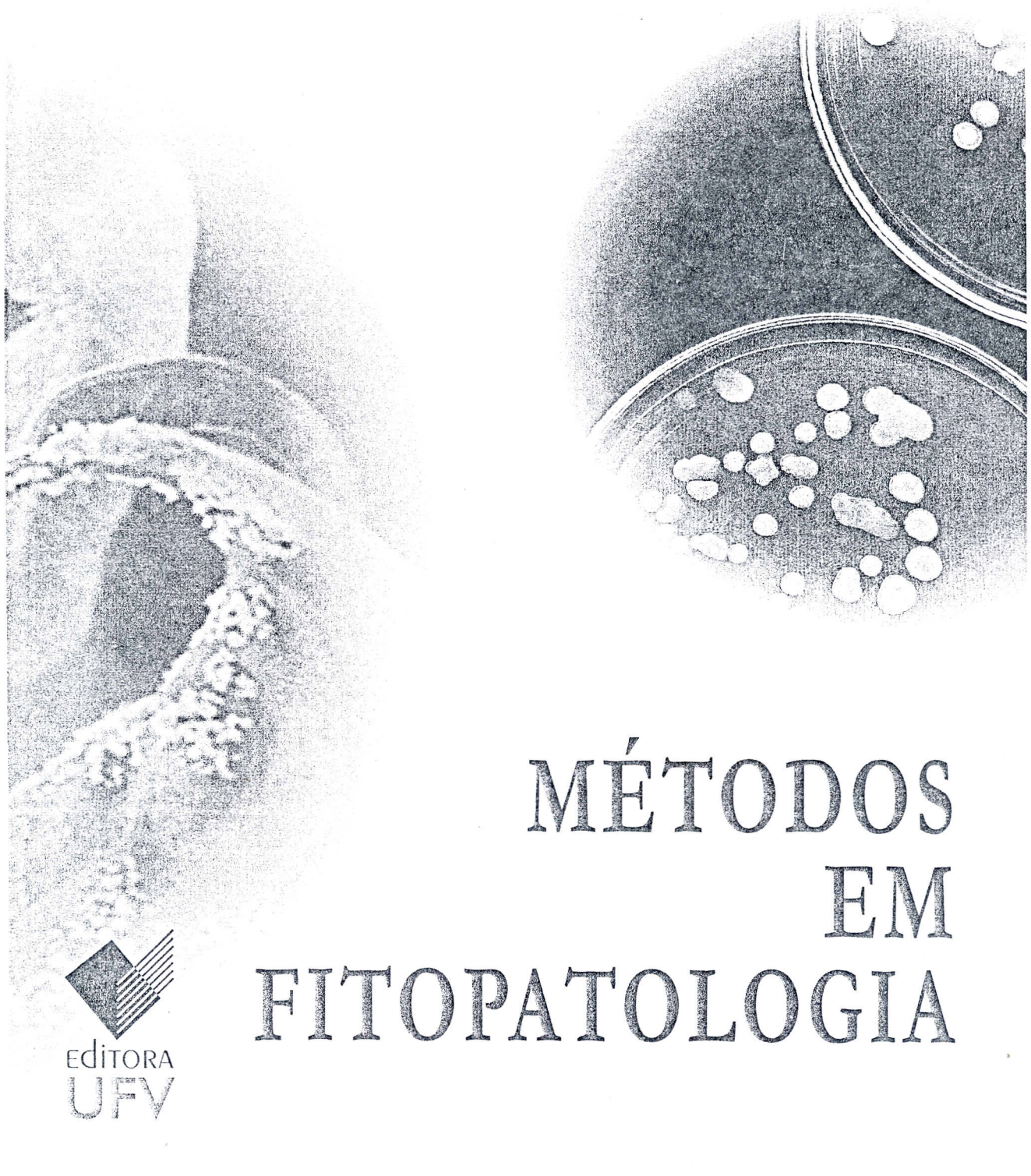


Editores: Acelino Couto Alfenas
Reginaldo Gonçalves Mafia



MÉTODOS EM FITOPATOLOGIA

Acelino Couto Alfenas – Ph. D.
Reginaldo Gonçalves Mafia – D. Sc.
Editores

MÉTODOS EM FITOPATOLOGIA



Universidade Federal de Viçosa
2007

© 2007 by Acelino Couto Alfenas e Reginaldo Gonçalves Mafia

Todos os direitos reservados. Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida sem a autorização escrita e prévia dos detentores do copyright.

Impresso no Brasil

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

M593
2007

Métodos em fitopatologia / Acelino Couto Alfenas, Reginaldo Gonçalves Mafia, editores.

– Viçosa : Ed. UFV, 2007.

382p. : il. ; 24 cm

ISBN: 978-85-7269-302-8

Inclui bibliografia e índice

1. Fitopatologia. 2. Fungos fitopatogênicos. 3. Bactérias fitopatogênicas. 4. Virus fitopatogênicos. 5. Nematóides fitopatogênicos. I. Alfenas, Acelino Couto. II. Mafia, Reginaldo Gonçalves.

CDD 22.ed. 632.3

Capa

Layout: Wagner de Azevedo Dornellas

Revisão lingüística: Edir de Oliveira Barbosa

Diagramação e editoração eletrônica: José Roberto da Silva Lana e Márcia Maria Brandão

Impressão e acabamento: Rona Editora Ltda.

Editora UFV

Edifício Francisco São José, s/n
Universidade Federal de Viçosa
Caixa Postal 251
36570-000 Viçosa, MG, Brasil
Tels. (0xx31) 3899-3139/2220
E-mail: editora@ufv.br

Pedidos

Tel. (0xx31) 3899-2234
Tel./Fax (0xx31) 3899-3113
E-mail: editoravendas@ufv.br
Livraria Virtual: www.livraria.ufv.br

Autores

Acelino Couto Alfenas

Departamento de Fitopatologia/Bioagro – Universidade Federal de Viçosa.
36570-000 Viçosa, MG – Tel. (31) 3899-2939 – Fax (31) 3899-2240 –
e-mail: aalfenas@ufv.br

Edival Ângelo Valverde Zauza

Departamento de Fitopatologia/Bioagro – Universidade Federal de Viçosa.
36570-000 Viçosa, MG – Tel. (31) 3899-2937 – Fax (31) 3899-2240 –
e-mail: edival@ufv.br

Eduardo Seiti Gomide Mizubuti

Departamento de Fitopatologia – Universidade Federal de Viçosa. 36570-000
Viçosa, MG – Tel. (31) 3899-1090 – Fax (31) 3899-2240 – e-mail:
mizubuti@ufv.br

Francisco Alves Ferreira

Departamento de Fitopatologia – Universidade Federal de Viçosa. 36570-000
Viçosa, MG – Tel. (31) 3899-1108 – Fax (31) 3899-2240 – e-mail: ffff@ufv.br

Francisco Murilo Zerbini

Departamento de Fitopatologia/Bioagro – Universidade Federal de Viçosa.
36570-000 Viçosa, MG – Tel. (31) 3899-2935 – Fax (31) 3899-2240
e-mail: zerbini@ufv.br

Jorge Fernando Pereira

Núcleo de Biotecnologia Aplicada a Cereais de Inverno - Embrapa Trigo - Rodovia
BR 285, km 294 - 99001-970 Passo Fundo, RS - Tel. (54) 3316-5964 - Fax
(54)3316-5801 – e-mail: jorge@cnpt.embrapa.br

José Rogério de Oliveira

Departamento de Fitopatologia – Universidade Federal de Viçosa. 36570-000
Viçosa, MG – Tel. (31) 3899-2626 – Fax (31) 3899-2240 – e-mail: jrogerio@ufv.br

Leandro Grassi de Freitas

Departamento de Fitopatologia/Bioagro – Universidade Federal de Viçosa.
36570-000 Viçosa, MG – Tel. (31) 3899-2925 – Fax (31) 3899-2240 – e-mail:
leandro@ufv.br

Luiz Antônio Maffia

Departamento de Fitopatologia – Universidade Federal de Viçosa. 36570-000
Viçosa, MG – Tel. (31) 3899-1091 – Fax (31) 3899-2240 – e-mail:
lamaffia@ufv.br

Olinto Liparini Pereira

Departamento de Fitopatologia – Universidade Federal de Viçosa. 36570-000
Viçosa, MG – Tel. (31) 3899-1096 – Fax (31) 3899-2240 – e-mail: oliparini@ufv.br

Poliane Alfenas-Zerbini

Departamento de Fitopatologia/Bioagro – Universidade Federal de Viçosa.
36570-000 Viçosa, MG – Tel. (31) 3899-2934 – Fax (31) 3899-2240 –
e-mail: palfenas@ufv.br

Reginaldo Gonçalves Mafia

Centro de Pesquisa e Tecnologia – CPT – Aracruz Celulose S.A. – Rod. Aracruz
– Barra do Riacho, km 25. 29197-000 Aracruz, ES – Tel. (27) 3270-2676
e-mail: rgoncalves@aracruz.com.br

Rivaldalve Coelho Gonçalves

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Acre – Laboratório
de Fitopatologia, BR 364, km 14. 69908-970 Rio Branco, AC – Tel. (68) 3212-
3236 – e-mail: riva@cpafac.embrapa.br

Rosângela D’Arc de Lima Oliveira

Departamento de Fitopatologia – Universidade Federal de Viçosa – 36570-000
Viçosa, MG – Tel. (31) 3899-1084 – Fax (31) 3899-2240 – e-mail: rdlima@ufv.br

Wânia dos Santos Neves

Departamento de Fitopatologia/Bioagro – Universidade Federal de Viçosa.
36570-000 Viçosa, MG – Tel. (31) 3899-2936 – Fax (31) 3899-2240 –
e-mail: wantiasantosneves@yahoo.com.br

10.1 Composição dos microscópios	195
10.2 Obtenção de fotomicrografias	196
11 MICROMETRIA	197
12 EDIÇÃO DE IMAGENS	201
13 EXERCÍCIOS	203
14 REFERÊNCIAS	203

