

## NOURSEOTRICINA ACETIL-TRANSFERASE: UMA NOVA MARCA DE SELEÇÃO PARA *Colletotrichum* sp.

Igor Kelvyn Cavalcante LOBO<sup>1</sup> ; Rogério Eiji Hanada<sup>2</sup>; Nelcimar Reis SOUSA<sup>3</sup>; Gilvan Ferreira da SILVA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/FAPEAM/INPA; <sup>2</sup>Orientador INPA/COTI; <sup>3</sup>Colaboradora – Embrapa Amazônia Ocidental;

<sup>4</sup>Coorientador – Embrapa Amazônia Ocidental

### 1.Introdução

*Colletotrichum* sp. é um fungo que se aloja no interior de tecidos aparentemente saudáveis da planta (Martinez *et al.*, 2009), sendo responsável pelas principais doenças de frutos em pós-colheita, como pêssego, maçã, tomate, além de frutíferas como a bananeira e o guaranazeiro. (Bernstein *et al.*, 1995; Ardi, *et al.*, 1998). O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) tem importância social e econômica no Brasil, sendo que tal produção acaba sendo prejudicada pela antracnose, causada por *Colletotrichum guaranicola* (Bentes e Barreto, 2004; Atroch, *et al.*, 2010). A infecção inicia-se na cutícula e parede celular das folhas, atingindo a epiderme e o parênquima, com rápida necrose (Bentes e Barreto, 2004).

A transformação genética é o primeiro passo para estudar a função de genes em organismos. A transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) apresenta inúmeras vantagens em relação aos métodos convencionais realizados a partir de protoplastos, e o gene *gfp* tem sido utilizado para monitoramento dos padrões de expressão e detecção de fungos no hospedeiro e em substratos (Saitoh *et al.*, 2008). ATMT também é utilizada em trabalhos com silenciamento de gene tanto por meio de deleção (*knockout*) e RNA de interferência (*knockdown*), quanto por mutagênese insercional (Okamoto *et al.*, 2010; Paz *et al.*, 2011).

Fungos do gênero *Colletotrichum* sp. já foram transformados com diferentes marcas de seleção, principalmente com o gene que confere resistência a higromicina, *hph* (Meir, *et al.*, 2009; Auyong *et al.*, 2011). O objetivo deste trabalho foi construir e validar um novo vetor binário, portando o gene de resistência ao antibiótico nourseotricina (*nat1*) e gene repórter *gfp*, desenvolvendo desta forma uma nova marca de seleção para *Colletotrichum* sp..

### 2.Material e Métodos

#### 1.1. Construção do vetor binário pGWGFP-NAT

Um fragmento de 811 pares de base contendo o gene que confere resistência a nourseotricina *nat1* e o terminador, *TEF-Term* foi amplificado a partir do vetor pLR1 e, posteriormente, clonado no vetor doador **pDONR P5-P2** (Invitrogen), originando o *entry* clone **pENTRNAT**. Os *primers* utilizados na reação de PCR (*attb2F*- 5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGACACTGGTGGCGGCGTTAG-3' e *attb5R* – 5'- GGGGACAACCTTTGTATACAAAAGTTGTTATGGGTACCACTCTTGACGAC-3') tiveram as regiões de recombinação desenhadas segundo o Manual do Usuário (Invitrogen). As reações de clonagens foram mediadas pela enzima BP Clonase II (Invitrogen), conforme recomendações do fabricante. A construção do vetor **pGWGFP-NAT** foi realizada partir dos *entry* clones **pENTRGFP** (previamente construído neste trabalho e que contém o gene repórter *gfp* e os promotores *P<sub>trpC</sub>* e *P<sub>toxA</sub>*) e **pENTRNAT**. A montagem do cassete foi mediada pela enzima LR Clonase II (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante, e como vetor destino foi utilizado o vetor **pPGW** (Ugent).

### 1.2. Testes de concentração letal

Os testes de dose letal para o isolado 2510 de *Colletotrichum* sp. foram realizados com os esporos coletados diretamente de colônias do fungo crescido em meio BDA, a 25 °C. A obtenção dos esporos foi feita por meio da raspagem dos mesmos, dispostos sobre as colônias, previamente umedecidos com água estéril. Em seguida, foram colocados em tubo Falcon contendo 5 mL de água estéril, sendo, posteriormente, contados em câmara de Neubauer e diluídos para  $10^6$  esporos. Foram, então, avaliadas concentrações de 30, 50, 80 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de nourseotricina.

