

Anais da IX Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental



ISSN 1517-3135

Dezembro, 2012

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Ocidental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 100

Anais da IX Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Ronaldo Ribeiro Morais
Cheila de Lima Boijink
Kátia Emidio da Silva
Regina Caetano Quisen*

Embrapa Amazônia Ocidental
Manaus, AM
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM 010, Km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

Caixa Postal 319

Fone: (92) 3303-7800

Fax: (92) 3303-7820

www.cpaa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*

Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Membros: *Edsandra Campos Chagas, Jeferson Luis Vasconcelos de Macêdo, Jony Koji Dairiki, José Clério Rezende Pereira, Kátia Emídio da Silva, Lucinda Carneiro Garcia, Maria Augusta Abtibol Brito, Maria Perpétua Beleza Pereira, Rogério Perin, Ronaldo Ribeiro de Moraes e Sara de Almeida Rios.*

Revisor de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito*

Diagramação: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Capa: *Lúcio Rogerio Bastos Cavalcanti*

1ª edição

1ª impressão (2012): 300

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.

Embrapa Amazônia Ocidental.

Morais, Ronaldo Ribeiro et al.

Anais da IX Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental / (editado por) Regina Caetano Quisen et al.

- Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2012.

320 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos; 100).

ISSN 1517-3135

1. Pesquisa. 2. Ciência. I. Título. II. Série.

CDD 501

O Uso de Higromicina B, Geneticina (G418) e Nourseotricina como Agentes Seletivos Visando à Transformação Genética de *Fusarium solani* f. sp. Piperis

Clara Victória Souza de Oliveira

Luadir Gasparotto

Gilvan Ferreira da Silva

Nelcimar Reis Sousa

Simone de Miranda Rodrigues

Resumo

A doença fusariose, causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* (Fsp), em plantas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), tem reduzido a pipericultura praticamente à metade desde o seu surgimento, causando perdas drásticas na produção. O desenvolvimento de ferramentas como a transformação genética de fungos possibilita a modificação e análise do genoma, permitindo também o estudo de genes relacionados à patogenicidade ou virulência, com o auxílio de marcadores de seleção que conferem resistência a determinados antibióticos. O objetivo deste trabalho foi determinar a dose letal dos antibióticos higromicina B, geneticina e nourseotricina para *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, visando à transformação genética desse patógeno. Os resultados indicam que Fsp é suscetível aos três antibióticos testados. A dose letal de higromicina B e geneticina é $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de nourseotricina é $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Palavras-chave: marcadores de seleção, antibióticos, patogenicidade, dose letal.

Introdução

O ascomiceto *Fusarium solani* f. sp. *piperis* é o agente causal da doença fusariose na pimenta-do-reino, afetando o seu sistema radicular e causando morte súbita da planta (BENCHIMOL et al., 2000). Calcula-se que esse patógeno tenha ocasionado, em 30 anos, perdas de produção da ordem de 150 milhões de dólares (BARBOSA, 2002). Métodos de controle como o uso de fungicidas, aplicação de materiais orgânicos no solo são pouco eficientes (BENCHIMOL et al., 2000).

A organização do genoma e mecanismos moleculares relacionados à patogenicidade e à virulência ainda não são bem entendidos em muitas espécies de *Fusarium* (SUGA e HYAKUMACHI, 2004). Por esse motivo, recentemente, o transcriptoma da interação entre *F. solani* f. sp. *piperis* e *Piper nigrum* foi realizado com o intuito de auxiliar no estudo da interação planta-patógeno. Entre inúmeras ferramentas relacionadas à genômica funcional/genética reversa, é possível destacar aquelas relacionadas à determinação da função de genes em patógenos por meio de silenciamento via RNA de interferência, recombinação homóloga, ou mutagênese insercional, além da utilização de genes repórteres (FRANDSEN, 2011).

