B são idênticos, já os biótipos S e C foram claramente diferenciados por perfis de isoenzimas e padrões de DNA mitocondrial (GRIFFITH et al., 1994). O *C. pernicioso* de liana (ou biótipo L) apresenta heterotalismo e está associado com *Arrabidaea verrucosa* (Bignoniaceae), embora não sejam observados os sintomas da doença nesta espécie (GRIFFITH e HEDGER, 1994). REZENDE et al., (2000) identificaram em Minas Gerais, um Estado não produtor de cacau, um novo hospedeiro de *C. pernicioso*, a espécie *Heteropterys acutifolia*, pertencente à família Malpighiaceae. Os basidiósporos produzidos naturalmente em *H. acutifolia* foram inoculados em mudas de cacauero e induziram o desenvolvimento de sintomas da doença.

O biótipo C apresenta um estilo de vida hemibiotrófico. O fungo invade os tecidos novos do hospedeiro como biotrófico, e por razões não muito bem esclarecidas, ocorre a morte do tecido e o fungo passa a crescer saprofiticamente nos tecidos mortos. SILVA e MATSUOKA (1999) observaram que os tubos germinativos monocarióticos penetram nos tecidos dos hospedeiros sem a formação de apressório. Após a penetração, o micélio biotrófico se ramifica intercelularmente. Somente o micélio biotrófico do patógeno está presente nas vassouras verdes, e as hifas são intercelulares, irregularmente espessadas (5 a 20 µm), monocarióticas e não apresentam grampos de conexão (EVANS, 1980; CALLE et al., 1982; ORCHARD et al., 1994; MUSE et al., 1996; SILVA e MATSUOKA, 1999). A resposta do cacauero é localizada no ponto de infecção, onde ocorre considerável espessamento dos tecidos. Estudos de microscopia eletrônica mostraram que o inchamento dos tecidos infectados se deve ao aumento do tamanho de todos os tipos celulares e a uma considerável desorganização dos tecidos (ORCHARD et al., 1994). Após várias semanas, as folhas nas vassouras começam a necrosar, seguidas pela necrose do caule. Após três a nove semanas, a dicarionização se inicia e o micélio biotrófico, dentro dos tecidos do hospedeiro, é substituído ou muda para a fase saprofítica, a qual apresenta hifas de 1 a 3 µm de diâmetro, dicarióticas e com grampos de conexão (CALLE et al., 1982). As vassouras necróticas permanecem ligadas

à planta ou podem cair sobre a cobertura vegetal ou sobre o solo. O fungo continua seu crescimento saprofítico dentro das vassouras mortas por um período de 6 a 24 meses. Quatro a oito semanas depois da temporada de chuva, o basidiocarpo se desenvolve a partir das vassouras necróticas e dos frutos secos sobre o solo, reiniciando-se o ciclo (GRIFFITH e HEDGER, 1994).

O patossistema *C. pernicioso*-cacaueiro é principalmente influenciado pela umidade atmosférica (chuvas, névoas, orvalho e umidade relativa), fatores que influenciam a produção de basidiocarpo e a liberação dos basidiósporos, a dispersão, a infecção e a sincronização destes eventos. A temperatura pode apresentar importante papel, pois ela afeta: (a) a secagem das vassouras, promovendo assim a produção de basidiocarpo e (b) a gutação nos tecidos do hospedeiro, fornecendo, portanto, a umidade para germinação dos basidiósporos e a subsequente infecção (PURDY e SCHMIDT, 1996). As condições favoráveis para o desenvolvimento da doença, em geral, são: alta umidade, temperatura variando entre 15 °C e 29 °C, e uma distribuição favorável de chuvas (SALGADO, 1980).

Em seu habitat natural, as árvores de cacaueiro ocorrem espalhadas na densa floresta tropical, crescem relativamente de forma lenta e as flores e frutos são escassos. Ao contrário, o cacaueiro cultivado é plantado a altas densidades, é de idade uniforme e está submetido a um ambiente diferente do seu habitat natural e, portanto, sujeito a diferentes condições que propiciam o estabelecimento da doença. Nas plantações comerciais, a abundância de brotos e o crescimento reprodutivo estão, ao mesmo tempo, associados a condições climáticas que favorecem a infecção do hospedeiro e a esporulação de *C. pernicioso*. O perfil de defesa do hospedeiro contra a doença é, portanto, alterado numa situação de cultivo (SEGAL et al., 1980 In: Purdy e Schmidt, 1996). Especificamente para a vassoura-de-bruxa do cacaueiro na plantação; (a) existe um aumento da susceptibilidade do tecido do hospedeiro (brotos vegetativos, flores e frutos) que é síncrono entre as árvores, especialmente entre material genético similar; (b) O clima de cultivo favorece as infecções e propicia a condição de umidade e seca que promove a esporulação de *C. pernicioso*; e (c) a diversidade genética é freqüentemente reduzida (PURDY e SCHMIDT, 1996).

Atualmente, a única forma de controlar a doença é por meio da poda fitossanitária, que consiste na remoção dos tecidos infectados (RUDGARD e BUTLER, 1987). O controle por meio de fungicidas é dificultado pela necessidade de proteção constante dos tecidos meristemáticos, e no caso dos sistêmicos, pela inexistência de produtos capazes de atingir o micélio do patógeno no interior dos tecidos infectados (MCQUILKEN et al., 1988). A CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), um órgão criado pelo

governo federal, que tem como objetivo desenvolver técnicas para controlar a vassoura-de-bruxa, dispõe de cultivares tolerantes à doença, e em parceria com o CEPEC (Centro de Pesquisa do Cacau), desenvolveu um método de controle biológico baseado no fungo micoparasita *Trichoderma stromaticum* sp. Nov, antagônico ao *C. pernicioso* (BASTOS, 2000), e é denominado TRICOVAB.

Pesquisadores do CEPLAC, da Universidade Estadual de Santa Cruz, do CENARGEN (Centro Nacional de Recursos Genéticos) e da UNICAMP, se reuniram com o objetivo de sequenciar o genoma de *C. pernicioso*. Parte das seqüências foram produzidas a partir de uma biblioteca “Shot Gun” de todo o genoma e parte está relacionada ao transcriptoma do fungo. Entre as muitas seqüências já identificadas, destacam-se genes que codificam para quitinases, celulasas e hidrofobinas, que podem estar envolvidas nos processos que o fungo usa para invadir a planta, e outros processos importantes para a patogenicidade do fungo. A validação funcional dessas seqüências depende da aplicação de técnicas de engenharia genética neste microrganismo, tais como a transformação e metodologias para mutagênese insercional. Por meio dessas técnicas é possível introduzir seqüências de DNA exógeno e inativar genes de interesse, como por exemplo, genes de patogenicidade e virulência, possibilitando a determinação da importância de genes que codificam proteínas de função desconhecida.

Algumas das estratégias utilizadas nos estudos de genoma funcional dependem de um sistema de transformação bem estabelecido para o organismo alvo. A transformação é uma técnica que possibilita realizar deleções, interrupções, substituições, silenciamento pós-transcricional de um gene alvo e a determinação da rota subcelular de um produto gênico por meio da introdução de construções carregando genes repórter (de BACKER et al., 2000; BRAKHAGE e LANGFELDER, 2002). A transformação é, portanto, uma ferramenta indispensável para a caracterização genética e compreensão das vias biológicas de diversos organismos.

A técnica de transformação começou a ser utilizada em fungos filamentosos na década de 70 (MISHRA e TATUM, 1973). No início, utilizou-se o DNA total para transformar conídios intactos de *Neurospora crassa* e não foi comprovada a presença física do DNA doador na célula hospedeira. Posteriormente, CASE et al. (1979) descreveram e comprovaram pela primeira vez a transformação de protoplastos de *N. crassa* com um plasmídeo de bactéria contendo um gene do próprio fungo. Desde então, um número crescente de trabalhos envolvendo transformação em fungos vêm sendo publicados (para uma revisão sobre o assunto, ver FINCHAM, 1989; TIMBERLAKE e MARSHALL, 1989; MULLINS e KANG, 2001; RUIZ-DÍEZ, 2002).

Em fungos filamentosos, são geralmente empregados plasmídeos para a transformação. Embora existam descrições de plasmídeos capazes de replicar de maneira autônoma no fungo (ALEKSENKO e CLUTTERBUCK, 1996), normalmente são empregados plasmídeos integrativos, que para serem mantidos na célula receptora devem recombinar com o DNA hospedeiro e replicar junto com ele. Ao se integrar, o plasmídeo pode entrar em uma região correspondente a um gene, provocando sua interrupção. Isso abre possibilidades de se empregar plasmídeos para a realização de mutagênese insercional. Para que um sistema de transformação seja utilizado em mutagênese insercional existem quatro requerimentos fundamentais: O primeiro é criar transformantes que exibam uma alteração fenotípica com uma quantidade mínima de plasmídeos integrados no genoma, de forma que seja fácil mostrar se há relação entre a alteração fenotípica e a inserção. Segundo, é importante que os transformantes obtidos possam ser facilmente identificados para o fenótipo desejado, sendo necessário um sistema de triagem fácil e rápido. Em terceiro está o procedimento de recuperação do gene interrompido no genoma do organismo, e que é a base do quarto requerimento, provar que o fenótipo do transformante é de fato resultado da mutação induzida. Aqui reside a questão de porque as integrações únicas são preferíveis às múltiplas, porque fica mais fácil provar a relação do gene com o fenótipo observado.

Em fungos que possuem ciclo sexual, a evidência da ligação do fenótipo mutante com o marcador é um indicativo seguro, enquanto que em fungos desprovidos do ciclo sexual, a comprovação é feita com a transformação da linhagem mutante com o gene completo recuperado, esperando-se que haja a restauração do fenótipo selvagem nos transformantes, ou ainda, a transformação da linhagem selvagem com o plasmídeo recuperado contendo parte do gene em questão, linearizado com a mesma enzima utilizada na recuperação, visando realizar a interrupção do gene residente e assim, recriar o fenótipo mutante (KAHMANN e BASSE, 1999).