### 1.3. Transformação de *Colletotrichum* sp.

A transformação foi realizada utilizando a linhagem AGL-1 de *Agrobacterium tumefaciens*, portando o plasmídeo **pGWGFP-NAT**. Os esporos foram obtidos conforme já descrito. O co-cultivo foi preparado com  $10^6$  esporos, na proporção volumétrica de 1:1 (esporos:bactérias), sendo incubado a 22 °C, por 48 horas. Após 48 horas, a mistura foi plaqueada em meio de cultura BDA, suplementado com 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de nourseotricina e 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de cefotaxima. As placas foram, então, incubadas a 25 °C.

### 1.4. Confirmação de transformantes por PCR e microscopia de fluorescência

O DNA dos transformantes foi extraído segundo Specht *et al.* (1982). Foram utilizados os primers ITS4 e ITS5 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' e 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3', respectivamente) para confirmar que todos os DNAs estavam em condições de amplificação. A confirmação da inserção do T-DNA no genoma de *Colletotrichum* sp. foi realizada utilizando os primers para a amplificação do fragmento *gfp*-promotores, os mesmos utilizados na construção do vetor de entrada.

A detecção da expressão da proteína verde fluorescente (GFP) foi realizada usando o microscópio de fluorescência Olympus Bx-51, do Laboratório de Genética Animal do INPA –CPBA. As imagens foram capturadas através do software Image –MC60.

## 3. Resultados e Discussão

Foi construído o vetor binário **pGWGFP-NAT**, portando uma nova marca de seleção para *Colletotrichum* sp.. O gene *gfp* é controlado pelo promotor *PtoxA*, de *Pyrenophora tritici-repentis* (Tomas *et al.*, 1990), e a marca de seleção (*nat1*) está sob o controle do promotor *PtpC*, de *Aspergillus nidulans* (Hamer *et al.*, 1987). A construção foi realizada de modo que a transcrição ocorra em orientação oposta entre os dois genes. A Figura 1 mostra o cassete montado representado na sua forma linear.

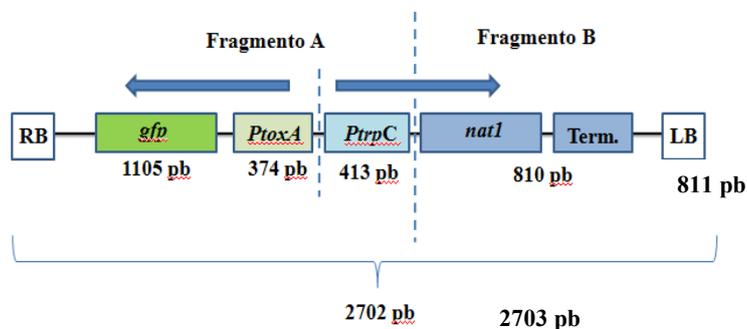


Figura 1. Cassete em forma linear. As bordas direita e esquerda estão indicadas como RB e LB, respectivamente. O cassete foi montado por meio da clonagem dos fragmentos A e B, usando o sistema Gateway.

Vetores binários utilizados para transformação, mediada por *A. tumefaciens* (ATMT), trazem inúmeras vantagens sobre os métodos tradicionais de transformação. ATMT gera uma alta porcentagem de transformantes com integração única do T-DNA no genoma, o que facilita o isolamento de genes de interesse. Além disso, transformações via *A. tumefaciens* não exigem protoplastos, podendo ser utilizados conídios, micélios, células intactas, em geral, simplificando mais ainda o processo de mutagenese, visto que o isolamento de protoplastos é laborioso (Michielse e Hooykaas, 2005).

A concentração de 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de nourseotricina mostrou-se letal aos esporos de *Colletotrichum* sp. e a transformação resultou em dois transformantes resistentes a nourseotricina (Figura 2), confirmados por microscopia de fluorescência (Figura 3) e PCR (Figura 4).