9 PREPARAÇÕES E OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS DE ESPÉCIMES FÚNGICOS

Reginaldo Gonçalves Mafia e Acelino Couto Alfenas

1 INTRODUÇÃO	205
2 CONTROLE DA ILUMINAÇÃO	206
3 PREPARAÇÕES MICROSCÓPICAS	207
3.1 Preparo de lâminas microscópicas temporárias	208
3.1.1 Lâminas preparadas com fita adesiva	208
3.1.2 Lâminas de raspagem	209
3.1.3 Lâminas de cortes histológicos	210
3.1.4 Microcultura	213
3.2 Corantes e técnicas de coloração de núcleos	214
3.4 Coloração com Safranina O	216
3.5 Coloração pelo método Giemsa	216
4 EXERCÍCIOS	219
5 REFERÊNCIAS	219

10 MICROSCOPIA E SUAS APLICAÇÕES NO ESTUDO DAS INTERAÇÕES FUNGO-PLANTA

Olinto Liparini Pereira e Jorge Fernando Pereira

1 INTRODUÇÃO	221
2 TÉCNICAS MICROSCÓPICAS	223
2.1 Microscopia óptica	223
2.2 Microscopia de fluorescência	225

2.2.1 Técnicas imunocitoquímicas	225
2.2.2 Corantes fluorescentes	226
2.2.3 Proteínas fluorescentes verde, azul e vermelha	226
2.3 Microscopia de varredura a laser confocal (MVLC)	227
2.4 Microscopia eletrônica de transmissão – Imunolocalização	228
2.5 Microscopia crioelétrica	229
2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	229
2.7 Microscopia eletrônica associada à microanálise por raios X	229
3 MÉTODOS	230
3.1 Clareamento e coloração de estruturas fúngicas em folhas	230
3.1.1 Técnica de clareamento e coloração de fragmentos vegetais ..	231
3.1.2 Técnica de coloração de cortes por ácido periódico-Schiff	232
3.1.3 Reagente de Bell	233
3.1.4 Tionina e Orange G	234
3.1.5 Azul-de-Toluidina	234
3.1.6 Clareamento e coloração de estruturas fúngicas em raízes	235
3.1.7 Clareamento e coloração de estruturas fúngicas em tecidos lenhosos	237
3.1.8 Coloração de estruturas fúngicas em material embebido em resina	238
3.2 Histoquímica de compostos fenólicos em tecido vegetal	239
3.2.1 Compostos fenólicos gerais	239
3.2.2 Taninos - Vanilina clorídrica	242
3.2.3 Ligninas	242
3.3 Histoquímica de calose em tecido vegetal	243
3.3.1 Azul-de-Anilina “em luz azul”	243
3.3.2 Calcofluor White “em luz ultravioleta”	244
3.4 Estudo da interação fungo-planta pela introdução de gene repórter ..	244
3.4.1 Proteína verde fluorescente para estudos do crescimento e monitoramento de hifas fúngicas	245

3.4.2 Proteína verde fluorescente para análise da expressão de genes envolvidos na interação fungo-planta e localização de proteínas de interesse	246
4 EXERCÍCIOS	248
5 REFERÊNCIAS	248

11 MÉTODOS EM NEMATOLOGIA VEGETAL

*Leandro Grassi de Freitas, Wânia dos Santos Neves e
Rosângela D'arc de Lima Oliveira*

1 INTRODUÇÃO	253
2 AMOSTRAGEM	254
3 EXTRAÇÃO DE NEMATÓIDES	255
3.1 Extração de nematóides vermiformes do solo	256
3.2 Extração de cistos de <i>Heterodera glycines</i> a partir de solo seco	261
3.3 Extração de cistos de <i>Heterodera glycines</i> a partir de solo úmido: método da sacarose densa	262
3.4 Extração de nematóides das raízes	262
3.5 Extração de nematóides de partes aéreas de plantas	264
4 PREPARO DE LÂMINAS	264
4.1 Preparo de lâminas temporárias	264
4.2 Preparo de lâminas permanentes	265
5 COLORAÇÃO DE NEMATÓIDES	268
5.1 Método de coloração de nematóides no interior do sistema radicular de plantas com fucsina ácida	268
5.2 Método de coloração de massas de ovos de <i>Meloidogyne</i> spp. com fucsina ácida	270
5.3 Método de coloração de massas de ovos de <i>Meloidogyne</i> spp. com floxina B	271
5.4 Método de coloração de massas de ovos e ovos de <i>Meloidogyne</i> spp. com corantes da indústria alimentícia	271
6 INOCULAÇÃO DE NEMATÓIDES	272
6.1 Obtenção de ovos e de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne</i> spp. para infestação de solo	272

CAPÍTULO 10

Microscopia e suas Aplicações no Estudo das Interações Fungo-Planta

*Olinto Liparini Pereira
Jorge Fernando Pereira*

1 Introdução

Após a invasão do tecido do hospedeiro, fungos fitopatogênicos utilizam diferentes estratégias para obter nutrientes. Alguns são parasitas obrigatórios (biotróficos) e permanecem associados à planta hospedeira por todo o ciclo de vida, enquanto os necrotróficos rapidamente matam as células da planta para sua nutrição. Entre esses dois extremos estão os parasitas não-obrigatórios (hemibiotróficos), que dependem da planta para certos estádios do ciclo de vida (Kahmann e Basse, 2001). A estratégia de vida biotrófica ainda pode ser realizada de diferentes maneiras: intercelular, subcuticular, inter e intracelular, extracelular com haustório dentro das células da epiderme e intercelular com haustório dentro das células parenquimais (Mendgen e Hahn, 2002). Além de estabelecer uma relação de patogenicidade, os fungos também podem mediar a interface entre um organismo e seu ambiente físico e biológico, em troca de mecanismos que lhes garantam a sobrevivência, caracterizando uma relação mutualística (Pirozynski e Hawksworth, 1988).

Conhecer como a interação entre um patógeno fúngico e sua planta hospedeira ocorre é fundamental para aprimorar o tratamento das doenças, desenvolver novas estratégias de controle e entender como os sintomas da infecção são gerados. Por isso, o estudo das interações entre fungos e plantas tem sido o

foco de diversos grupos de pesquisa, empregando-se vários métodos, dentre os quais se destacam as técnicas de microscopia. O aperfeiçoamento dessas técnicas tem facilitado a visualização da íntima interação de fungos e plantas hospedeiras (Gold et al., 2001). Alguns dos diversos avanços no estudo das mudanças estruturais e moleculares de interações simbióticas ou fitopatogênicas entre fungos e plantas têm sido possíveis graças ao uso da microscopia de luz, do desenvolvimento de novos métodos de preparo de material para microscopia eletrônica de transmissão e varredura, do desenvolvimento da microscopia a laser confocal e da utilização de métodos especiais para localização de compostos específicos tanto em nível celular quanto molecular (Gold et al., 2001).

A microscopia eletrônica continua a gerar ótimos resultados, especialmente após a introdução de métodos imunocitoquímicos, que combinam alto poder de resolução com a localização de estruturas ou moléculas específicas. A microscopia óptica, apesar de possuir resolução bem menor que a do microscópio eletrônico, pode ser combinada com técnicas de biologia molecular, sendo utilizada, por exemplo, na análise de expressão de genes de interesse com o uso de genes repórteres como o GUS (β -D-glucuronidase). Grande popularidade tem sido alcançada pelo microscópio de fluorescência graças à introdução de novas sondas marcadas, compostos corantes fluorescentes e avanços em programas de imagem em fluorescência, sendo possível a visualização de fungos fitopatogênicos ou simbiontes em interação com o seu hospedeiro vegetal utilizando-se métodos não-destrutivos (Heath, 2000). Além disso, o aumento na facilidade de introduzir genes exógenos em células fúngicas, como o gene da proteína verde fluorescente, tem possibilitado a visualização do crescimento e da modificação das hifas fúngicas sem nenhuma manipulação experimental invasiva (Heath, 2000).

O objetivo deste capítulo é oferecer a estudantes, pesquisadores, professores e demais interessados no assunto uma breve noção sobre os diferentes tipos de microscopia e técnicas a eles associadas, hoje usualmente utilizadas no estudo da interação fungo-planta. Procurou-se fazer uma compilação de técnicas para a visualização de estruturas fúngicas no interior de tecidos vegetais e de histoquímica aplicada a alguns compostos envolvidos no processo de interação. As técnicas foram selecionadas com base em sua simplicidade, sem a necessidade de equipamentos sofisticados e de reagentes de fácil acesso. Eram técnicas passíveis de serem realizadas em laboratórios de fitopatologia, microbiologia, bioquímica e anatomia vegetal, entre outros, além de técnicas de estudo da interação fungo-planta pela introdução de gene repórter, recomendadas para laboratórios que trabalham com biologia molecular.

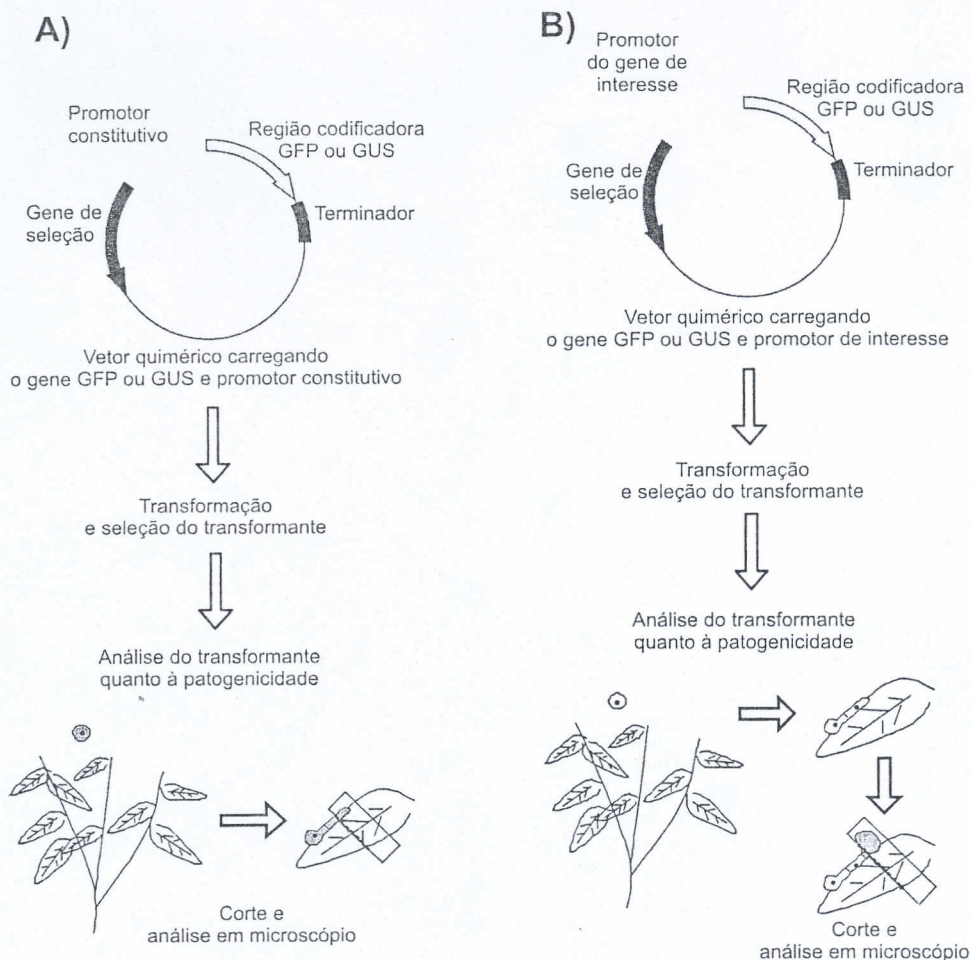
2 Técnicas Microscópicas

2.1 Microscopia óptica

Em estudos da interação fungo-planta, o microscópio óptico de luz tem sido utilizado para visualização de estruturas fúngicas no interior do tecido vegetal (como haustórios, hifas vegetativas, arbúsculos, vesículas, “pelotons”, microescleródios etc.). Principalmente quando aliado a técnicas de histoquímica, permite a visualização e localização de compostos e processos no tecido vegetal durante a referida interação.