A eficiência da manipulação de genes em fungos aumentou substancialmente nos anos recentes como resultado de duas inovações técnicas em particular: Integrações Mediadas por Enzima de Restrição (REMI) e Transformação Mediada por *A. tumefaciens* (ATMT).

de GROOT et al. (1998), mostraram que também é possível usar *Agrobacterium tumefaciens* para transformar fungos filamentosos. Nesse trabalho foi demonstrado que, para *Aspergillus awamori*, há um aumento de 600 vezes na eficiência de transformação em relação às técnicas convencionais (transformação de protoplastos ou eletroporação), com predominância de integrações aleatórias em cópia única no genoma. Tendo em vista o potencial da técnica, vem crescendo o número de trabalhos que descrevem a utilização de

ATMT para diversos fungos filamentosos, dentre estes, *Hebeloma cylindrosporum* (COMBIER et al., 2003), *Agaricus bisporus* (CHEN, et al., 2000) e *Coccidioidis immitis* (ABUODEH et al., 2000).

A técnica de REMI tem sido explorada em uma variedade de fungos: hemiascomicetos, ascomicetos, hemibasidiomicetos e basidiomicetos. REMI é uma modificação da técnica tradicional de mutagênese utilizando plasmídeos. Ela consiste na utilização do vetor linearizado juntamente com a enzima de restrição nos experimentos de transformação (SCHIESTL e PETES, 1991). REMI pode aumentar ou diminuir a eficiência de transformação dependendo do organismo, da enzima e da quantidade que esta é empregada. Na ausência da enzima de restrição, muitas vezes o vetor se integra em tandem. REMI, em alguns casos, pode favorecer inserções únicas do vetor em cada locus genômico (MAIER e SHAFER, 1999), o que facilita a recuperação do gene interrompido pelo plasmídeo (KAHMANN e BASSE, 1999).

Já foi sugerido que o grau de empacotamento do genoma pode influenciar os eventos de integração do plasmídeo. As regiões altamente transcritas são provavelmente mais susceptíveis à digestão com a enzima do que as regiões transcricionalmente inativas, pelo fato da estrutura da cromatina estar mais relaxada para permitir a expressão gênica (MAIER e SHAFER, 1999).

Tipicamente, a quebra na dupla fita gerada no cromossomo pela enzima de restrição será reparada pela incorporação do vetor ou pela religação mediada pelos sistemas de reparo da célula (MILNE et al., 1996). No entanto, para que a técnica funcione com eficiência, as concentrações e os tipos de enzimas de restrição utilizados devem ser otimizados empiricamente.

Mutações não ligadas à inserção do DNA transformante em um gene podem resultar do procedimento de REMI (SWEIGARD et al., 1998; LINNEMANSTÖNS et al., 1999). Estas incluem deleções de grandes e pequenas extensões do genoma e rearranjos cromossômicos. Portanto, é importante confirmar se as mutações obtidas estão associadas com o DNA exógeno integrado.

BROWN et al., (1998) avaliaram dez enzimas de restrição em diferentes concentrações na transformação de *Aspergillus fumigatus*. Em geral, baixas concentrações (cerca de 10U) de diversas enzimas estimularam a transformação. Dentre as enzimas testadas, *XhoI* e *KpnI* foram as que promoveram integrações de cópias únicas para a maioria dos transformantes analisados. Cerca de 50 e 76% das inserções ocorreram nos sítios de *XhoI* e

*KpnI*, respectivamente. Quando 50U ou mais de *KpnI* foram utilizadas, a frequência de transformação caiu drasticamente.

Em *Coprinus cinereus*, REMI possibilitou a obtenção de diversos mutantes defectivos para a esporulação, e foi possível a clonagem de um gene envolvido neste processo. Neste fungo, as integrações de cópias únicas representaram 60% dos casos examinados e o plasmídeo integrado foi flanqueado por sítios *KpnI* (a enzima utilizada) em mais de 53% dos casos (CUMMINGS et al., 1999).

LU et al., (1994) obtiveram dois mutantes insercionais para o lócus *Tox1* em *Cochliobolus heterostrophus* por meio de REMI. Estes mutantes não produziam a toxina e a clonagem deste lócus permitiu o estudo da estrutura dos genes de policetídeos sintases que o compõem.

Outro fungo onde REMI possibilitou um estudo dos genes envolvidos em fitopatogenicidade é *Magnaporthe grisea*, causador da doença da murcha em diversas gramíneas, inclusive arroz e cevada. SWEIGARD et al., (1998) geraram um banco de 5538 transformantes resistentes a higromicina B por REMI em *M. grisea*, para a triagem de genes envolvidos na patogenicidade. Este trabalho resultou na clonagem de sete genes *PTH* que desempenham alguma função na patogenicidade.

Um gene envolvido no transporte de enzimas cúpricas, na melanização e formação de apressório do fitopatógeno *Colletotrichum lindemuthianum* foi clonado por mutagênese insercional usando plasmídeo (PARISOT et al., 2002). *C. lindemuthianum* é o agente causal da antracnose do feijoeiro e a inativação deste gene neste trabalho é mais um exemplo do uso potencial de plasmídeos para gerar mutantes insercionais.

*Colletotrichum magna* é o causador da antracnose em curcubitáceas. REDMAN et al. (1999), a partir de 14400 transformantes resistentes a higromicina B gerados por REMI, isolaram 176 mutantes não patogênicos e capazes de colonizar a planta testadora, mostrando a conversão de um fungo patogênico, a endofítico e não patogênico.

Em *Alternaria alternata*, Patotipo japonês que ataca plantas de ervilha, REMI foi usado para etiquetar genes requeridos para a biossíntese da toxina AK hospedeiro-específica. O fragmento de DNA que foi recuperado mostrou a presença de dois genes, *AKT1* e *AKT2*. O emprego de 100U de *HindIII* ou 50U de *BamHI* neste trabalho aumentou em torno de dez vezes a eficiência de transformação (TANAKA et al., 1999). Já em *Colletotrichum graminicola*, que ataca o milho, REMI aumentou a eficiência de transformação cerca de 27 vezes e de 667 transformantes analisados, dois foram defectivos na patogenicidade. Para um dos transformantes, a relação da inserção com a perda da capacidade de causar a doença foi

confirmada por análise de complementação com cosmídeo contendo a região genômica correspondente à inserção (THON et al., 2000).

A eficiência de transformação em basidiomicetos é baixa. Se a intenção for apenas a introdução de um gene em particular, uma baixa eficiência de transformação não é um problema grave. Contudo, protocolos mais eficientes são requeridos se o objetivo for clonagem funcional e inativação de genes. Fungos do filo Basidiomycota oferecem uma maior dificuldade na obtenção e regeneração de protoplastos. A protoplastização pode ser em alguns casos prejudicada devido à presença de grande quantidade de pigmentos, que é o que ocorre em *Pisolithus tinctorius* (ANUNCIACÃO et al., 1990). A dificuldade na regeneração é devido ao grande número de protoplastos anucleados, uma vez que há um pequeno número de núcleos por compartimento de hifa. Em uma amostra de protoplastos de *C. pernicioso*, por exemplo, 58,8% eram anucleados, 37,5% eram uninucleados e 3,55% eram binucleados (SANTOS, 2001).

Tendo em vista as dificuldades encontradas na transformação de alguns fungos, algumas modificações da técnica, relatadas na literatura, têm resultado em protocolos mais eficientes, viabilizando um estudo funcional nestes organismos. Algumas destas modificações incluem: a linearização do vetor utilizado, a defosforilação do vetor linearizado, o emprego de enzimas de restrição na mistura da transformação, a utilização de DNA fita simples, inibidores de nucleases, além de outras (MANCZINGER et al., 1997; KAHMANN e BASSE, 1999; IRIE et al., 2000; d'ENFERT et al., 1999 In: BRAKHAGE e LANGFELDER, 2002).

A adição de um DNA carreador à mistura pode aumentar a frequência de transformação. IRIE et al. (2001) utilizaram DNA do fago lambda ou DNA de esperma de salmão sonificado na forma fita dupla ou fita simples e obtiveram um aumento expressivo na eficiência de transformação do basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, sendo que, um aumento de cinquenta vezes foi observado quando o DNA carreador foi utilizado na forma fita simples. Infelizmente, foi detectada a incorporação deste DNA no genoma do fungo, o que não é interessante se a transformação é empregada como ferramenta para mutagênese, já que a recuperação do gene mutado fica dificultada porque não se sabe qual foi o evento de integração que resultou na interrupção do gene.

A utilização de inibidores de nucleases na transformação do fungo *Trichoderma viride* aumentou significativamente a frequência de transformantes obtidos em relação a experimentos onde os inibidores não foram empregados (MANCZINGER et al., 1997). Neste trabalho, as poliaminas espermina, spermidina e putrecina, juntamente com o ATA (ácido aurintricarboxílico), aumentaram expressivamente a eficiência de transformação.

Um aspecto importante no estabelecimento do protocolo de transformação é a escolha do gene marcador para a seleção dos transformantes. Os genes marcadores empregados nos vetores podem ser divididos em dois grupos funcionais: marcadores auxotróficos e marcadores para resistência a drogas. Uma das vantagens de se utilizar marcadores de seleção que conferem resistência a drogas é a sua natureza dominante, o que possibilita a transformação da linhagem selvagem sem a necessidade de obtenção de mutantes da mesma.