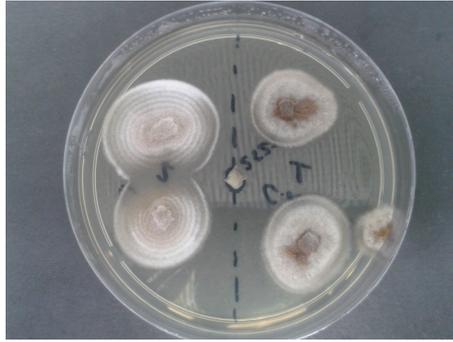


Figura 2. Transformantes crescendo em BDA suplementado com  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  de nourseotricina. A seta em vermelho aponta o selvagem replicado no meio dosado.

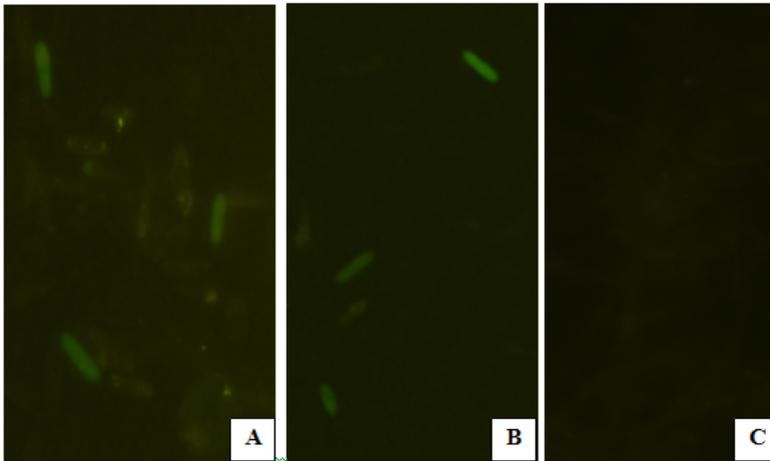


Figura 3. **A e B:** Esporos expressando a proteína GFP. **C:** Selvagem.

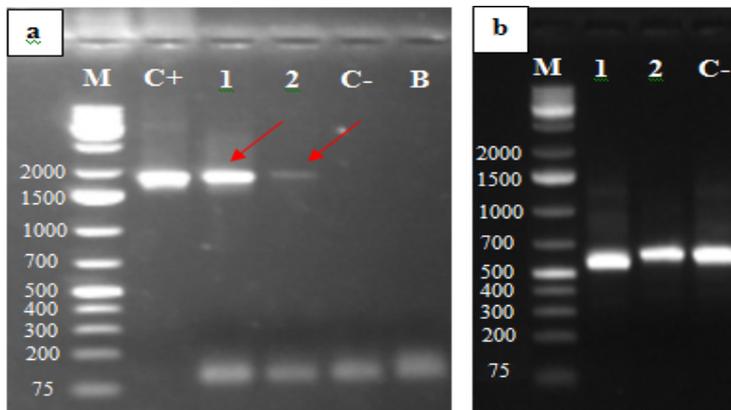


Figura 4. Gel de agarose 1%. **a:** Confirmação da presença do fragmento *gfp*-promotores, de aproximadamente 1900 pb, no genoma dos mutantes **1** e **2**. O vetor binário **pGWGFP-NAT** foi utilizado como controle positivo (**C+**). O DNA do selvagem (**C-**) não apresenta a banda e **B** representa o branco (sem DNA). **b:** Região ITS dos transformantes **1** e **2**, mais o selvagem (**C-**). **M:** Marcador 1 kb Plus SM 1331 (Fermentas).

Vários trabalhos com diferentes espécies de *Colletotrichum* sp. tem reportado o uso do antibiótico higromicina. Takahara *et al.* (2004) selecionaram os transformantes de *C. trifolii* com  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , bem como Tsuji *et al.* (2003) com *C. lagenarium* e Meir *et al.* (2009) com *C. coccodes*. Até o presente momento, este é o primeiro trabalho que utiliza a marca de seleção que confere resistência ao antibiótico nourseotricina (*nat1*) para transformação de uma espécie do gênero *Colletotrichum*.