Nessa interação fungo-planta, esse microscópio tem sido ainda utilizado para análise da expressão gênica em nível celular, tanto por hibridização *in situ* (Freytag et al., 1994) quanto pelo uso de genes repórteres visualmente detectáveis, como o GUS (β -D-glucuronidase) (Schweizer et al., 1999). Em fungos, a utilização de GUS pode ter dois objetivos básicos: marcador histoquímico da hifa e gene repórter para análise da expressão de um gene de interesse. Para isso, é necessário o uso de um vetor em que o gene da β -D-glucuronidase de *Escherichia coli* é colocado sob o controle de um promotor reconhecido pelo fungo. O promotor deve ser fortemente reconhecido pela maquinaria de transcrição do fungo para utilização de GUS como marcador histoquímico ou, então, ser o promotor de um gene de interesse, cujo objetivo é analisar o momento da expressão durante o desenvolvimento da doença (Figura 10.1). Esse vetor quimérico é introduzido na espécie fúngica de interesse, e um transformante é analisado quanto ao processo de patogenicidade. Decorrido o tempo de infecção no hospedeiro, amostras são coletadas, cortadas e colocadas para reagir com o substrato de GUS (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-GlcA). Essa reação gera um produto precipitado azul. O desenvolvimento do fungo pode ser acompanhado no microscópio óptico comum, estando o produto azul diretamente ligado à expressão de GUS, que está relacionada com a expressão do gene de interesse.

Outra forma de uso de um transformante GUS+ é a avaliação microscópica da eficácia de fungicidas. Essa possibilidade foi reportada por Doohan et al. (1998), que relataram que o gene repórter GUS permitiu a discriminação da eficiência de diferentes fungicidas contra o patógeno do trigo *Fusarium culmorum*, bem como de *F. oxysporum* (Couteaudier et al., 1993) e *F. moliniforme* (Yates et al., 1999).



Obs.: A fluorescência não é vista a olho nu, como indicado no esquema, mas somente com o uso do microscópio de fluorescência.

Figura 10.1 - Esquema da utilização do gene da β -D-glucuronidase de *Escherichia coli* e do gene da proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria* para estudos de expressão gênica e monitoramento do fungo no tecido do hospedeiro. No esquema está representado apenas o resultado da proteína verde fluorescente: **a)** Vetor contendo um promotor constitutivo para monitoramento do desenvolvimento do fungo no tecido do hospedeiro. Todo o micélio do fungo e outras estruturas, como esporos, emitem fluorescência; **b)** Uso de vetor contendo o promotor de um gene de interesse para analisar a expressão do gene. Hipoteticamente, o gene estaria relacionado à formação do apressório e somente seria expresso nessa estrutura.

2.2 Microscopia de fluorescência

O microscópio de fluorescência é um tipo de microscópio em que o comprimento de onda da luz incidente excita a molécula presente na preparação, e esta então emite uma luz com um novo comprimento de onda. Geralmente, a luz incidente possui comprimento de onda na faixa do ultravioleta (100 a 400 nm), e um filtro presente antes da lente objetiva permite apenas a passagem da luz excitada. Alguns componentes da célula podem ser naturalmente autofluorescentes, ou moléculas de fluorocromos podem ser adicionadas para agir como sondas em relação a constituintes ou processos celulares. A microscopia de fluorescência permite que proteínas específicas ou organelas sejam detectadas em materiais fixados e não-fixados, corados com corantes fluorescentes ou com anticorpos marcados com fluorescência. A movimentação de proteínas recombinantes fluorescentes (expressas ou microinjetadas) pode ser também observada em células vivas. Além disso, a fusão de promotores de genes de interesse com a região estrutural de proteínas fluorescentes pode ser feita para o estudo da expressão de genes.

2.2.1 Técnicas imunocitoquímicas

As técnicas imunocitoquímicas de fluorescência baseiam-se no uso de anticorpos ligados a compostos fluorescentes, nos quais auxiliam a visualização de estruturas ou proteínas específicas na célula. Uma molécula de um anticorpo reage com um único epitopo, uma configuração específica de aminoácidos ou resíduos de açúcar, por exemplo. Dessa forma, essas técnicas podem ser empregadas no estudo de possíveis determinantes de patogenicidade, incluindo a secreção de toxinas fúngicas e enzimas degradativas. Além disso, anticorpos podem ser produzidos para ligação em moléculas específicas de estruturas ligadas ao processo infectivo, como os apressórios. É importante ressaltar que, quando a molécula a ser localizada está no interior celular, é necessária a permeabilização do anticorpo. A grande vantagem dessas técnicas em relação a outras de localização por fluorescência (como a fusão de proteína verde fluorescente) é que não requerem nenhum sistema de transformação do fungo. Além disso, embora muito do entendimento que se tem da defesa do hospedeiro venha de estudos genéticos moleculares, o uso de anticorpos vem fornecendo dados importantes sobre a localização *in situ*, que é crucial para compreender o papel das respostas das plantas.

Uma técnica batizada de citologia molecular, que é a localização *in situ* de moléculas de interesse pela marcação com lecitinas, enzimas e anticorpos, e a visualização da marcação por um sistema fluorescente ou por ouro coloidal têm gerado importantes contribuições para a compreensão da estrutura e biologia de

fungos, tornando-se parte integral de estudos moleculares, genéticos e bioquímicos (Hardham e Mitchell, 1998). Na citologia molecular, o uso de anticorpos tem revelado detalhes na estrutura e função de compostos de células fúngicas e no processo de infecção – como na adesão de esporos, secreção de enzimas pela hifa invasora e diferenciação de estruturas de infecção –, além de evidenciar resposta do hospedeiro como reconhecimento do fungo invasor e modificações da parede celular em resposta à infecção (Hardham e Mitchell, 1998).

2.2.2 Corantes fluorescentes

Novos corantes fluorescentes, que se ligam a compostos celulares específicos como ácidos nucleicos, membranas ou organelas específicas, estão disponíveis no mercado. Esses corantes podem ser utilizados *in vivo* e são compatíveis com microscopia de fluorescência-padrão ou confocal. Vale ressaltar que, em alguns casos, o corante só pode se ligar ao seu alvo intracelular após microinjeção ou eletroporação. Com o uso de corantes, cuja fluorescência é proporcional à concentração de íons Ca^{2+} ou H^+ , a microscopia de fluorescência pode identificar locais de concentração de Ca^{2+} e medir o pH intracelular de células vivas, mesclando informações de morfologia ou arquiteturas com informações funcionais a respeito da composição e concentração de elementos na interface fungo-planta.

2.2.3 Proteínas fluorescentes verde, azul e vermelha

Proteínas fluorescentes são ótimas ferramentas para estudos da interação fungo-planta, sendo frequentemente utilizadas para monitorar o comportamento dos fungos dentro do tecido do hospedeiro em diferentes condições fisiológicas (Cormack, 1998). O gene que codifica a proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *green fluorescent protein*) foi clonado da água-viva *Aequorea victoria* em 1992 (Prasher, 1992) e, desde então, tem sido encontrado em uma grande variedade de espécies (Lorang et al., 2001).

O gene *GFP* selvagem pode não conferir uma fluorescência apreciável para muitos fungos, primariamente devido à baixa eficiência de tradução (Lorang et al., 2001). Têm-se desenvolvido variantes desse gene com otimização do uso de códons preferenciais para leveduras, plantas ou mamíferos. Essas proteínas variantes apresentam aumento tanto na fluorescência quanto na solubilidade. O seu enorme sucesso como gene repórter pode ser atribuído a características únicas dessa proteína de 238 aminoácidos e 26 KDa, que têm absorção máxima no comprimento de onda de 395 a 475 nm e emitem luz em um máximo de 508 nm. A fluorescência de GFP requer apenas luz ultravioleta ou luz azul e oxigênio.

Ao contrário de outros repórteres (β -glucuronidase, b-galacturonidase, chloramphenicol acetyltransferase e luciferase), que necessitam de co-fatores ou substratos para sua atividade, a observação *in vivo* da expressão de GFP é possível com células individuais, com populações de células, ou em organismos inteiros interagindo com outros organismos ou com o ambiente em tempo real. Complicações causadas pela destruição das amostras, permeabilização celular para os substratos ou liberação do produto não ocorrem. Essa proteína GFP é também extremamente estável *in vivo* e tem sido fusionada com a extremidade C ou N terminal de muitas proteínas celulares ou extracelulares sem perda da atividade, permitindo a análise de regulação de genes, localização de proteínas ou marcação de organelas específicas (Lorang et al., 2001).

Além da emissão de luz na região do verde, demonstrou-se que algumas variantes da GFP emitem luz na região do azul (Heim e Tsien, 1996), e, por ocorrer mutação pontual na região cromófora, onde a Tyr⁶⁶ foi modificada para His⁶⁶, eles foram designadas proteínas azuis fluorescentes (BFPs).