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPD) é uma das enzimas chaves na via glicolítica e em muitos microrganismos eucariotos, os genes que codificam GPD são expressos constitutivamente e em altos níveis (HOLLAND e HOLLAND, 1978). As seqüências promotoras de genes que codificam GPD têm sido eficientes para a expressão de genes heterólogos em vários fungos (BITTER e EGAN, 1984 In: Wolff e Arnau, 2002). O promotor *gpd* tem sido comumente usado para comandar a expressão do gene da fosfotransferase da higromicina B (*hph*), de *Escherichia coli*, que confere resistência à higromicina B (PUNT et al., 1987; MANCZINGER et al., 1997; CHEN et al., 2000). A higromicina B é um antibiótico aminoglicosídico que inibe a síntese de proteínas em eucariotos e procariotos por interferir com a translocação do ribossoma e causar erros de leitura. A enzima codificada pelo gene *hph* isolado de *E. coli* inativa o antibiótico por um mecanismo de fosforilação (GRITZ e DAVIS, 1983).

Um sistema de transformação para *Crinipellis pernicioso* baseado na resistência à higromicina B foi desenvolvido por LIMA et al. (2003). Neste trabalho, os transformantes obtidos apresentaram um elevado número de cópias do plasmídeo no genoma e uma baixa eficiência de transformação (cerca de 2 transformantes/ $\mu$ g de DNA plasmidial) é relatada. Essas características dificultam o emprego desse sistema para mutagênese insercional. Assim, esse trabalho procurou avaliar parâmetros favoráveis à melhoria na eficiência de transformação para *C. pernicioso* e à obtenção de transformantes com menor número de cópias integradas do plasmídeo. A determinação destes parâmetros é importante para o desenvolvimento de um sistema de transformação eficiente e reprodutível para a realização de estudos genéticos mais amplos neste fungo, cujos mecanismos moleculares da interação com a planta ainda estão pouco esclarecidos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Microrganismos e manutenção das culturas

A linhagem de *C. perniciosus* (biótipo C) usada neste estudo foi isolada em Santo Amaro, Bahia, Brasil. O fungo selvagem foi cultivado em meio BDA (batata, dextrose e ágar) da MERCK, modificado pela adição de 0,15% de caseína hidrolisada, 0,2% de extrato de levedura, 0,2% de peptona e 0,01% de solução de vitamina (0,2 mg de biotina, 10,0 mg de ácido *p*-aminobenzóico, 50,0 mg de piridoxina, 50,0 mg de tiamina, 100,0 mg de ácido nicotínico, 100,0 mg de riboflavina, 100 mL de água destilada). As linhagens transformantes foram mantidas no mesmo meio BDA contendo 50,0 mg de higromicina B/mL. As culturas foram incubadas a 27 °C e repicadas periodicamente a cada 10 dias.

### 2.2. Vetores de transformação

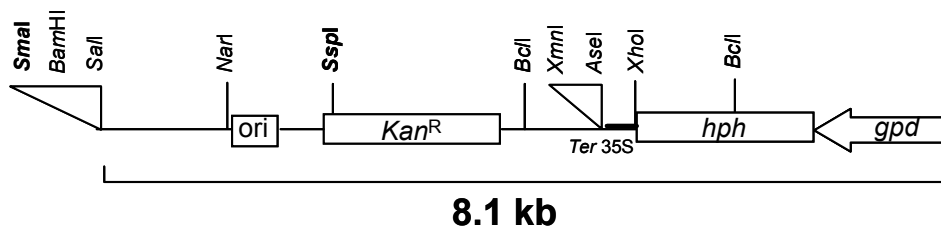
O plasmídeo pBHg foi obtido com o Dr Peter Romaine (Universidade do Estado da Pensilvânia, Pensilvânia - EUA) e contém o gene que codifica a fosfotransferase da higromicina B (*hph*) de *E. coli* fusionado ao promotor da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*gpd*) do basidiomiceto *Agaricus bisporus* e ao terminador da transcrição do gene da triptofano sintetase (*trpC*) (Figura 1).

O plasmídeo pAN7-1 (Punt et al., 1987) foi obtido com o Dr C.A.M.J.J. van den Hondel, Leiden, Holanda. Ele contém o gene *hph* de *E. coli* fusionado ao promotor *gpd* e ao terminador (*trpC*) de *Aspergillus nidulans* (Figura 2).

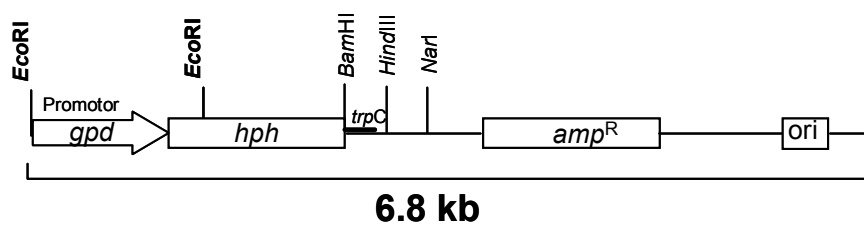
O plasmídeo pHCP foi construído pela excisão do cassete que contém o gene *hph*, o promotor *gpd* e o terminador *trpC* do plasmídeo pBHg com as enzimas de restrição *SspI* e *SmaI* e a subsequente subclonagem desse cassete no sítio *SmaI* do plasmídeo pBluescript SK+ (Stratagene).

### 2.3. Extração de plasmídeos

Os plasmídeos foram isolados a partir de *E. coli* DH5 $\alpha$  usando o kit de extração plasmidial em grande escala da Qiagen.



**Figura 1** Mapa de restrição simplificado do plasmídeo pBHg. Os sítios de restrição apresentados são únicos na seqüência do plasmídeo.



**Figura 2** Mapa de restrição simplificado do plasmídeo pAN7-1 com os sítios de restrição mais relevantes.

## 2.4. Obtenção dos protoplastos

Discos de micélio crescido em meio BDA modificado foram transferidos para placas de Petri contendo meio batata-glicose líquido modificado (500 g/L de batata, 10 g/L de glicose, 2 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de peptona, 1,5 g/L de caseína hidrolisada, 1 mL/L de solução de vitaminas) e incubados por 8 dias a 27 °C e sem agitação. O micélio foi coletado e triturado assepticamente em liquidificador, juntamente com 50 mL de meio malte líquido (1,7 g/L de extrato de malte Sigma, 5 g/L de extrato de levedura Sigma, e 50 mL/L de glicerol Merck). Três mililitros da suspensão de micélio triturado foram inoculados em 50 mL de meio malte líquido. A cultura foi incubada por três dias sob agitação de 200 RPM em agitador rotatório a 27 °C. O micélio foi coletado por centrifugação em várias camadas de gaze e lavado com estabilizador osmótico (KCl 0,8 M, tampão fosfato 10 mM, pH 5,8) para retirada do excesso de meio de cultura. O micélio foi digerido com a enzima Glucanex® (Novo Nordisk) numa proporção de 150 mg de enzima/ 100 mg de BSA/ 10 mL de estabilizador osmótico para cada 2 g de massa úmida de micélio, com agitação de 80 RPM a 30 °C e durante 3 horas. Após filtragem para remoção dos fragmentos de hifas, os protoplastos foram centrifugados a 2,7 g por 10 minutos a 4°C para a retirada da enzima e em seguida, lavados por três centrifugações em 5 mL de ST (sorbitol 1M, tris-HCl 100 mM) a 2,7 g, 4°C, por 10 minutos. Ao final das lavagens, o sedimento de protoplastos foi ressuspensionado em STC (sorbitol 1M, tris-HCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 50 mM) para uma concentração final de 10<sup>8</sup> protoplastos/mL. Os protoplastos foram mantidos em gelo até o momento da transformação.

## 2.5. Transformação de *C. perniciosus*

A transformação de *C. perniciosus* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Yelton et al., (1984) e Ballance & Turner (1985), com algumas modificações. No experimento de transformação controle, o DNA plasmidial e 50 µL de PEG 6000 25% (preparado em SCT) foram adicionados a 150 µL da suspensão de protoplastos (o volume final da mistura de transformação em todos os procedimentos foi mantido sempre em 200 µL pela adição de SCT). As variações deste procedimento foram realizadas visando avaliar a influência de diferentes fatores na eficiência de transformação e nos tipos de integrações resultantes. Esses tratamentos incluíram: a adição de inibidores de nucleases, como o ATA

(ácido aurintricarboxílico), putrecina e espermidina, cada um na concentração de 10 mM e a adição de enzimas de restrição (REMI) na mistura da transformação.

REMI foi realizado com o plasmídeo pBHg e 10U da enzima *Bam*HI (PROMEGA). As variantes de REMI envolveram a transformação com o plasmídeo previamente clivado com *Bam*HI e desproteíneo duas vezes com fenol-clorofórmio (1:1), adicionando-se mais enzima no momento da transformação, e com o plasmídeo na forma circular, sendo que a enzima foi adicionada ao plasmídeo imediatamente antes da transformação.

Para se avaliar a influência do promotor na transformação de *C. perniciosa*, foi utilizado o plasmídeo pAN7-1 na quantidade de 10 µg, cuja eficiência de transformação foi comparada com a do plasmídeo pBHg em um experimento onde foram utilizadas 10 µg desse plasmídeo na forma circular.

A mistura foi incubada em gelo por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 500 µL da mesma solução de PEG 6000 a 25% e a mistura foi mantida à temperatura ambiente por 20 minutos, sendo em seguida plaqueada em meio BDA estabilizado osmoticamente com sacarose 0,5 M. As placas foram incubadas a 27 °C por um período de três dias quando então foram recobertas com uma camada de cinco mililitros de meio BDA semi-sólido contendo higromicina B, de forma que a concentração final do antibiótico em cada placa ficasse em 100 µg/mL. Após 15 dias, algumas colônias transformantes foram transferidas para meio BDA modificado contendo higromicina B (50 µg/mL).