#### 4. Conclusão

Foi encontrado como dose letal para *Colletotrichum* sp. a concentração de 80 µg mL<sup>-1</sup> de nourseotricina. O vetor **pGWGFP-NAT**, portando o gene de resistência a nourseotricina (*nat1*) e gene repórter (*gfp*), foi validado em *Colletotrichum* sp., sendo uma nova marca de seleção desenvolvida para o gênero.

### 5.Referências Bibliográficas

- Ardi, R.; Kobilier, I.; Jacoby, B.; Keen, N. T.; Prusky, D. 1998. Involvement of epicatechin biosynthesis in the activation of the mechanism of resistance of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53: 269-285.
- Atroch, A.L.; Filho, F.J.N.; Resende, M.D.V.; Lopes, R.; Clement, C.R. 2010. Avaliação e seleção de progênies de meios-irmãos de guaranazeiro. *Revista Ciências Agrárias*, 53(2): 123-130.
- Auyong, A.S.M.; Ford, R.; Taylor, P.W.J. 2011. Genetic transformation of *Colletotrichum truncatum* associated with anthracnose disease of chili by random insertional mutagenesis. *Journal of Basic Microbiology*, 51: 1-11.
- Bentes, J.L.S.; Barreto, R.W. 2004. Reavaliação taxonômica de *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque, agente causal da antracnose do guaranazeiro. *Acta Amazonica*, 34(1): 129-131.
- Bernstein, B.; Zehr, E.I.; Dean, R.A. 1995. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan and other hosts. *Plant Disease*, 79(5), 478-482.
- Hamer, J.E.; Timberlake, W.E. 1987. Functional Organization of the *Aspergillus nidulans* trpC Promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 7(7): 2352-2359.
- Martinez, G.C.; Giese, E.C.; Pereira, J.O.; Dekker, R.F.H.; Barbosa, A.M. 2009. Seleção de isolados de *Colletotrichum* da biodiversidade da Amazônia como produtores de lacases utilizando uma metodologia simplificada. *Semina: Ciências Agrárias*, 30(2): 397-405.
- Meir, S.; Larroche, C.; Al-Ahmad, H.; Gressel, J. Fungal transformation of *Colletotrichum coccodes* with bacterial oahA to suppress defenses of *Abutilon theophrasti*. *Crop Protection*, 28: 749-755.
- Michielse, C.B.; Hooymaas, P.J.J. 2005. Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr Genet*, 48: 1-17.
- Okamoto, T.; Yamada, M.; Sekiya, S.; Okuhara, T.; Taguchi, G.; Inatomi, S.; Shimosaka, M. 2010. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the vegetative dikaryotic mycelium of the cultivated mushroom *Flammulina velutipes*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74(11): 2327-2329.
- Paz, Z.; García-Pedrajas, M.D.; Andrews, D.L.; Klosterman, S.J.; Baeza-Montañez, L.; Gold, S.E. 2011. One Step Construction of *Agrobacterium*-Recombination-ready-plasmids (OSCAR), an efficient and robust tool for ATMT based gene deletion construction in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 48: 677-684.
- Saitoh, K.; Nishimura, M.; Kubo, Y.; Hayashi, N.; Minami, E.; Nishizawa, Y. 2008. Construction of a Binary Vector for Knockout and Expression Analysis of Rice Blast Fungus Genes. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 72(5): 1380-1383.
- Specht, C.A.; DiRusso, C.C.; Novotny, C.P.; Ullrich, R.C. 1982. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Analytical Biochemistry*, 119: 158-163
- Takahara, H.; Tsuji, G.; Kubo, Y.; Yamamoto, M.; Toyoda, K.; Inagaki, Y.; Ichinose, Y.; Shiraishi, T. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for random mutagenesis of *Colletotrichum trifolii*. *J Gen Plant Pathol*, 70: 93-96.
- Tomas, A.; Feng, G.H.; Reeck, G.R.; Bockus, W.W.; Leach, J.E. 1990. Purification of a Cultivar-Specific Toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of Tan Spot of Wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 3(4): 221-224.
- Tsuji, G.; Fujii, S.; Fujihara, N.; Hirose, C.; Tsuge, S.; Shiraishi, T.; Kubo, Y. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. *J Gen Plant Pathol*, 69: 230-239.