Outra proteína que apresenta características desejáveis para o estudo da interação fungo-planta é a vermelha fluorescente (DsRed) (Waal et al., 2000). DsRed é um homólogo de GFP, que é naturalmente encontrada nas partes coloridas do coral *Discosoma* sp. Essa proteína possui os pontos mais distantes de excitação e emissão de uma proteína fluorescente selvagem (558/583 nm) (Matz et al., 1999). E, por isso, a discriminação entre GFP e DsRed é fácil, o que faz de DsRed uma parceira ideal para sistemas de dupla marcação com GFP (Czymmek et al., 2002). Essa proteína foi introduzida em *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, verificando-se seu grande potencial para monitorá-la nos tecidos infectados do tomateiro (Nahalkova e Fatehi, 2003).

2.3 Microscopia de varredura a laser confocal (MVLC)

A microscopia de varredura a laser confocal é atualmente o tipo mais freqüentemente utilizado em combinação com sondas fluorescentes e proteína verde fluorescente. Com a MVLC, a iluminação é alcançada pela varredura de um ou mais focos de feixes de luz a laser através da amostra examinada. A amostra escaneada em diferentes focos é reconstruída tridimensionalmente por meio de processos de digitalização de imagens em computador.

A MVLC é particularmente interessante devido à sua alta sensibilidade e à possibilidade de se observarem sinais moleculares específicos, através das imagens tridimensionais geradas pelo seccionamento óptico do material, registrando e exibindo eventos no decorrer do tempo, sem a necessidade física de cortes do material biológico. Como exemplo, relata-se que a observação confocal de *Magnaporthe grisea* expressando a fusão EGFP1 e de um gene que codifica

calmodulina requerido para a formação do apressório (*CAMmg*) revelou que a expressão de *CAMmg* requer a fixação do conídio à superfície e é inibida por auto-inibidores da germinação. Além disso, a inibição de *CAMmg* pode ser revertida pela adição de alguns compostos do hospedeiro (Liu e Kolattukudy, 1999).

2.4 Microscopia eletrônica de transmissão – Imunolocalização

Aliada a anticorpos para alvos particulares, a microscopia eletrônica de transmissão tem sido amplamente utilizada para interpretar o papel de determinada proteína na patogenicidade. Metais pesados, como o ouro ou o ósmio, aparecem negros na micrografia, pois eles promovem a difração da maioria dos elétrons incidentes, uma vez que esses elétrons dispersos não são focados pelas objetivas eletromagnéticas e não formam imagem. O teróxido de ósmio cora preferencialmente certos componentes celulares como as membranas, as quais aparecem escuras em micrografias. Proteínas específicas podem ser detectadas em cortes ultrafinos, através do uso de partículas de ouro eletrodensas revestidas com proteína A, uma proteína bacteriana (isolada de *Staphylococcus aureus*) que se liga a moléculas de anticorpo inespecificamente (Figura 10.2). Primeiramente, o anticorpo é colocado em contato para interagir com seu antígeno específico em um corte ultrafino. Após a interação, o corte é tratado com o complexo Proteína A-partículas eletrodensas de ouro, de 5-7 nm de diâmetro. A ligação desse complexo ao domínio Fc da molécula do anticorpo faz da proteína alvo “visível” na microscopia eletrônica de transmissão.

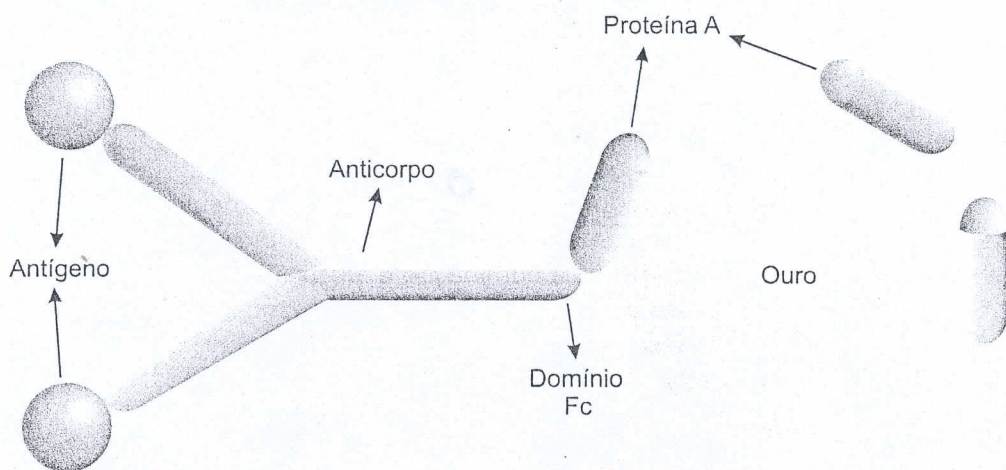


Figura 10.2 - Esquema da utilização do complexo Proteína A-partículas eletrodensas de ouro para imunolocalização de proteínas específicas relacionadas à interação fungo-planta.

2.5 Microscopia crioeletrônica

A microscopia eletrônica convencional não pode ser utilizada no estudo de células vivas, por serem estas geralmente bastante vulneráveis às condições requeridas no preparo das amostras biológicas. A ausência de água em particular faz com que as macromoléculas do tecido vegetal ou fúngico se tornem desnaturadas e não-funcionais. Entretanto, a técnica de microscopia crioeletrônica auxilia o exame de material biológico hidratado, não-fixado e não-corado diretamente na microscopia eletrônica de transmissão ou varredura. Nessa técnica, um filme extremamente fino da suspensão aquosa de uma amostra é aplicado a um suporte de base. Após o congelamento em nitrogênio líquido e a manutenção da amostra congelada em uma montagem especial, a amostra é observada em microscopia eletrônica. A temperatura extremamente baixa (-196 °C) impede que a água evapore (mesmo em vácuo) e a amostra pode então ser observada em detalhe em seu estado natural, hidratada, sem escurecimento ou fixação. Uma vez que o material biológico dispersa mais elétrons do que água, é possível observá-lo sem os procedimentos convencionais de fixação, coloração e desidratação.

2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura auxilia o investigador a observar a superfície de material seccionado ou não-seccionado (como a observação de arbúsculos em micorrizas arbusculares ou pelotons em micorrizas orquidóides em cortes de raiz). A amostra é fixada, desidratada e recoberta superficialmente por uma fina camada de um metal pesado (como o ouro ou a platina). Após o material ter sido recoberto pelo metal, um feixe intenso de elétrons é emitido pelo microscópio e varre rapidamente a superfície da amostra. Então, as moléculas contidas na preparação são excitadas e liberam elétrons secundários, que são focados dentro de um detector. Como o número de elétrons secundários emitidos em cada ponto da amostra depende do ângulo do feixe de elétrons em relação à sua superfície, a micrografia eletrônica de varredura tem uma aparência tridimensional.

2.7 Microscopia eletrônica associada à microanálise por raios X

A microanálise de material biológico por raios X pode ser acoplada a um conjunto de várias formas de equipamento de microscopia eletrônica, tanto em MEV quanto em MET. Nessa análise, informações a respeito da composição de elementos do espécime examinado (quais elementos), assim como informações

quantitativas (quantidade de cada elemento), podem ser obtidas, mesclando dados de morfologia ou arquiteturas com informações funcionais a respeito da composição e concentração de elementos na interface fungo-planta (Zeyen, 1982; Cooper et al., 1996; Bucking e Heyser, 1999; Frey et al., 2000; Ryan et al., 2003; Williams e Cooper, 2003).

Os procedimentos convencionais para o preparo de material biológico para estudos de ultra-estrutura por MEV ou MET, apesar de fornecerem importantes informações morfológicas a respeito da interação fungo-planta, têm mascarado características essenciais do tecido vivo devido à extração de toda a água e de materiais solúveis em água e outros solventes. A microscopia crioelétrica pode também ser acoplada ao sistema de microanálise por raios X, determinando, de forma pontual, a concentração de elementos no interior de células e tecidos túrgidos, incluindo o conteúdo líquido no espaço intercelular do apoplasto (McCully et al., 2000).

3 Métodos

É importante ressaltar que praticamente todos os corantes listados a seguir podem ser carcinogênicos, portanto devem ser empregadas todas as medidas de segurança relativas a tais substâncias.

3.1 Clareamento e coloração de estruturas fúngicas em folhas

Substâncias como clorofila, borracha, tanino etc., que deixam o tecido vegetal opaco, precisam ser removidas antes para que as estruturas fúngicas possam ser observadas dentro dos tecidos. Diversos procedimentos podem ser utilizados, a saber:

- a) Ferva em água e efetue a descoloração por lavagem em álcool antes do resfriamento do material.
- b) Proceda à descoloração em hipoclorito de sódio (NaOCl) 1% ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30% (100 volumes) ou peróxido de amônia etc.
- c) Lave em mistura 1:1 de ácido acético:etanol.
- d) Embeba em hidróxido de sódio (NaOH) 5% (trocando a solução diariamente) até o clareamento; acidifique e esquite em solução de cloral hidratado.

3.1.1 Técnica de clareamento e coloração de fragmentos vegetais de Bruzzese e Hasan (1983)

Essa técnica, originalmente recomendada para o estudo de interações entre plantas e fungos causadores de ferrugens (Uredinales), pode ser aplicada a diversos outros tipos de interações fungo-planta, além de ser de grande utilidade taxonômica para diferenciação entre os gêneros de fungos fitopatogênicos *Oidiopsis* e *Streptopodium* (Phyllactinioideae, Erysiphaceae) (Liberato et al., 2004, 2005).

Material necessário

- a) Etanol.
- b) Clorofórmio.
- c) Ácido láctico.
- d) Fenol.
- e) Cloral hidratado.
- f) Corante azul-de-anilina.
- g) Água destilada.

Procedimento

- a) Imerja pequenos fragmentos quadrangulares do tecido foliar na solução corante clareadora (Solução 1) (2 mL dessa solução/cm² de tecido vegetal) e deixe em um frasco hermeticamente fechado por 48 h, em aproximadamente 20-25 °C.
- b) Remova os fragmentos e coloque-os em solução de clareamento de cloral hidratado (Solução 2) por 12-24 h. Esse passo deverá ser repetido por mais 12 h se a amostra reter muita quantidade de corante.
- c) Enxágüe bem e rapidamente em água destilada.
- d) Monte em meio de polivinil álcool (ou mesmo em lactofenol ou água para rápida visualização).