Para cada experimento, foram feitos controles da regeneração dos protoplastos em meio BDA sem estabilizador e BDA com sacarose 0,5M, plaqueando-se diferentes diluições da suspensão de protoplastos. As placas controles foram incubadas nas mesmas condições que as placas dos tratamentos da transformação. Após sete dias, a frequência de regeneração dos protoplastos foi calculada.

## **2.6. Extração de DNA dos transformantes**

Discos de micélio das colônias transformantes foram transferidos para placas de Petri contendo meio Batata-glicose líquido modificado e higromicina B (50 µg/mL). As placas foram incubadas a 27°C por sete dias, sem agitação. O micélio foi coletado, lavado em água destilada autoclavada para retirada do excesso de meio, secado em papel absorvente e armazenado em pacotes de papel alumínio. O micélio foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido antes de ser estocado a -80 °C. Para a extração do DNA, o micélio foi

macerado com o auxílio de almofariz e pistilo de porcelana em nitrogênio líquido. Os demais procedimentos para extração se basearam na técnica descrita por SPEACHT et al. (1982).

## **2.7. Análises moleculares dos transformantes**

As análises das integrações dos plasmídeos no genoma do fungo foram realizadas de acordo com a técnica descrita por SAMBROOK et al. (1989). O DNA foi digerido com enzimas de restrição apropriadas, que clivam uma vez o vetor (*Bam*HI ou *Xho*I), separado por tamanho em gel de agarose a 0,8% e transferido para membrana de náilon por capilaridade. Foram utilizados os kits para marcação a frio e detecção da Amersham Pharmacia, de acordo com as recomendações do fabricante. As hibridizações foram realizadas em condições de alta estringência (65 °C/SSC 0,2X/SDS 0,1%) e a sonda utilizada foi o plasmídeo pBHg linearizado.

## **2.8. Teste de estabilidade dos transformantes**

A estabilidade de nove transformantes possuindo padrões de integração conhecidos foi verificada pelo subcultivo sucessivo em meio BDA modificado na ausência do agente seletivo (higromicina B). Fragmentos de hifa foram transferidos a cada oito dias para novo meio e ao final de 40 dias, fragmentos de micélio de cada colônia foram transferidos novamente para meio seletivo contendo higromicina B a 100 µg/mL para determinar se as colônias ainda retinham o marcador de seleção.

## **2.9. Determinação do nível de resistência à higromicina B**

Nove transformantes, cujo padrão de integração dos plasmídeos foi determinado por Southern blot, e o isolado selvagem foram analisados para o nível de resistência a diferentes concentrações de higromicina B. Fragmentos de hifa foram transferidos para meio BDA modificado contendo higromicina B nas concentrações: 0, 20, 50, 100, 300 e 500 µg/mL e incubados a 27 °C por 6 dias.

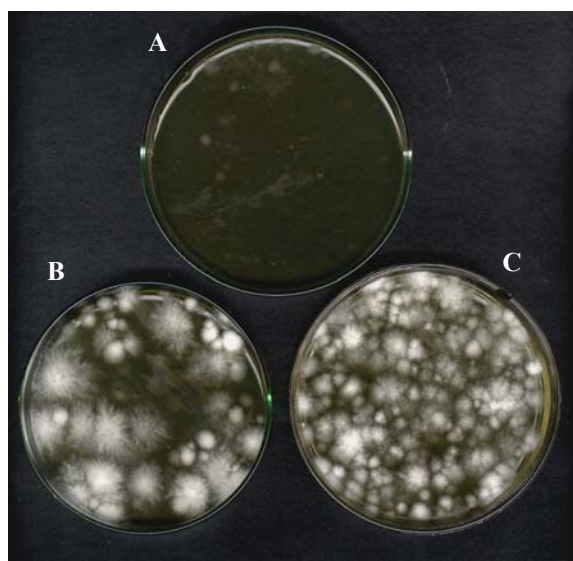
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Eficiência de transformação em função do promotor utilizado

Para verificar a eficiência de transformação em função do promotor utilizado para expressar o gene *hph*, foram realizados experimentos onde foram empregados os plasmídeos pAN7-1, que contém o gene *hph* sob o controle do promotor do gene *gpd* do ascomiceto *Aspergillus nidulans* e o plasmídeo pBHg, que contém o gene *hph* sob o controle do promotor do gene *gpd* do basidiomiceto *Agaricus bisporus*. Em ambos experimentos foram utilizados 10 µg dos plasmídeos na forma circular. A eficiência de transformação obtida com o plasmídeo pAN7-1 foi de 4 transformantes/µg de plasmídeo. Os primeiros transformantes com pAN7-1 puderam ser visualizados com cerca de 15 dias após o plaqueamento. Já a eficiência de transformação com o plasmídeo pBHg variou de 20 a 31 transformantes/µg de plasmídeo circular e os primeiros transformantes puderam ser visualizados aos sete dias. Em torno de 15 dias foi obtido o número máximo de colônias transformantes em todas as placas. O promotor de *Agaricus* proporcionou uma eficiência de transformação mais elevada e os transformantes foram mais vigorosos, provavelmente devido a uma maior quantidade da proteína fosfotransferase da higromicina B que é expressa, anulando mais eficientemente o efeito tóxico do antibiótico (Figura 3).

A eficiência de transformação de *Crinipellis pernicioso* com o plasmídeo pBHg é relativamente alta, tendo em vista que para basidiomicetos, de uma forma geral, as eficiências descritas na literatura não são elevadas. LIMA et.al. (2003) ao empregarem plasmídeo pAN7-1 na transformação de *C. pernicioso* obtiveram uma eficiência de 1,6 a 2,5 transformantes/µg de plasmídeo. Para *Magnaporthe grisea*, a eficiência de transformação obtida utilizando-se o plasmídeo pAN7-1 foi de 20–30 transformantes/µg de plasmídeo (KACHROO et al., 1997), e para *Laccaria laccata*, 5–50 transformantes/µg do mesmo plasmídeo (BARRETT et al., 1990). Um sistema de transformação homóloga utilizando o gene URA1 como marcador foi desenvolvido para o basidiomiceto *Agrocybe aegerita* e, neste caso, uma baixa eficiência é relatada, cerca de 1 a 26 transformantes/µg de plasmídeo (NOEL e LABARERE, 1994). Para o basidiomiceto ectomicorrízico *Lyophyllum shimeji* a eficiência descrita foi de 3,4 transformantes/µg de DNA (SAITO et. al., 2001). Neste trabalho, foi utilizado um vetor que contém o gene *hph* com promotor e terminador do gene *gpd* homólogo. Os dois últimos trabalhos citados são exemplos de que nem sempre uma boa eficiência de transformação é obtida, mesmo com a utilização de seqüências regulatórias homólogas, mas que também

existem questões como a fisiologia do microrganismo ou a adequação do protocolo de transformação que também estão relacionados à eficiência de transformação. A questão da eficiência do promotor é discutida em alguns trabalhos (RIDDER e OSIEWACZ, 1992; MARMEISSE et al., 1992). A reduzida eficiência de transformação poderia ser devido ao mal reconhecimento dos cis-elementos dos promotores de genes de ascomicetos em basidiomicetos.



**Figura 3** Efeito dos promotores pAN7-1, pBHg e da enzima de restrição *Bam*HI na eficiência de transformação de *C. perniciosus*. Plasmídeos pAN7-1 circular (A), pBHg circular (B) e pBHg + 10U de *Bam*HI (C). Os tratamentos pertencem a um mesmo experimento e em todos foram utilizados 10 µg de DNA plasmidial. Notar o aspecto das colônias após 15 dias de crescimento.

### 3.2. Influência da forma do vetor, da presença de inibidores de nucleases e de REMI na eficiência de transformação

A linearização de pBHg não alterou a eficiência de transformação em comparação com a utilização da forma circular (Tabela 1). O primeiro relato da utilização de DNA linear para a transformação foi descrito para *S. cerevisiae* e resultou em uma alta eficiência de transformação em relação ao DNA circular (SUZUK et al., 1983). Em *Aspergillus* spp., a linearização do DNA transformante também resultou em um aumento da eficiência de transformação (UNKLES et al., 1989). Em contrapartida, HERRERA-ESTRELLA et al. (1990) relataram uma significativa diminuição da eficiência de transformação em *Trichoderma* spp. quando o vetor linearizado foi empregado. Em *Penicillium griseoroseum* a linearização do vetor também resultou em uma menor eficiência de transformação (LOPES, 2001). Semelhante a *C. pernicioso*, a linearização do DNA transformante em *Colletotrichum graminicola* também não influenciou a eficiência de transformação (THON et al., 2000).

LEVIS et al., (1997) propõem que o aumento na eficiência de transformação resultante do processo de linearização do DNA transformante, para o caso de vetores que possuem homologia com o genoma do fungo, advém do fato deste procedimento expor a região de homologia, favorecendo a integração por recombinação em sítio homólogo. Por outro lado, extremidades expostas de um fragmento de DNA linear são mais susceptíveis à degradação por exonucleases intracelulares. GOEDECK et al., (1994) relata que diferentes organismos podem apresentar uma atividade exonucleásica intracelular diferenciada, o que poderia refletir na eficiência de transformação, principalmente quando se considera a transformação com vetores lineares, uma vez que estes são mais susceptíveis à degradação por exonucleases. Portanto, as diferenças observadas em relação à eficiência de transformação resultante com a linearização do vetor para diferentes organismos poderiam ser consequência dessa atividade exonucleásica intracelular.