Preparo da Solução 1:

Etanol 95%.....	300 mL
Clorofórmio.....	150 mL
Ácido láctico 90%.....	125 mL
Fenol.....	150 mL

Cloral hidratado.....450 g
Azul-de-anilina (solúvel em água).....0,6 g

Coloque em um béquer os reagentes na ordem listada e misture-os continuamente até a dissolução completa dos compostos sólidos.

Preparo da Solução 2:

Cloral hidratado.....50 g
Água destilada.....20 mL

Aqueça a água destilada em um béquer, remova do calor, adicione o cloral hidratado e misture até a dissolução completa. Prepare, preferencialmente, em câmara com exaustor para evitar o vapor tóxico.

3.1.2 Técnica de coloração de cortes por ácido periódico-Schiff (Dring, 1955)

Material necessário

- a) Etanol.
- b) Ácido periódico.
- c) Fucsina básica.
- d) Ácido clorídrico.
- e) Metabissulfito de potássio.
- f) Água destilada.
- g) Lactofenol, ácido láctico (para montagem).

Procedimento

- a) Desidrate os cortes em série alcoólica.
- b) Imerja as amostras em solução aquosa de ácido periódico 1% por 2-5 min.
- c) Lave em água corrente por 10 min.
- d) Imerja em reagente de Schiff por 10 min. A coloração do fungo será completada durante esse tempo, mas os cortes de tecido vegetal permanecerão descorados ou singelamente rosados.
- e) Transfira os cortes diretamente para uma solução aquosa de metabissulfito de potássio. Faça pelo menos duas trocas por um período de 10 min.

- f) Lave em água corrente por 10 min.
- g) Monte em lactofenol, ácido láctico ou outro líquido de montagem de base aquosa.

Reagente de Schiff

Fucsina básica	0,5 g
Ácido clorídrico	10 mL
Metabissulfito de potássio (anidro)	0,5 g
Água destilada	100 mL

Para dissolução do corante, coloque a fucsina básica em um béquer e adicione 100 mL de água destilada após a fervura. Deixe resfriar até aproximadamente 50 °C; filtre e adicione o ácido clorídrico e o metabissulfito de potássio. Deixe de um dia para o outro, ou mais tempo, até o clareamento da solução, que deve estar transparente ou de coloração paleácea. A solução pode ser estocada para uso por até seis meses, se armazenada sob refrigeração em frasco escuro hermeticamente fechado.

3.1.3 Reagente de Bell (Bell, 1951)

Material necessário

- a) Cloral hidratado.
- b) Azul-de-tripano ou de algodão.
- c) Água destilada.

Procedimento

- a) Corte as folhas em pequenos fragmentos quadrangulares (alguns mm²).
- b) Ferva em água destilada por aproximadamente 1 min.
- c) Lave o material em álcool antes do resfriamento até a descoloração.
- d) Imerja em poucos mililitros do reagente de Bell por 12-24 h e proceda à montagem entre lâmina e lamínula em lactofenol ou ácido láctico. Se mantido aquecido (40 °C), o processo de coloração é acelerado.

Preparo do reagente de Bell:

Cloral hidratado	350 g
Água destilada	140 mL
Azul-de-tripano ou de algodão	0,5 g

Ferva em água destilada, remova do calor e adicione os componentes. Mexa até dissolver e transfira para um frasco hermeticamente fechado (para prevenir a cristalização).

3.1.4 Tionina e Orange G (Stoughton, 1930)

Nesta preparação, o fitopatógeno colore-se de violeta-púrpura; as paredes de celulose, de amarelo ou verde; e os tecidos lignificados, de azul.

Material necessário

- a) Etanol.
- b) Tionina.
- c) Orange G.
- d) Água destilada.

Procedimento

- a) Desidrate os cortes em série alcoólica.
- b) Core por 5 min em tionina.
- c) Lave em água.
- d) Lave em etanol 95%.
- e) Diferencie em Orange G por 2-5 min.
- f) Lave bem em etanol absoluto para desidratação.
- g) Efetue o clareamento em xileno.
- h) Monte em bálsamo-do-canadá ou euparal.

3.1.5 Azul-de-Toluidina (Ghemawat, 1977)**Material necessário**

- a) Etanol.
- b) Azul-de-toluidina O.
- c) Água destilada.

Procedimento

- a) Remova as bolhas de ar das tiras de folhas através da imersão em álcool por 10 min.
- b) Enxágüe o excesso de álcool com uma solução de 0,05% de azul-de-toluidina O.
- c) Core por 15 min em solução de azul-de-toluidina O, a 0,05% de solução recém-preparada.
- d) Monte em solução de 0,005% de azul-de-toluidina O, examine imediatamente ou deixe em câmara úmida. Para estocar por mais de 24 h, sele com esmalte de unha.

3.1.6 Clareamento e coloração de estruturas fúngicas em raízes (Phillips e Hayman, 1970; Brundrett et al., 1996; Dickson e Smith, 1998; Peterson et al., 2004) (Figura 10.3-4)

Raízes mais velhas ou mais espessas, com grande quantidade de fenol ou mais suberizadas, requerem clareamento mais vigoroso (incluindo autoclavagem) e um passo adicional de branqueamento em peróxido alcalino (0,5% NH_4OH , 0,5% H_2O_2 v/v em água) (Bevege, 1968; Komanik e McGraw, 1982). A pré-coloração antes do branqueamento irá ajudar a garantir que o corante tingirá a parede fúngica (Haugen e Smith, 1992).

Material necessário

- a) Etanol.
- b) Hidróxido de potássio.
- c) Peróxido de hidrogênio.
- d) Hidróxido de amônio.
- e) Ácido clorídrico.
- f) Ácido láctico.
- g) Corantes "Chlorazol Black E" ou azul-de-tripano ou fucsina ácida.
- h) Glicerina.
- i) Água destilada.

Procedimento

As raízes devem ser lavadas para retirada de restos de solo e usualmente fixadas em etanol 50% por pelo menos 24 h. As raízes podem também ser clareadas sem a fixação prévia do material.

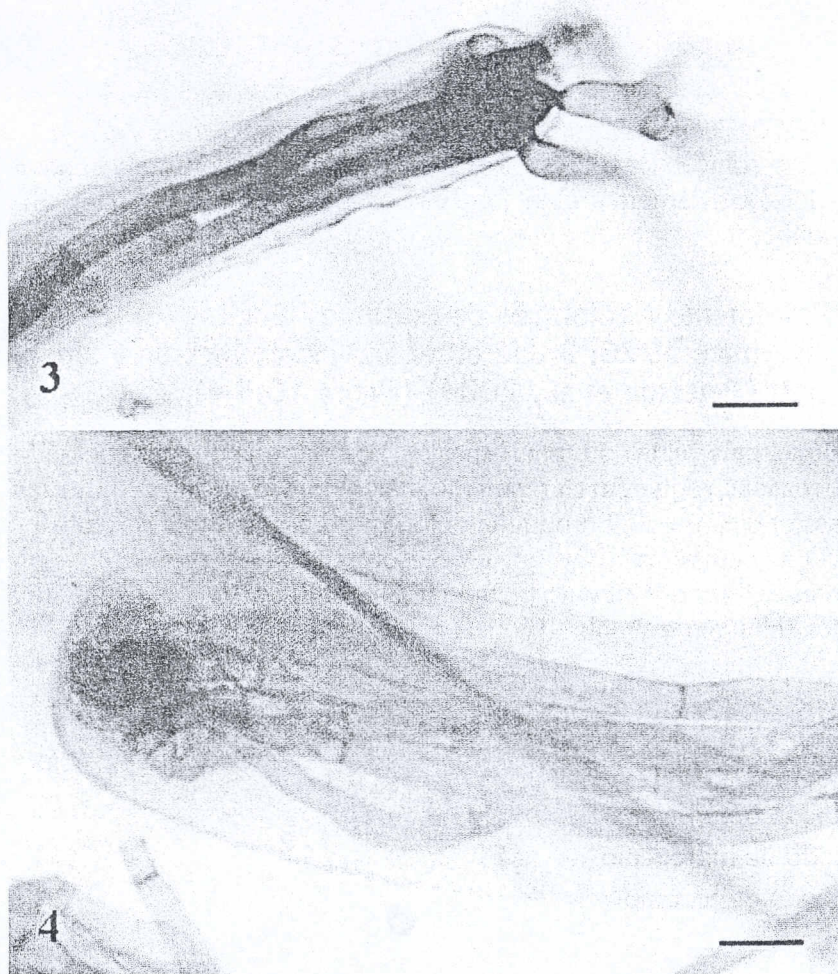


Figura 10.3 - Radicela de *Oncidium flexuosum* colonizada por *Ceratobasidium* sp. após clareamento do tecido vegetal e coloração das estruturas fúngicas pela técnica de Phillips e Hayman (1970). 3 - Hifas vegetativas de *Ceratobasidium* sp. saindo pela extremidade apical da radicela de *O. flexuosum*. 4 - Radicela em estágio mais avançado de desenvolvimento, colonizada por diversas hifas, mostrando o enovelamento na região da extremidade apical da radicela. Barras = 1,0 mm.

Fonte: Pereira et al., 2005.

- a) Enxágüe em água (de preferência destilada) por três vezes.
- b) Efetue o clareamento das raízes em solução de 5 ou 10% KOH (a depender da fragilidade da raiz) e autoclave por 20-40 min, ou as mantenha em banho-maria a 90 °C por 2-3 h. Algumas raízes muito finas podem ser clareadas em temperatura ambiente se deixadas imersas na solução por 12 h ou mais.
- c) Enxágüe em água (de preferência destilada) por três vezes.
- d) Se as raízes forem muito pigmentadas, elas deverão ser clareadas em 30-35% de peróxido de hidrogênio: água destilada (1:1), adicionando hidróxido de amônio até a concentração final de 0,05%. A duração irá depender do tipo de raiz, mas normalmente 5 min são suficientes.
- e) Enxágüe em água (de preferência destilada) por três vezes.
- f) Acidifique em HCl 2% ou ácido láctico 2% por 1-2 min.
- g) A coloração pode ser feita com um dos respectivos corantes: "Chlorazol Black E" (0,03%), azul-de-tripano (0,05%) ou fucsina ácida (0,1%). A solução corante consiste de 80% de ácido láctico: glicerina: água destilada 1-1-1. As raízes serão coradas por 2-3 h, a 90 °C. A coloração utilizando-se algum dos dois últimos corantes requer mais tempo. Coloração em fucsina ácida é preferível para exame do material em microscopia a laser confocal.
- h) Proceda à descoloração em 50% de glicerina por aproximadamente 24 h.
- i) Monte as raízes entre lâmina e lamínula em solução de glicerina 50%.

3.1.7 Clareamento e coloração de estruturas fúngicas em tecidos lenhosos

Tecidos lenhosos precisam ser previamente seccionados, com criomicrotomo ou microtomo de manivela, antes do processo de coloração.

Material necessário

- a) Safranina.
- b) Ácido pícrico.
- c) Etanol.
- d) Azul-de-anilina.
- e) Óleo de cedro ou xileno.
- f) Água destilada.
- g) Bálsamo-do-canadá ou euparal (para montagem).

Procedimento

- a) Ferva a amostra em água destilada até que esteja encharcada. A amostra irá submergir.
- b) Corte as amostras na espessura desejada, com o uso de micrótomo.
- c) Efetue a coloração dos cortes em solução aquosa de safranina 1% por aproximadamente 30 s.
- d) Lave o excesso de corante em água, deixando os cortes pouco corados.
- e) Com o corte na lâmina, efetue a coloração em azul picroanilina e, com cuidado, esquite levemente em lamparina até breve fervura.
- f) Lave com água todo o conteúdo azulado retido na lâmina.
- g) Lave várias vezes em etanol (75 e 95%) e desidrate em etanol absoluto.
- h) Lave em óleo de cedro ou xileno.
- i) Monte em bálsamo-do-canadá ou euparal.

3.1.8 Coloração de estruturas fúngicas em material embebido em resina (LR White resin ou Spurr's resin)

Material necessário

- a) Azul-de-toluidina O.
- b) Borato de sódio.
- c) Água destilada.

Procedimento

- a) Prepare uma solução de azul-de-toluidina O (ATO) com a adição de 0,05 g de ATO e 1,0 g de borato de sódio a 100 mL de água destilada. Filtre e armazene o reagente em um frasco.
- b) Após os cortes terem sido fixados à lâmina pelo calor, adicione a solução de ATO até cobrir todo o corte. Aqueça suavemente.
- c) Enxágüe o corante da lâmina e deixe secar.
- d) Lâminas permanentes podem ser preparadas com adição de uma gota de óleo de imersão, cobertas com a lamínula e seladas com esmalte de unha.

3.2 Histoquímica de compostos fenólicos em tecido vegetal

Os compostos fenólicos formam uma classe de compostos do metabolismo secundário, que possui um grupo hidroxila ligado diretamente a um carbono de um anel benzênico. Em plantas, constituem um grupo quimicamente heterogêneo. Muitos estudos têm demonstrado o papel crucial desses compostos na resistência ao organismo invasor.

Quando as plantas estão com estresse hídrico, os compostos fenólicos são acumulados nos vacúolos, garantindo a manutenção do arcabouço celular e da integridade dos tecidos. Portanto, as plantas a serem utilizadas em experimentos que envolvam métodos histoquímicos de detecção de compostos fenólicos não devem sofrer estresse hídrico durante a condução do experimento.

3.2.1 Compostos fenólicos gerais

3.2.1.1 Cloreto de ferro III (Johansen, 1940)

Este teste é usualmente utilizado para histolocalização de compostos fenólicos simples que complexam o íon de ferro, dando origem a precipitados intensamente corados.

Material necessário

- a) Cloreto de ferro III.
- b) Água destilada.

Procedimento

- a) Trate o material vegetal com cloreto de ferro III 10% por 15-30 min, seguido de lavagem rápida com água destilada. Note que os fenóis coram-se de azul, negro, púrpura, verde ou violeta.

3.2.1.2 Formalina 4% e sulfato ferroso 10% (Johansen, 1940)

Material necessário

- a) Formaldeído.
- b) Sulfato ferroso heptaidratado.
- c) Ácido acético glacial.
- d) Água destilada.

Procedimento

- a) Coloque o material na solução fixadora por 48 h.
- b) Lave 5-6 vezes o material fixado em água destilada por 15 min.
- c) Submeta-o a processos de desidratação ou a outros. Note que os fenóis coram-se de azul, negro, púrpura, verde ou violeta.

Preparo da solução fixadora

Coloque 4,0 mL de formaldeído 37% + 10,0 g de sulfato ferroso heptaidratado e complete com água destilada até o volume final de 100 mL. Schneider (1977) propôs outra opção de solução fixadora constituída de 10% de formalina e 2% de sulfato ferroso:

10,0 mL de formaldeído 37% + 0,25 mL de ácido acético glacial + 2,0 g de sulfato ferroso heptaidratado, e complete com água destilada até o volume final de 100 mL.

Obs.: O ácido acético não interfere no processo de precipitação dos compostos fenólicos pelo formaldeído, e o sulfato ferroso tem a função somente de retardar a precipitação do sulfato ferroso durante a estocagem do fixador.

3.2.1.3 Dicromato de potássio (Gabe, 1968)

O método baseia-se na formação de um produto corado por condensação dos grupos -OH livres dos compostos fenólicos com o cromo do dicromato de potássio.

Material necessário

- a) Dicromato de potássio.
- b) Água destilada.

Procedimento

Coloque o material vegetal em solução de dicromato de potássio 10% por 15-30 min e, em seguida, enxágüe rapidamente o material em água. Note que os compostos fenólicos coram-se de castanho-avermelhado.

3.2.1.4 Diazorreação (Ganter e Jollés, 1970)

O método baseia-se na formação de um complexo azóico corado por condensação do fenol com um sal de diazônio, em meio alcalino. Apesar de o fenol e o sal de diazônio serem incolores, o produto da reação é corado. A diazorreação é característica dos compostos fenólicos com um grupo -OH livre e sem substituintes em posição orto ou para, relativamente ao -OH.

Material necessário

- a) Fast-Blue B.
- b) Tampão veronal.
- c) Ácido clorídrico.
- d) Água destilada.

Procedimento

- a) Coloque o material vegetal em solução de Fast-Blue B 0,1% em tampão veronal 0,1 M, pH 7,5-8,5 (recém-preparado) durante 1-2 min a 4 °C.
- b) Proceda à lavagem em HCl 1% e em etanol 70% durante três vezes por 2 min.
- c) Enxágüe rapidamente em água. Note que os compostos fenólicos coram-se de vermelho.

3.2.1.5 Ação de fluorocromos (Charrière-Ladreix, 1976) "em luz ultravioleta"

Alguns fluorocromos, como o cloreto de alumínio, o acetato de magnésio, o acetato neutro de chumbo e o reagente de Wilson (mistura citrobórica de Wilson), ao reagirem com os flavonóides, induzem uma fluorescência secundária relativamente estável em meio ácido.

Os flavonóides emitem uma fluorescência secundária, mais ou menos intensa, de cor amarelo-esverdeada em presença de cloreto de alumínio, acetato de magnésio e acetato neutro de chumbo. Alguns flavonóides emitem uma fluorescência amarela muito intensa com o reagente de Wilson. Deve-se fazer um controle, verificando se o fluorocromo apresenta fluorescência por si só. Observe também cortes que não foram submetidos à ação dos fluorocromos.

Material necessário

- a) Fluorocromo (cloreto de alumínio, acetato de magnésio, acetato neutro de chumbo ou reagente de Wilson).

- b) Água destilada ou metanol (a depender de qual será utilizado como solvente para o fluorocromo).

Procedimento

- a) Coloque o material vegetal em solução do fluorocromo durante 15-30 min.
b) Proceda à lavagem rápida no solvente.

Fluorocromos utilizados

- Cloreto de alumínio 5-15% (solução aquosa ou metalônica).
- Acetato de magnésio 5% (solução metalônica).
- Acetato neutro de chumbo 1-3% (solução aquosa).
- Reagente de Wilson [ácido cítrico 10% em acetona e solução saturada de ácido bórico em acetona (v/v)].

3.2.2 Taninos - Vanilina clorídrica (Mace e Howell, 1974)

O método fundamenta-se na formação de um produto de condensação resultante da reação dos grupos aldeídicos da vanilina com os compostos fenólicos.

Material necessário

- a) Vanilina.
b) Ácido clorídrico.

Procedimento

- a) Coloque o material vegetal em solução de vanilina 0,5% em ácido clorídrico 9% durante 10 min.
b) Proceda à montagem em ácido clorídrico 9%.

Os taninos coram-se de vermelho. É interessante proceder a um controle do método com cortes montados apenas em ácido clorídrico 9%.

3.2.3 Ligninas

A lignina ou o processo de lignificação pode, por meio da modificação química das paredes celulares, interferir no crescimento de fungos fitopatogênicos,

em razão do aumento de resistência das paredes à ação de enzimas degradadoras, na difusão das toxinas do patógeno em direção ao hospedeiro e de nutrientes do hospedeiro em direção ao patógeno (Pascholati e Leite, 1995).

3.2.3.1 Floroglucinol (Johansen, 1940)

O floroglucinol, ao reagir com o álcool coniferílico, forma um complexo vermelho em meio clorídrico.

Material necessário

- a) Floroglucinol.
- b) Ácido clorídrico.

Procedimento

Coloque o material vegetal em solução de floroglucinol em HCl 20% durante 1-2 min. As ligninas coram-se de vermelho intenso.

3.3 Histoquímica de calose em tecido vegetal

Sob a hifa de penetração, entre a membrana plasmática e a parede celular no sítio de infecção pode ocorrer a formação de papilas, em geral constituídas de calose (b-1,3 glucanos), além de conter lignina, derivados fenólicos, celulose, silício e suberina, servindo de barreira contra a penetração e troca de metabólitos entre o hospedeiro e o patógeno (Pascholati e Leite, 1995). Pode também ocorrer a deposição de material celulósico (calose) e lignina na hifa, dando origem a uma bainha ou “tubo lignífero”, que impede seu progresso no interior do citoplasma (Pascholati e Leite, 1995).

3.3.1 Azul-de-Anilina (Smith e Mccully, 1978) “em luz azul”

Material necessário

- a) Azul-de-anilina.
- b) Tampão fosfato de potássio.