Em relação aos tratamentos onde foram empregados os inibidores de nucleases, ocorreu uma diminuição acentuada na eficiência de transformação quando ATA e putrecina foram utilizados. Espermidina não influenciou a eficiência de transformação (Tabela 2). Em contrapartida, quando ATA, putrecina e espermidina (todos na concentração 10 mM) foram utilizados na transformação de *Trichoderma viride* eles promoveram um aumento aproximado de nove, quatro e dezessete vezes, respectivamente, em relação a tratamentos onde não estiveram presentes (MANCZINGER et al., 1997). Em um outro trabalho de transformação, que envolveu o fungo *Paecilomyces fumosoroseus* (CANTONE e VANDENBERG, 1999), a

utilização do ATA (1 mM) parece ter aumentado a eficiência de transformação cerca de 7 vezes. Nesse trabalho, os autores relatam que o ATA foi empregado em tratamentos cujos períodos de regeneração dos protoplastos, antes do recobrimento com o meio seletivo, foi estendido. Não há, portanto, uma definição clara de quão relevante foi a atuação do ATA em relação à extensão do período de regeneração dos protoplastos. A diminuição da eficiência de transformação de *Crinipellis* causada por ATA e putrecina pode ser consequência de um efeito tóxico destas substâncias nas concentrações em que foram utilizadas.

A utilização da enzima de restrição *Bam*HI promoveu um aumento médio na eficiência de transformação de mais de três vezes no tratamento em que a enzima foi adicionada juntamente com o plasmídeo na forma circular à mistura de transformação em relação ao plasmídeo circular sozinho. Quando o plasmídeo foi previamente clivado, extraído com fenol-clorofórmio e mais enzima (10U) foi adicionada, o aumento observado foi de aproximadamente 1,8 vezes em relação ao plasmídeo linear sozinho. Portanto, é desnecessária a clivagem prévia do plasmídeo (Tabela 1). Em *Saccharomyces cerevisiae*, se o plasmídeo covalentemente fechado é transformado juntamente com a enzima de restrição, uma menor eficiência de transformação é observada em relação à forma previamente linearizada mais à enzima (MANIVASAKAM e SCHIESTL, 1998). Neste mesmo trabalho, os autores observaram que as enzimas *Bam*HI, *Bgl*II e *Kpn*I promoveram um aumento nas eficiências de transformação ao contrário das enzimas *Hind*III, *Eco*RI e *Sai*I (clivam produzindo terminais coesivos), e todas as outras que clivam produzindo terminais abruptos. Em contrapartida, para *Cochliobolus heterostrophus*, a enzima *Hind*III estimulou a transformação cerca de 20 vezes (LU et al., 1994). Em *Coprinus cinereus*, a enzima *Eco*RI estimulou a eficiência de transformação cerca de sete vezes (GRANADO et al., 1997) e a enzima *Sal*I em *Lentinus edodes* elevou a eficiência de transformação em mais de 10 vezes (SATO et al., 1998). MANIVASAKAM e SCHIESTL (1998) discutem que a capacidade reduzida de algumas enzimas em promover os eventos de integração, seja devido ao fato de que (a) as enzimas talvez não entrem na célula, (b) se elas entram, talvez elas não sejam ativas no ambiente celular e (3) talvez elas sejam degradadas após a entrada. Todas estas possíveis explicações estão sujeitas à diversidade de características fisiológicas apresentadas por diferentes organismos, assim, de fato é de se esperar que cada organismo constitua um sistema à parte a ser analisado.

**Tabela 1** Influência da forma do vetor e da adição da enzima de restrição *Bam*HI na eficiência de transformação. Os valores expressam o número de transformantes por micrograma de DNA.

Experimento	Tratamentos			
	pBHg C	pBHg L	pBHg C + 10U de <i>Bam</i> HI	pBHg L + 10U de <i>Bam</i> HI*
1	22	NR	71	NR
2	31	26	54	36
3	20	24	69	56
Média	24	25	65	46

NR – Não realizado;

C – Circular; L – Linear;

Cada tratamento foi proveniente da mesma preparação de protoplastos;

Cerca de  $10^6$  -  $10^7$  protoplastos foram utilizados em cada tratamento;

Em todos os experimentos e tratamentos foram utilizados 10 µg de DNA;

\* O plasmídeo, após clivado, foi extraído com fenol-clorofórmio e mais enzima foi adicionada no momento da transformação.

**Tabela 2** Influência de inibidores de nucleases na eficiência de transformação de *Crinipellis pernicioso*. Os valores expressam o número de transformantes por micrograma de DNA.

Experimento	Tratamentos							
	pBHg C	pBHg L	pBHg C + ATA	pBHg L + ATA	pBHg C + Pu	pBHg L + Pu	pBHg C + Es	pBHg L + Es
1	22	NR	NR	7	3	NR	22	NR
2	31	26	0	1	0	NR	24	9
3	20	24	NR	NR	NR	NR	52	37
Média	24	25	0	4	1,5	-	33	23

NR – Não realizado;

C – Circular; L – Linear; ATA – Ácido Aurintricarboxílico; Pu – putrecina; Es – espermidina;

Cada tratamento foi proveniente da mesma preparação de protoplastos;

Cerca de  $10^6$  -  $10^7$  protoplastos foram utilizados em cada tratamento;

Em todos os experimentos e tratamentos foram utilizados 10 µg de DNA;

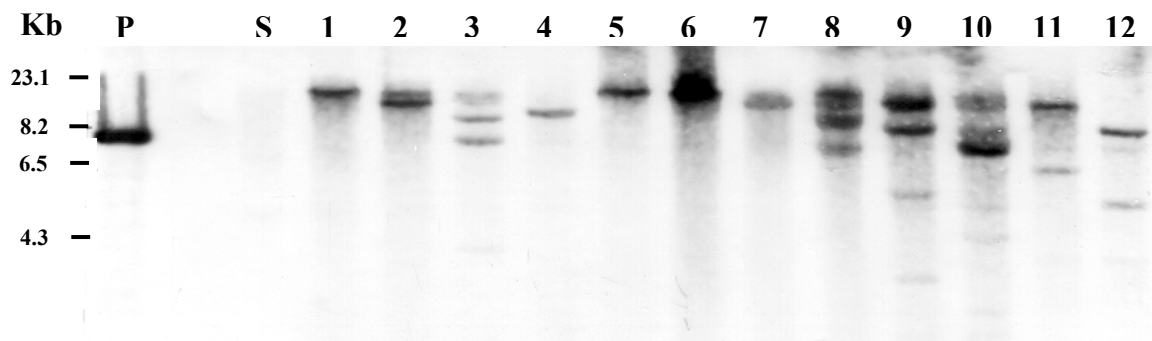
Cada inibidor de nucleases foi empregado na concentração de 10 mM.

Para investigar os eventos de integração ocorridos mediante os tratamentos onde o plasmídeo foi empregado na forma circular, linear e circular com a adição da enzima de restrição imediatamente antes da transformação, o DNA dos transformantes foi clivado com duas enzimas que possuem um único sítio de clivagem no vetor: *Bam*HI, a mesma enzima utilizada para REMI, e *Xho*I, que cliva a uma distância de 1368 pb do sítio de *Bam*HI. A utilização do vetor pBHg possibilitou a obtenção de transformantes cópia única, (Figuras 5 e 6, transformantes 1 e 4). Os transformantes 2, 7 e 11 apresentaram duas cópias do plasmídeo integradas em regiões distintas. Os transformantes 3 e 12 apresentaram duas cópias em tandem. Os transformantes 5, 6, 8, 9 e 10, apresentaram mais de duas cópias inseridas em posições distintas. A análise realizada com a enzima *Bam*HI para os transformantes do tratamento de REMI não mostrou a ocorrência de eventos de integração com conservação do sítio da enzima (REMI perfeito), pelo fato de não terem sido detectadas integrações únicas possuindo bandas de tamanho similar ao do plasmídeo.

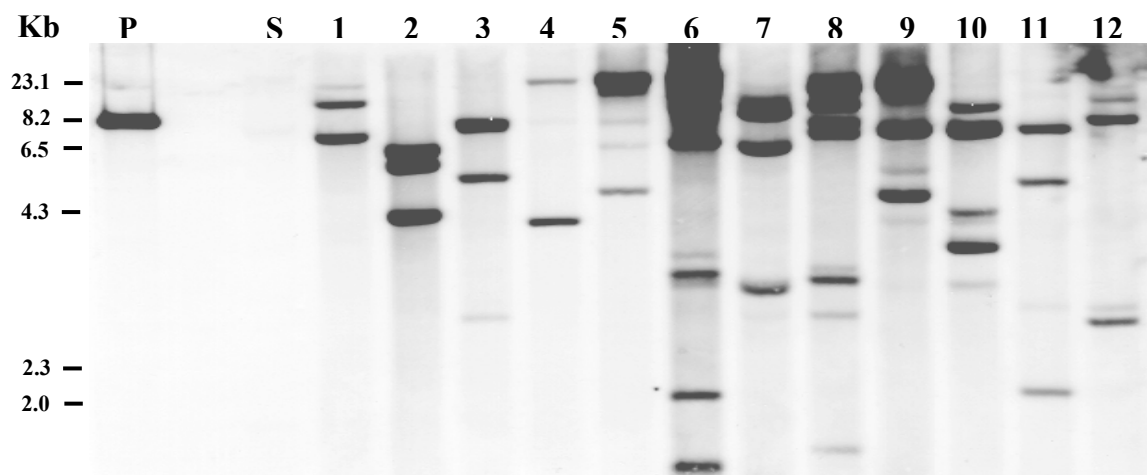
Em *Saccharomyces cerevisiae* 100% dos eventos de REMI utilizando as enzimas *Bam*HI, *Bgl*II e *Kpn*I conservam o sítio de integração (MANIVASAKAM e SCHIESTL, 1998). Já em *S. pombe*, quase 100% dos terminais coesivos são encurtados devido à perda de algumas bases ocasionando a perda do sítio palindrômico de reconhecimento da enzima, levando a crer que alguns organismos possuem uma atividade de exonuclease intracelular mais pronunciada que outros (GOEDECKE et al., 1994). Em fungos filamentosos, análises das junções de integração em experimentos de REMI realizados com *Alternaria alternata* patótipo ervilha e *Mycosphaerella zae-maydis* revelaram deleções dos sítios de restrição da enzima (TANAKA et al., 1999; YUN et al., 1998, respectivamente). Já em *Coprinus cinereus*, REMI perfeito com a enzima *Kpn*I ocorreu numa frequência de 53% para os transformantes analisados (CUMMINGS et al., 1999).