Procedimento

Coloque o material vegetal em solução de azul-de-anilina 0,05% em tampão fosfato de potássio 0,06 M, pH 8,0, durante 5 min. O tampão fosfato de potássio deve ser elaborado no momento do preparo da solução de azul-de-anilina. A calose fluoresce em amarelo.

3.3.2 Calcofluor White “em luz ultravioleta”

Material necessário

- a) Calcofluor White MR2.
- b) Água destilada.

Procedimento

- a) Coloque o material vegetal em solução de Calcofluor White MR2 0,01%, durante 5-10 min.
- b) Enxágüe o material rapidamente em água. b-1,3 glucanos e alguns polissacarídeos fluorescem de azul.

3.4 Estudo da interação fungo-planta pela introdução de gene repórter

Uma das ferramentas mais interessantes para o estudo da interação fungo-planta é o uso de um gene repórter para diferenciar e facilitar a visualização da hifa nas análises microscópicas, bem como para a análise da expressão de genes de patogenicidade (Figura 10.1). Independentemente do objetivo, esse tipo de estudo requer bom conhecimento das técnicas de biologia molecular, aliado ao das diferentes técnicas de microscopia. Entretanto, alguns aspectos muito importantes devem ser considerados antes da montagem de um experimento. A expressão de GFP em fungos fitopatogênicos requer uma variante do gene GFP eficientemente traduzida em fungos, um sistema de transformação, e um promotor que seja reconhecido pela espécie fúngica de interesse e que satisfaça o requerimento de dado objetivo experimental. Provou-se já que o gene GFP selvagem é estável e produz a fluorescência verde esperada. Entretanto, em muitos casos, o isolamento de alelos mutantes tem produzido melhores resultados, provavelmente por contornar problemas relacionados ao processamento do transcrito, códons preferenciais e, ou, estabilidade da proteína (Gold et al., 2001). Vetores para a expressão de GFP têm sido desenvolvidos para as principais classes de fungos filamentosos: basidiomicetos,

ascomicetos e oomicetos. O vetor a ser escolhido obviamente depende da espécie fúngica a ser transformada e de sua aplicação. Vetores que direcionam GFP para organelas específicas ou para expressão constitutiva de GFP são disponíveis, mas a aplicabilidade de dado vetor para uso em amplo espectro não é conhecida, uma vez que a funcionalidade da maioria dos vetores tem sido demonstrada em poucos fungos. Outro problema que pode estar relacionado a essa metodologia é a disponibilidade de promotores, uma vez que um número bem limitado de promotores fúngicos tem sido caracterizado (Lorang et al., 2001). O processo de introdução do vetor na célula fúngica, chamado de transformação, pode ser realizado de diferentes maneiras, cada uma apresentando suas vantagens e desvantagens, e, da mesma forma, diferentes genes podem ser utilizados como marcadores de seleção, sendo aconselhada a leitura de uma revisão sobre o assunto (Fincham, 1989; Ruiz-Díez, 2002).

3.4.1 Proteína verde fluorescente para estudos do crescimento e monitoramento de hifas fúngicas

Para facilitar a visualização do fungo na planta, monitorar sua distribuição e estimar sua biomassa, toda a hifa é marcada com GFP. A marcação de toda a hifa tipicamente resulta na localização citoplasmática da proteína GFP, que ocorre em todos os diferentes tipos morfológicos (hifa, esporos, apressório etc.) sem nenhum efeito óbvio no crescimento ou na patogenicidade do fungo (Lorang et al., 2001).

Quando o objetivo é visualizar a hifa no tecido do hospedeiro, é aconselhada a utilização de promotores que sejam fortemente reconhecidos pela espécie de interesse (Figura 10.1). Como exemplo da aplicação de GFP com esse objetivo, podem-se citar Maor et al. (1998), que acompanharam o desenvolvimento do fungo *Cochliobolus heterostrophus* dentro das folhas de milho e foram capazes de correlacionar a fluorescência com a massa micelial e níveis da doença, e Oren et al. (2003), que caracterizaram os eventos iniciais da interação no patossistema *Fusarium moliniforme* - milho.

Material necessário

- a) Vetor quimérico contendo o gene *GFP* sob o comando de um promotor constitutivo e marcador de seleção apropriado.
- b) Linhagem receptora para os experimentos de transformação (pode ser a própria linhagem selvagem se o gene de seleção for um gene de caractere dominante ou uma linhagem selvagem apropriada para complementação da mutação).

- c) Meios de cultura apropriados para crescimento do fungo e seleção dos transformantes.
- d) Variedade suscetível do hospedeiro.
- e) Microscópio de fluorescência.

Procedimento

- a) Obtenha o mutante apropriado para a complementação com o gene de seleção (se o gene de seleção for um gene dominante, não há necessidade desse passo).
- b) Obtenha uma preparação de boa qualidade e alta concentração (aproximadamente $5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) do vetor quimérico contendo o gene *GFP* sob o comando de um promotor constitutivo.
- c) Transforme a linhagem mutante, ou a selvagem, com o vetor quimérico (utilize o protocolo de transformação mais conveniente, considerando-se tanto a espécie quanto as condições do laboratório).
- d) Selecione um transformante para as análises microscópicas.
- e) Inocule o transformante em um hospedeiro suscetível de acordo com protocolos gerais descritos para o patossistema.
- f) Colete amostras do tecido infectado de tempos em tempos.
- g) Efetue a microtomia e o preparo das lâminas.
- h) Analise os cortes em microscópio de fluorescência.

3.4.2 Proteína verde fluorescente para análise da expressão de genes envolvidos na interação fungo-planta e localização de proteínas de interesse

O objetivo mais comum do gene *GFP* é seu uso como gene repórter para estudo da expressão gênica de um gene de interesse (por exemplo, um gene relacionado à patogênese). Para alcançar esse objetivo, o gene de interesse já deve estar clonado e pelo menos sua região promotora sequenciada. É construído, então, um vetor quimérico e a região estrutural do gene *GFP* é colocada sob controle do promotor do gene de interesse. Esse vetor é introduzido no fungo pelo processo de transformação mais conveniente, e um transformante é analisado quanto ao desenvolvimento da doença no hospedeiro. O desenvolvimento do fungo é acompanhado por microscopia de fluorescência, e, quando a proteína GFP estiver presente, esse crescimento ocorrerá, se o gene estiver expresso (Figura 10.1).

A expressão de diferentes genes de fungos fitopatogênicos tem sido estudada pela fusão com *GFP* em diferentes condições *in vitro* durante a infecção da planta (por exemplo: um gene que codifica endopolygalacturonase em *Colletotrichum lindemuthianum* (Dumas et al., 1999), um gene essencial para a patogenicidade em *Colletotrichum gloesporioides* (Stephenson et al., 2000) e gene que codifica para calmodulina em *Magnaporthe grisea* (Liu e Kolattukudy, 1999)).

Material necessário

- a) Gene de interesse relacionado à patogenicidade caracterizado.
- b) Vektor quimérico contendo o gene *GFP* sob o comando do promotor do gene de interesse e marcador de seleção apropriado.
- c) Linhagem receptora para os experimentos de transformação (pode ser a própria linhagem selvagem se o gene de seleção for um gene de caractere dominante ou uma linhagem selvagem apropriada para complementação da mutação).
- d) Meios de cultura apropriados para crescimento do fungo e seleção dos transformantes.
- e) Variedade suscetível ao hospedeiro.
- f) Microscópio de fluorescência.

Procedimento

- a) Obtenha o mutante apropriado para a complementação com o gene de seleção (se o gene de seleção for um gene dominante, não há necessidade desse passo).
- b) Obtenha uma preparação de boa qualidade e alta concentração (aproximadamente $5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) do vetor quimérico contendo o gene *GFP* sob o comando do promotor do gene de interesse.
- c) Transforme a linhagem mutante ou a selvagem com o vetor quimérico (utilize o protocolo de transformação mais conveniente, considerando-se tanto a espécie quanto as condições do laboratório).
- d) Selecione um transformante para as análises microscópicas.
- e) Inocule o transformante em um hospedeiro suscetível de acordo com protocolos gerais descritos para o patossistema.
- f) Colete amostras do tecido infectado de tempos em tempos.
- g) Proceda à microtomia e ao preparo das lâminas.
- h) Analise os cortes em microscópio de fluorescência.

4 Exercícios

- 1) Colete no campo materiais infectados por fitopatógenos causadores de oídio (Erysiphales) e de mildio (Peronosporales). Corte pequenos fragmentos quadrangulares (de aproximadamente 0,5 cm²) de tecido vegetal infectado e proceda ao clareamento e à coloração dos fragmentos pela técnica de Bruzzese e Hasan (1983). Observe ao microscópio óptico a interação desses fitopatógenos com os estômatos no tecido vegetal.
- 2) Colete, no campo, material infectado por fungo causador de oídio. Faça cortes do material infectado e proceda à coloração dos cortes por ácido periódico-Schiff ou por tionina e Orange G. Observe em microscópio óptico os haustórios corados. Se disponível, fazer o mesmo em material infectado por ascomicetos biotróficos da família Asterinaceae, para observação de haustórios coralóides.
- 3) Colete, no campo, raízes de gramíneas e proceda ao clareamento e à coloração das estruturas fúngicas do seu interior. Observe os arbúsculos e as vesículas formadas pelos fungos micorrízicos arbusculares. Se disponível, faça o mesmo para cortes de raízes de orquídeas selvagens (preferencialmente provenientes de plantas jovens), para observação dos "pelotons" formados pelos fungos rizoctonióides.
- 4) Obtenha um transformante de *Colletotrichum lindemuthianum* que expresse constitutivamente a proteína verde fluorescente e acompanhe o processo de infecção em folhas de feijoeiro. Observe o apressório, a hifa de penetração, a vesícula e as hifas primárias e secundárias.

5 Referências

- BELL, F.H. Distribution of hyphae of several plant pathogenic fungi in leaf tissue. **Phytopathology** 41: 3, 1951.
- BEVEGE, D.I. A rapid technique for clearing and staining intact roots for detection of mycorrhiza caused by *Endogone* spp. and some records of infection in Australian plants. **Transactions of the British Mycological Society** 51: 808-10, 1968.
- BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T. & MALAJCZUK, N. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. **ACIAR Monograph** 32, 1996.
- BRUZZESE, E.; HASAN, S. A whole leaf clearing and staining technique for host specificity studies of rust fungi. **Plant Pathology** 32: 335-8, 1983.
- BUCKING, H.; HEYSER, W. Elemental composition and function of polyphosphates in ectomycorrhizal fungi – an X-ray microanalytical study. **Mycological Research**, 103: 31-9, 1999.