O processo de recuperação de genes interrompidos por plasmídeos envolve a clivagem do DNA genômico do transformante com uma enzima que não possua sítio no vetor, a circularização dos fragmentos de DNA gerados e a transformação e seleção de bactérias transformadas em meio contendo o antibiótico cujo vetor possua marca de seleção. Dessa forma, o processo é simplificado quando o número de cópias do vetor integradas no genoma do transformante em questão é menor, pois um menor número de clones positivos necessita ser analisado para se caracterizar o fragmento genômico que contém o gene de interesse mutado. O DNA de transformantes com cópias em tandem quando clivados com a enzima apropriada resultam em fragmentos tão grandes quanto maior for o tamanho do plasmídeo empregado. Outra forma de recuperação do fragmento do gene interrompido seria a

construção de um banco genômico do transformante e a recuperação de clones que hibridizam com o fragmento genômico resgatado. Já foi relatado que em alguns organismos REMI resulta em integrações em tandem em determinada proporção dos transformantes (SHI et al., 1995; GRANADO et al., 1997; ITOH e SCOTT, 1997). Isso poderia ser resultado da formação de concatâmeros do plasmídeo transformante antes da integração ou de sucessivas integrações em regiões genômicas possuindo outras cópias do plasmídeo integradas.



**Figura 4** Análise por hibridização do DNA dos transformantes clivados com *Bam*HI. (P) pBHg linear; (S) isolado selvagem não transformado; (1-12) transformantes; (1-4) pBHg circular; (5-8) pBHg linear; (9-12) pBHg circular + 10U de *Bam*HI.



**Figura 5** Análise por hibridização do DNA dos transformantes clivados com *Xho*I. (P) pBHg linear; (S) isolado selvagem não transformado; (1-12) transformantes; (1-4) pBHg circular; (5-8) pBHg linear; (9-12) pBHg circular + 10U de *Bam*HI.

### **3.3. Estabilidade dos transformantes**

O teste de estabilidade foi realizado com nove transformantes. Todos os transformantes foram capazes de crescer em meio seletivo contendo higromicina B após 40 dias de passagem em meio não seletivo. LIMA et al. (2003) observaram o mesmo resultado para os transformantes com o plasmídeo pAN7-1, 100% dos 40 transformantes analisados mantiveram o marcador de seleção após 25 dias em meio não seletivo. Isto indica que a construção de um banco de transformantes para triagem de mutantes é praticável, tendo em vista que os transformantes apresentam uma alta estabilidade mitótica.

### **3.4. Nível de resistência a higromicina B**

Nove transformantes foram analisados para o nível de resistência à higromicina B. O tipo selvagem não apresentou crescimento a 100 µg/mL, a mesma concentração utilizada para a seleção dos transformantes. A 50 µg/mL o selvagem ainda apresentava crescimento residual. Todos os transformantes toleraram uma concentração de higromicina B igual a 500 µg/mL (Figura 7).

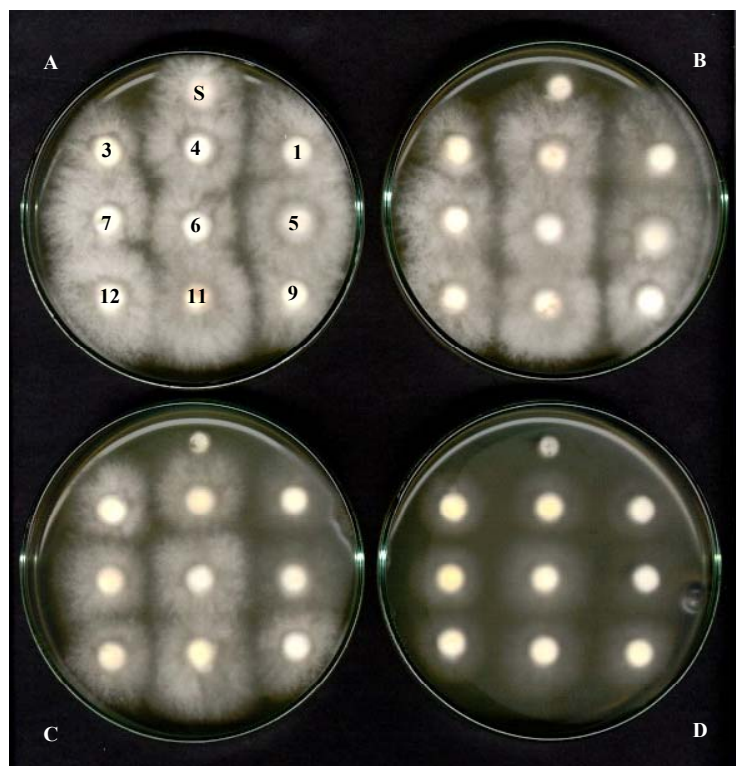
O transformante 3, que possui duas cópias em tandem, apresentou um nível de resistência bem superior ao transformante 12, que também apresenta duas cópias em tandem. Os transformantes 5 e 6 apresentaram mais de duas cópias inseridas em posições distintas. No entanto, o transformante 5 apresentou o mais elevado nível de sensibilidade enquanto o transformante 6, o mais elevado nível de resistência. Esses contrastes envolvendo número de cópias e níveis de resistência exemplificam bem a influência do efeito de posição. Os transformantes que apresentaram cópia única do pBHg (1 e 4) apresentaram um nível de resistência mediano (Tabela 3).

**Tabela 3** Sensibilidade dos transformantes de *C. pernicioso* a diferentes concentrações de higromicina B

Linhagens	Concentrações de Higromicina B ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	0	20	50	100	300	500
<b>Selvagem</b>	0	1,2	2,4	2,4	2,4	2,4
<b>1</b>	0	0,0	0,3	0,8	1,0	1,3
<b>3</b>	0	0,4	0,2	0,2	0,7	<b>0,7</b>
<b>4</b>	0	0,1	0,3	0,6	1,0	1,2
<b>5</b>	0	0,5	0,6	1,1	1,6	<b>1,9</b>
<b>6</b>	0	-0,3	0,1	0,1	0,3	<b>0,5</b>
<b>7</b>	0	0,0	0,3	0,3	1,1	1,1
<b>9</b>	0	-0,1	-0,1	-0,1	0,4	<b>0,5</b>
<b>11</b>	0	0,1	0,4	0,4	1,3	1,3
<b>12</b>	0	0,5	0,9	1,2	1,7	<b>1,8</b>

Cada valor na Tabela representa a variação de crescimento da colônia e é resultado da subtração do diâmetro das colônias crescidas em meio BDA sem higromicina B pelo valor do diâmetro da colônia crescida em BDA com higromicina B na concentração especificada. Assim, quanto maior a amplitude do valor em cada concentração, mais sensível é a colônia, por conseguinte, quanto menor o valor, menor foi a variação do crescimento frente à concentração analisada e, portanto, a colônia é menos sensível.

Foram utilizados inóculos da mesma idade e os discos de micélio possuíam um tamanho padronizado.

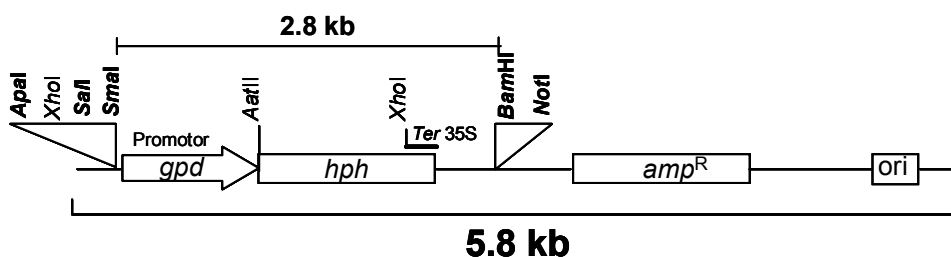


**Figura 6** Crescimento de transformantes de *Crinipellis pernicioso* em diferentes concentrações de higromicina B. (S) Selvagem; (A) 0 µg/mL; (B) 20 µg/mL; (C) 100 µg/mL e (D) 500 µg/mL As colônias cresceram durante 6 dias. Todas as placas são réplicas da placa máster (A).

### 3.5. Construção pHCP

Pelo fato do promotor *gpd* de *Agaricus bisporus* ter se demonstrado mais eficiente que o promotor de *Aspergillus nidulans* para a transformação de *Crinipellis pernicioso*, foi construído um vetor denominado pHCP, derivado do plasmídeo pBHg, e que possui 5.8 kb de tamanho, portanto, menor que o plasmídeo pBHg, que possui 8.2 kb (Figura 7).

O plasmídeo pHCP transformou *C. pernicioso* com uma eficiência comparável à do plasmídeo pBHg. A tabela abaixo apresenta a média de dois experimentos independentes empregando 10 µg de pBHg e pHCP na forma circular. Este vetor será útil para experimentos futuros de inativação e clonagem de genes



**Figura 7** Mapa de restrição do plasmídeo pHCP. Os sítios de restrição apresentados são únicos na seqüência do plasmídeo.

**Tabela 4.** Comparação entre as eficiências de transformação obtidas com os plasmídeos pBHg e pHCP.

Plasmídeos	Eficiência de transformação* (número de transformantes/µg de vetor)
pBHg	24
pHCP	20

\* Os valores apresentados são a média aritmética de dois experimentos

#### 4. CONCLUSÕES

O sistema de transformação desenvolvido neste trabalho foi eficiente para a obtenção de um grande número de transformantes em um único experimento. A utilização do promotor do gene *gpd* de *A. bisporus* elevou em aproximadamente cinco vezes a eficiência de transformação em *C. pernicioso* em relação à eficiência obtida quando o plasmídeo pAN7-1 foi utilizado. Na melhor condição de transformação observada no trabalho (10 µg de pBHg circular + 10U de *Bam*HI), houve um aumento de aproximadamente 25 vezes na eficiência de transformação em relação à transformação empregando o plasmídeo pAN7-1. Além disso, houve uma melhoria no desenvolvimento vegetativo dos transformantes em meio seletivo.

Das condições testadas, a transformação com o plasmídeo pBHg sozinho foi a que proporcionou os eventos de integração mais simples de serem caracterizados, sendo que 50% dos transformantes deste tratamento possuíram uma única cópia do plasmídeo integrada.

Todos os transformantes mantiveram a resistência à higromicina B após passagens sucessivas por meio não seletivo durante um período de 40 dias. A alta estabilidade mitótica apresentada pelos transformantes é importante para que os mutantes insercionais isolados a partir de bancos de transformantes não percam o plasmídeo ao longo dos testes de patogenicidade realizados nas plantas testadoras, o que poderia levar à reversão da mutação, prejudicando a análise dos resultados. Assim, também será importante futuramente, a realização de testes de estabilidade meiótica.

A construção pHCP transformou com uma eficiência comparável à obtida utilizando o plasmídeo pBHg. O fato de pHCP ser menor que pBHG faz dele um plasmídeo mais interessante para ser utilizado em experimentos de mutagênese insercional, pois quanto menor for o plasmídeo contendo o fragmento a ser recuperado, maiores são as chances de sucesso.

Principalmente aliada aos dados do seqüenciamento do genoma deste organismo ([www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura](http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura)), uma ferramenta como a transformação é de grande utilidade para estudos do genoma funcional de *Crinipellis pernicioso*, por permitir isolar e estudar a regulação de genes anotados, validando assim sua função biológica.

As informações existentes a respeito dos mecanismos moleculares da patogenicidade de *C. pernicioso* ainda são muito limitadas. Assim, um sistema de transformação eficiente poderá auxiliar no entendimento dos mecanismos gerais de fitopatogenicidade deste fungo geneticamente complexo e futuramente, delinear estratégias de controle da doença vassoura-de-bruxa do cacauero.

## 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUODEH, R. O.; ORBACH, M. J.; MANDEL, M. A.; DAS, A. e GALGANI, J. N. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. **The journal of infectious diseases**, 181: 2106-2110, 2000.
- ALEKSENKO, A. e CLUTTERBUCK. The plasmid replicator AMA1 in *Aspergillus nidulans* is an inverted duplication of a low-copy-number dispersed genomic repeat. **Molecular microbiology**, 19(3): 565-574, 1996.
- ANUNCIAÇÃO, C. E.; GUIMARÃES, W.V.; ARAÚJO, E. F.; MUCHOVEJ, R. M. e SOUZA, D. R. N. Production and regeneration of protoplasts of *Pisolithus tinctorius*. **Biotechnology techniques**, 4: 215-220, 1990.
- BALLANCE, D. J. e TURNER, G. Development of a high frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. **Gene**, 36: 321-331, 1985.
- BARRETT, V.; DIXON, R. K. e LEMKE, P. A. Genetic transformation of a mycorrhizal fungus. **Applied microbiology and biotechnology**, 33: 313-316, 1990.
- BASTOS, C. N. Retrospectiva e avanços no controle da vassoura-de-bruxa do cacauero. **Fitopatologia brasileira**, 25: (suplemento) 305-306, 2000.
- BASTOS, C. N., e ANDEBRHAN, T. Urucum (*Bixa orellana*): Nova espécie hospedeira da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauero. **Fitopatologia brasileira**, 11: 963-965, 1986.
- BASTOS, C. N. e EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis pernicioso* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant pathology**, 34: 306-312, 1985.
- BRAKHAGE, A. A. e LANGFELDER, K. Menacing mold: The molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. **Annual review of microbiology**, 56: 433-455, 2002.

- BROWN, J. S.; AFAUVRE-BROWN, A. e HOLDEN, D. W. Insertional mutagenesis of *Aspergillus fumigatus*. **Molecular and general genetics**, 259: 327-335, 1998.
- BROWN, S. J. e HOLDEN, D. W. Insertional mutagenesis of pathogenic fungi. **Current opinion in microbiology**, 1: 390-394, 1998.
- CALLE, H.; COOK, A. A. e FERNANDO, S. Y. Histology of witches' broom caused in cacao by *Crinipellis pernicioso*. **Phytopathology**, 72 (11): 1479-1481, 1982.
- CANTONE, F. A. e VANDENBERG, J. D. Genetic transformation and mutagenesis of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumoroseus*. **Journal of invertebrate Pathology**, 74: 281-288, 1999.
- CASE, M. E.; SCHWEIZER, M.; KUSHNER, S. R. e GILES, N. H. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, 76:5259-5263, 1979.
- CHEN, X.; STONE, M.; SCHLAGNHAUFER, C. e ROMAINE, C. P. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. **Applied and environmental microbiology**, October: 4510-4513, 2000.
- COMBIER, J. P.; MELAYAH, D.; RAFFIER, C.; GAY, G. e MARMEISSE, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. **FEMS microbiology letters**, 220: 141-148, 2003.
- CUMMINGS, W. J.; CELERIN, M.; CRODIAN, J.; BRUNICK, L. K. e ZOLAN, M. E. Insertional mutageneses in *Coprinus cinereus*: use of a dominant selectable marker to generate tagged, sporulation-defective mutants. **Current genetics**, 36: 371-382, 1999.
- De BACKER, M. D.; MAGEE, P. T. e PLA, JESUS. Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. **Annual reviews in microbiology**, 54: 463-498, 2000.

- De GROOT, M. J. A.; BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P. J. J. e BEIJERSBERGEN, A. G. M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. **Natural biotechnology**, 16: 839-842, 1998.
- D'ENFERT, C.; WEIDNER, G.; MOL, P. C. e BRAKHAGE, A. A. Transformation systems of *Aspergillus fumigatus*: new tools to investigate fungal virulence. Contributions to microbiology, Basel: Karger, 221 p. v. 2:149– 166, 1999.
- EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British mycological society**. 74: 515-523, 1980
- GOEDECKE, W.; PFEIFFER, P. e VIELMETTER, W. Nonhomologous DNA end joining in *Schizosaccharomyces pombe* efficiently eliminates DNA double-strand-breaks from haploid sequences. **Nucleic acids research**, 22: 2094-2101, 1994.
- FINCHAM, J. R. S. Transformation in fungi. **Microbiological reviews**, março, 148-170, 1989.
- GRANADO, J. D.; KERTESZ-CHALOUPOKOVÁ, K.; AEBI, M. e KÜES, U. Restriction enzyme-mediated DNA integration in *Coprinus cinereus*. **Molecular and general genetics**, 256: 28-36, 1997.
- GRIFFTH, G. W. e HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicioso*. **Heredity**, 72: 278-289, 1994.
- GRIFFTH, G. W.; BRAVO-VELASQUEZ, E.; WILSON, F. J.; LEWIS, D. M. e HEDGER, J. N. Autecology and evolution of the witches' broom pathogen (*Crinipellis pernicioso*) of cocoa. Cap 15. In: **Ecology of plant pathogens**. Ed. CAB Internacional, 1994.
- GRITZ, L. e DAVIES, J. Plasmid encoded higromycin B resistance: the sequence of higromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, 25: 179-188, 1983.

- HERRERA-ESTRELA, A.; GOLDMAN, G. H. e VAN MONTAGU, M. High efficiency transformation system for the biocontrol agent *Trichoderma* spp. **Molecular microbiology**, 4: 839-843, 1990.
- HOLLAND, M. J. e HOLLAND, J. P. Isolation and identification of yeast messenger ribonucleic acids coding for enolase, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, and phosphoglycerate kinase. **Biochemistry**, 17: 4900-4907, 1978.
- IRIE, T.; YOICHI, H.; TAKASHI, W. e MASAACKI, K. Efficient transformation of filamentous fungus *Pleurotus ostreatus* using single-strand carrier DNA. **Applied microbiology and biotechnology**, 55: 563-565, 2001.
- ITOH, Y e SCOTT, B. Effect of de-phosphorilation of linearised pAN7-1 and of addition of restriction enzyme on plasmid integration in *Penicillium paxilli*. **Current genetics**, 32: 147-151, 1997.
- KACHROO, P.; POTNIS, A. e CHATTOO, B. B. Transformation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* to benomyl resistance. **World journal of microbiology and biotechnology**, 13:185-187, 1997.
- KAHMANN, R. e 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.
- LEVIS, C.; FORTINI, D. e BRYGOT, Y. Transformation of *Botrytis cinerea* with the nitrate reductase gene (*niaD*) shows high frequency of homologous recombination. **Current genetics**, 32: 157-162, 1997.
- LIMA, J. O.; dos SANTOS, J. K.; PEREIRA, J. F.; de RESENDE, M. L. V.; de ARAÚJO, E. F. e de QUEIROZ, M. V. Development of a transformation system for *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom in cocoa plants. **Current genetics**, 42: 236-240, 2003.