- CHARRIÈRE-LADREIX, Y. Répartition intracellulaire du secrétat flavonique de *Populus nigra* L. **Planta** 129: 167-74, 1976.
- COOPER, R.M.; RESENDE, M.L.V.; FLOOD, J.; ROWAN, M.G.; BEALE, M.H. & POTTER, U. Determination and cellular localization of elemental sulphur in disease resistant genotypes of *Theobroma cacao*. **Nature** 379: 159-62, 1996.
- CORMACK, B. Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. **Current Opinion in Microbiology** 1: 406-10, 1998.
- COUTEAUDIER, Y.; DABOUSSI, M.J.; EPARVIER, A.; LANGIN, T. & ORCIVAL, J. The GUS gene fusion system (*Escherichia coli* beta-D-glucuronidase gene), a useful tool in studies of root colonization by *Fusarium oxysporum*. **Applied Environmental Microbiology** 59: 1767-73, 1993.
- CZYMMEK, K.J.; BOURETT, T.M.; SWEIGARD, J.A.; CARROL, A. & HOWARD, R.J. Utility of cytoplasmic fluorescent proteins for live-cell imaging of *Magnaporthe grisea* in planta. **Mycologia** 94: 280-9, 2002.
- DICKSON, S. & SMITH, S.E. Evaluation of vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization by staining. In: VARMA A. (ed) **Mycorrhiza Manual**. Springer-Verlag, Berlin, 1998.
- DOOHAN, F.M.; SMITH, P.; PARRY, D.W. & NICHOLSON, P. Transformation of *Fusarium culmorum* with the b-D-glucuronidase (GUS) reporter gene: A system for studying host-pathogen relationships and disease control. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 53: 253-68, 1998.
- DRING, D. A periodic acid-Schiff technique for staining fungi in higher plants. **New Phytologist** 54: 277, 1955.
- DUMAS, B.; CENTIS, S.; SARRAZIN, N. & ESQUERRE-TUGAYE, M.T. Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. **Applied and Environmental Microbiology** 65: 1769-71, 1999.
- FINCHAM, J.R. Transformation in fungi. **Microbiology Review** 53: 148-70, 1989.
- FREY, B.; ZIEROLD, K. & BRUNNER, I. Extracellular complexation of Cd in the Hartig net and cytosolic Zn sequestration in the fungal mantle of *Picea abies* – *Hebeloma crustuliniforme* ectomycorrhiza. **Plant Cell and Environment** 23: 1257-65, 2000.
- FREYTAG, S.; ARABATZIS, N.; HAHLBROCK, K. & SCHMELZER, E. Reversible cytoplasmic rearrangements precede wall apposition, hypersensitive cell death and defense-related gene activation in potato/*Phytophthora infestans* interactions. **Planta** 194: 123-35, 1994.
- GABE, M. **Techniques histologiques**. Paris: Masson & Cie, 1968.
- GANTER, P. & JOLLÉS, G. Histologie normale et pathologique. Gauthier-Villars, Paris, 1970.
- GHEMAWAT, M. S. Polychromatic staining with toluidine blue O for studying the host-parasite relationships in wheat leaves of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological Plant Pathology** 11: 251-53, 1977.

- GOLD, S.E.; GARCÍA-PEDRAJAS, M.D. & MARTÍNEZ-ESPINOZA, A.D. New (and used) approaches to the study of fungal pathogenicity. **Annual Review of Phytopathology** 39: 337-65, 2001.
- HAUGEN, L.M. & SMITH, S.E. The effect of high temperature and fallow period on infection of mung bean and cashew roots by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Plant and Soil** 145: 71-80, 1992.
- HARDHAM, A.R. & MITCHELL, H.J. Use of molecular cytology to study the structure and biology of phytopathogenic and mycorrhizal fungi. **Fungal Genetics and Biology** 24: 252-84, 1998.
- HEATH, M.C. Advances in imaging the cell biology of plant-microbe interactions. **Annual Review of Phytopathology** 38: 443-59, 2000.
- HEIM, R. & TSIEN, R.Y. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. **Current Biology** 6: 178-82, 1996.
- JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940.
- KAHMANN, R. & BASSE, C. Fungal expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. **Current Opinion in Microbiology** 4: 374-80, 2001.
- KORMANIK, P.P. & MCGRAW, A.C. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. In: Schenck NC (ed) **Methods and Principles of Mycorrhizal Research**. APS, St Paul, 1982.
- LIBERATO, J.R.; BARRETO, R.W. & LOURO, R.P. *Streptopodium caricae* sp. nov., with a discussion of powdery mildews on papaya, and emended descriptions of the genus *Streptopodium* and *Oidium caricae*. **Mycological Research** 108: 1185-94, 2004.
- LIBERATO, J.R.; BARRETO, R.W. & SHIVAS, R.G. Leaf-clearing and staining techniques for the observation of conidiophores in the *Phyllactinioideae* (*Erysiphaceae*). **Australasian Plant Pathology** 34: 401-4, 2005.
- LIU, Z.M. & KOLATTUKUDY, P.E. Early expression of the calmodulin gene, which precedes appressorium formation in *Magnaporthe grisea*, is inhibited by self-inhibitors and requires surface attachment. **Journal of Bacteriology** 181: 3571-7, 1999.
- LORANG, J.M.; TUORI, R.P.; MARTINEZ, J.P.; SAWYER, T.L.; REDMAN, R.S. & ROLLINS, J.A. Green Fluorescent Protein Is Lighting Up Fungal Biology. **Applied and Environmental Microbiology** 67: 1987-94, 2001.
- MACE, M.E. & HOWELL C.R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. **Canadian Journal of Botany** 52: 2423-6, 1974.
- MAOR, R.; PUYESKY, M.; HORWITZ, B.A. & SHARON, A. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. **Mycological Research** 102: 491-6, 1998.
- MATZ, M.V.; FRADKOV, A.F.; LABAS, Y.A.; SAVISKY, A.P.; ZARAISKY, A.G.; MARKELOV, M.L. & LUKANOV, S.A. Fluorecent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. **Nature Biotechnology** 17: 969-73, 1999.

- MCCULLY, M.E.; SHANE, M.W.; BAKER, A.N.; HUANG, C.X.; LING, L.E.C. & CANNY, M.J. The reliability of cryoSEM for the observation and quantification of xylem embolisms and quantitative analysis of xylem sap *in situ*. **Journal of Microscopy** 198: 24-33, 2000.
- MENDGEN, K. & HAHN, M. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **TRENDS in Plant Science** 7: 353-6, 2002.
- NAHALKOVA, J. & FATEHI, J. Red fluorescent protein (DsRed2) as a novel reporter in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **FEMS Microbiology Letters** 225: 305-9, 2003.
- OREN, L.; EZRATI, S.; COHEN, D. & SHARON, A. Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. **Applied and Environmental Microbiology** 69: 1695-701, 2003.
- PASCHOLATI, S.F. & LEITE, B. **Hospedeiro: mecanismos de resistência**. In: Manual de Fitopatologia. (Eds. Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorin, L.) Editora Agronômica Ceres, São Paulo, 1995.
- PEREIRA, O.L.; KASUYA, M.C.M.; ROLLEMBERG, C.L. & BORGES, A.C. Indução *in vitro* da germinação de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonióides. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 29: 199-206, 2005.
- PETERSON, R.L.; MASSICOTE, H.B. & MELVILLE, L.H. **Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology**. NRC Research Press, Ottawa, 2004.
- PHILLIPS, J.M. & HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society** 55: 158-60, 1970.
- PIROZYNSKI, K.A.; HAWKSWORTH, D.L. Coevolution of fungi with plants and animals: introduction and overview. In: PIROZYNSKI, K.A. & HAWKSWORTH, D.L. **Coevolution of fungi with plants and animals**. London: Academic Press, p. 1-29, 1988.
- PRASHER, D.C. Primary structure of *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. **Gene** 111: 229-33, 1992.
- RUIZ-DÍEZ, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. **Journal of Applied Microbiology** 92: 189-95, 2002.
- RYAN, M.H.; MCCULLY, M.E. & HUANG, C.X. Localization and quantification of phosphorus and other elements in fully hydrated, soil-grown arbuscular mycorrhizas: a cryo-analytical scanning electron microscopy study. **New Phytologist** 160: 429-41, 2003.
- SCHNEIDER, H. Indicator hosts for pear decline: Symptomatology, histopathology, and distribution of mycoplasma-like organisms in leaf veins. **Phytopathology** 67: 592-601, 1977.
- SCHWEIZER, P.; POLORNY, J.; ABDERHALDEN, O. & DUDLER, R. A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in wheat. **Molecular Plant-Microbe Interaction** 12: 647-54, 1999.
- STEPHENSON, S.A.; HATFIELD, J.; RUSU, A.G.; MACLEAN, D.J. & MANNERS, J.M. CgDN3: an essential pathogenicity gene of *Colletotrichum gloeosporioides* necessary to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis*. **Molecular Plant-Microbe Interaction** 13: 929-41, 2000.

- SMITH, M.M. & McCULLY. A critical evaluation of the specificity of aniline blue induced fluorescence. **Protoplasma** 95: 229-54, 1978.
- STOUGHTON, R. H. Thionin and orange G for the differential staining of bacteria and fungi in plant tissues. **Annals of Applied Biology** 17: 162-4, 1930.
- YATES, I. E.; HIETT, K. L.; KAPCZYNSKI, D. R.; SMART, W.; GLENN, A. E.; HINTON, D. M.; BACON, C. W.; MEINERSMANN, R.; LIU, S. & JAWORSKI, A. J. GUS transformation of the maize fungal endophyte *Fusarium moniliforme*. **Mycological Research** 103: 129-36, 1999.
- WALL, M.A.; SOCOLICH, M. & RANGANATHAN, R. The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. **Nature Structural & Molecular Biology** 7: 1133-8, 2000.
- WILLIAMS, J.S. & COOPER, R.M. Elemental sulphur is produced by diverse plant families as a component of defence against fungal and bacterial pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 63: 3-16, 2003.
- ZEYEN, R.J. Applications of in situ microanalysis in understanding disease: X-ray microanalysis. **Annual Review of Phytopathology** 20: 119-42, 1982.