- LINNEMANSTÖNS, P.; VOB, T.; HEDDEN, P.; GASKIN, P. e 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.
- LOPES, F. J. F. **Transformação de *Penicillium griseoroseum* com os genes da nitrato redutase (*niaD*) e da proteína verde fluorescente (*gfp*)**. Tema de Monografia. Universidade Federal de Viçosa, 34p, 2001.
- LU, S.; LYNGHOLM, L.; YANG, G.; BRONSON, C.; YODER, O. C. e 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.
- MAIER, F. J. e SHAFER, W. Mutageneses via insertional or restriction enzyme-mediated integration (REMI) as a tool to tag pathogenicity related genes in plant pathogenic fungi. **Biological chemistry**, 380: 855-864, 1999.
- MANCZINGER, L.; KOMONYI, O.; ANTAL, Z. e FERENCZY, L. A method for high-frequency transformation of *Trichoderma viride*. **Journal of microbiological methods**, 29: 207-210, 1997.
- MANIVASAKAM, P., e SHIESTL, R. H. Nonhomologous end-joining during restriction enzyme-mediated DNA integration in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular biology**, 18(3): 1736-1745, 1998.
- MARMEISSE, R.; GAY, G.; DEBAUD, J. C. e CASSELTON, L. A. Genetic transformation of the symbiotic basidiomycete fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **Current genetics**, 22: 41-45, 1992.
- MCQUILKEN, M. P.; SUPRIADI e RUDGARD, S. A. Sensitivity of *Crinipellis pernicioso* to two triazoles fungicides in vitro and their effect on development of the fungus in cocoa. **Plant pathology**, 37: 499-506, 1988.

- MILNE, G. T.; JIN, S.; SHANON, K. B. e WEAVER, D. T. Mutations in two Ku homologs define a DNA-end joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cell biology**, 16: 4189-4198, 1996.
- MISHRA, M. C. e TATUM, L. Non-mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 70(12): 3875-3879, 1973.
- MULLINS, E. D. e KANG, S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. **Cellular and molecular life sciences**, 58: 2043-2052, 2001.
- MUSE, R.; COLLIN, H. A.; ISAAC, S. e HARDWICK, K. Effects of the fungus *Crinipellis perniciosus*, causal agent of witches' broom disease, on cell and tissue cultures of cocoa (*Theobroma cacao* L.) **Plant pathology**, 45: 145-154, 1996.
- NOEL, T. e LABARERE, J. Homologous transformation of the edible basidiomycete *Agrocybe aegerita* with the URA1 gene: characterization of integrative events and of rearranged free plasmids in transformants. **Current genetics**, 25(5): 432-437, 1994.
- ORCHARD, J.; COLLIN, H. A.; HARDWICK, K. e ISAAC, S. Changes in morphology and measurement of cytokinin levels during the development of witches' broom on cocoa. **Plant pathology**, 43: 65-72, 1994.
- PARISOT, D.; DUFRESNE, M.; VENEAL, C.; LAUGÉ, R. e LANGIN, T. *clap1*, a gene encoding a copper-transporting ATPase involved in the process of infection by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular genetics and genomics**, 268: 139-151, 2002.
- POUND, F. J. Cacao and witches' broom disease (*Marasmius perniciosus*). **A report on a recent visit to the Amazon region of Peru, September 1942-february 1943**. Department of agriculture of Trinidad and Tobago. Yuille's printerie, St. Augustine, Trinidad, 14p, 1943.

- PUNT, P. J.; OLIVER, R. P.; DINGEMANSE, M. A.; POUWELS, P. H. e van den HONDEL, C. A. M. J. J. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *E. coli*. **Gene**. 56: 117-124, 1987.
- PURDY, L. A. e SCHMIDT, R. A. Status of cocoa witches' broom: Biology, Epidemiology, and management. **Annual review of phytopathology**, 34: 573-594, 1996.
- REDMAN, R. S.; RANSON, J. C. e RODRIGUEZ, R. J. Conversion of the pathogenic fungus *Colletotrichum magna* to a nonpathogenic, endophytic mutualist by gene disruption. **Molecular plant-microbe interaction**, 12(11): 969-975, 1999.
- RESENDE, M. L.; NOJOSA, G. B. A.; AGUILAR, M. G.; SILVA, L. H. C. P.; NIELLA, G. R.; CARVALHO, G. A.; GIOVANINI, G. R. e CASTRO, R. M. *Crinipellis pernicioso* proveniente de um novo hospedeiro, *Heteropterys acutifolia* é patogênico ao cacauero. **Fitopatologia brasileira**, 25(10): 88-91, 2000.
- RIDDER, R. e OSIEWACZ, H. D. Sequence analysis of the gene coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) of *Podospora anserina*: use of homologous regulatory sequences to improve transformation efficiency. **Current genetics**, 21(3):207-13, 1992.
- RUDGARD, S. A. e BUTLER, D. R. Witches' broom disease on cocoa in Rondônia, Brazil: pod infection in relation to pod susceptibility, wetness, inoculum, and phytosanitation. **Plant pathology**, 36: 515-522, 1987.
- RUIZ-DÍEZ, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. **Journal of applied microbiology**, 92: 189-195, 2002.
- SATO, T.; YAEGASHI, K.; ISHII, S.; HIRANO, T.; KAJIWARA, S.; SHISHIDO, K. e ENEI, H. Transformation of the edible basidiomycete *Lentinus edodes* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. **Biosciences and Biotechnological Biochemistry**, 62(12):2346-50, 1998.

- SAITO, T.; TANAKA, N. e SHINOZAWA, T. A transformation system for an ectomycorrhizal basidiomycete, *Lyophyllum shimeji*. **Biosciences and Biotechnological Biochemistry**, 65(8):1928-31, 2001.
- SALGADO, C. L. In: **Manual de Fitopatologia**. Volume 2. Ed. Agronômica Ceres Ltda. São Paulo-SP, 587 pg., 1980.
- SANTOS, J. K. **Obtenção e regeneração de protoplastos de *Crinipellis pernicioso*, agente etiológico da vassoura-de-bruxa no cacauero (*Theobroma cacao* L.)**. Tese de mestrado em Microbiologia Agrícola – Universidade Federal de Viçosa, 40p., 2001.
- SCHIESTL, R. H. e 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. e LEUNG, H. Enhanced transformation in *Magnapothe grisea* by restriction enzyme mediated integration of plasmid DNA. **Phytopathology**, 85: 329-333, 1995.
- SILVA, S. D. V. M. e MATSUOKA, K. Histologia da interação *Crinipellis pernicioso* em cacaueros susceptíveis e resistentes à vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia brasileira**, 24(1): 54-59, 1999.
- SINHA, K. e BHATNAGER, D. **Mycotoxins in agriculture and food safety**. Marcel Dekker, New Cork, 1998.
- SPEACHT, C. A.; DIRUSSO, C. C.; NOVOTNY, C. P. e ULLRICH, R. C. A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Analytic biochemistry**, 119: 158-163, 1982.
- SUZUK, K.; IMAI, Y.; YAMASHITA, I. e FUKUI, S. In vivo ligation of linear DNA molecule to circular forms in the yeast *Sacharomyces cerevisiae*. **Journal of bacteriology**, 155: 747-754, 1983.

- SWEIGARD, J. A.; CARROL, A. M.; FARRAL, L.; CHUMLEY, F. G. e VALENT, B. *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. **Molecular plant-microbe interaction**, 11(5): 404-412, 1998.
- TANAKA, A.; SHIOTANI, H.; YAMAMOTO, M. e 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 interaction**, 12(8): 691-702, 1999.
- THON, M. R.; NUCKLES, E. M. e VAILLANCOURT, L. J. Restriction Enzyme-Mediated Integration used to produce pathogenicity mutants of *Colletotrichum graminicola*. **Molecular plant-microbe interactions**, 13(12): 1356-1365, 2000.
- TIMBERLAKE, W. E. e MARSHALL, M. A. Genetic engineering of filamentous fungi. **Science**, 244: 1313-1317, 1989.
- TOVAR, G. La escoba de bruja del cacao, *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer: descripción de síntomas de la enfermedad. **Agromonia colombiana**, 8(1): 227-239, 1991.
- UNKLES, S. E.; CAMPBELL, E. I.; CARREZ, D.; GRIEVE, C.; CONTRERAS, C.; CONTRERAS, R.; FRIES, W.; van den HONDEL, C. A. M. J. J. e KINGHORN, J. R. Transformation of *Aspergillus niger* with the homologous nitrate reductase gene. **Gene**, 78: 157-166, 1989.
- WAKELING, S. A. Review of production, consumption, stocks and prices. **Cocoa Grow. Bull.** 47:2-19, 1994.
- WOLFF, A. M. e ARNAU, J. Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloides* (Syn. racemosus) and use of the *gpd1* promoter for recombinant protein production. **Fungal genetics and biology**, 35: 21-29, 2002.
- YELTON, M. M.; HAMER, J. E. e TIMBERLAKE, W. E. Transformation of *Aspergillus nidulans* using a *trpC* plasmid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 81: 1470-1474, 1984.

YUN, S. H.; TURGEON, B. G. e YODER, O. C. REMI-induced mutants of *Mycosphaerella zae-maydis* lacking the poliketide PM-toxin are deficient in pathogenesis to corn. **Physiological and molecular plant pathology**. 52: 53-66.

#### **Referências retiradas da internet**

FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em 25 de novembro de 2003.

Laboratório de Genômica e Expressão-UNICAMP. **Projeto Genoma *Crinipellis perniciosa***. Disponível em: <<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>>. Acesso em 19 de novembro de 2003.

QUADROS, Maria José. Produtor de cacau tenta renovar lavouras. **Herbário**. Disponível em: <<http://www.herbario.com.br/bot/agri/prcacau.htm>>. Acesso em: 25 de novembro de 2003.