Uma etapa fundamental para a genômica funcional é a transformação genética, que consiste na habilidade de inserir um DNA exógeno em uma célula hospedeira. Entre os diversos métodos para transformação genética, destaca-se a ATMT (transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*) (YING-QING et al., 2011; MICHIELSE et al., 2005; MORIOKA et al., 2006). Desde a primeira ATMT em fungo (GROOT et al., 1998), nos últimos 14 anos, esse método vem sendo realizado com sucesso em mais de 125 espécies (FRANDSEN, 2011) e mostra ter várias vantagens sobre os métodos convencionais de transformação. Células intactas, como conídios e micélios, podem ser usadas como matéria-prima, eliminando assim a necessidade de gerar protoplastos. Essas propriedades da ATMT fazem desse método de

transformação uma valiosa ferramenta para análise sistemática mutacional em fungos, quer pela integração de alvo, quer por mutagênese insercional. Qualquer tipo de transformação genética, geralmente, requer a disponibilidade de genes que conferem resistência a determinado antibiótico e que são utilizados como marcadores de seleção. Existem pelo menos oito marcadores de seleção viáveis para transformação de ascomicetos, tais como *bar/Nat*; *hph*; *Ble*, *aphI/NPTII/Neo*; *ilv1*; *sdhR*; β -*tub* e *Zeo*, sendo o mais utilizado, dentre estes, o gene que confere resistência à higromicina B (*hph*).

É importante salientar que esses sistemas de seleção variam de fungo para fungo, sendo por esse motivo recomendada a realização de testes de eficiência dos antibióticos que serão utilizados em uma transformação genética (SHARMA e KUHAD, 2010).

Material e Métodos

O isolado de *F. solani* f. sp. *piperis* utilizado neste trabalho é oriundo da coleção da Embrapa Amazônia Oriental e foi mantido em meio de cultura BDA (250 g L⁻¹ de batata; 10 g L⁻¹ de dextrose; 2 g L⁻¹ de peptona; 16 g L⁻¹ de ágar; 1,5 g L⁻¹ de caseína; 2 g L⁻¹ de extrato de levedura) a 25 °C, e para obtenção de esporos em meio PDB ¼ (0,5 g L⁻¹ de peptona; 2,5 g L⁻¹ de dextrose; 0,375 g L⁻¹ de caseína; 0,5 g L⁻¹ extrato de levedura; 62,5 g L⁻¹ de batata) a 25 °C e 150 rpm, por três dias. O isolado foi crescido em meio Czapek-Dox (0,01 g L⁻¹ de sulfato ferroso; 0,5 g L⁻¹ de sulfato de magnésio; 2 g L⁻¹ de nitrato de sódio; 0,5 g L⁻¹ de cloreto de potássio; 1 g L⁻¹ de fosfato de potássio; 30 g L⁻¹ de sacarose) para realizar os testes de dose letal com hifas, sendo mantido nas mesmas condições anteriores. Os testes de dose letal foram realizados com 106 esporos mL⁻¹, com concentração de geneticina e higromicina B (Gold Biotechnology®) variando entre 40 µg mL⁻¹ e 100 µg mL⁻¹. Os testes com o antibiótico nourseotricina (Gold Biotechnology®) foram realizados com 100, 150 e 200 µg mL⁻¹.

Foi considerada dose letal aquela que estava contida na placa onde não houve crescimento do fungo por um período de trinta dias.

Resultados e Discussão

Neste trabalho foi determinada a dose letal dos antibióticos higromicina B, geneticina (G418) e nourseotricina. A higromicina B inibe fortemente a síntese de proteína através de um duplo efeito sobre a tradução do mRNA (HYGROMYCIN.NET, 2012). A G418 é um antibiótico que bloqueia a síntese da cadeia polipeptídica inibindo o seu alongamento em células procariontas e eucariotas (www.antibiotics.toku-e.com). Já o mecanismo de ação da nourseotricina dá-se pela inibição da biossíntese de proteínas e indução de erro de codificação (JENA BIOSCIENCE, 2012). Esses antibióticos podem ser utilizados como agentes seletivos na transformação genética de fungos mediante o uso dos genes *hph*, *nptII* e *nat1*, que conferem resistência à higromicina B, geneticina e nourseotricina, respectivamente.

Os testes realizados com *Fsp* indicam que, para geneticina e higromicina B, doses de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ são suficientes para inibição completa do crescimento de colônias a partir de esporos e hifas (Figura 1 e 2). Já para nourseotricina, não foi observado crescimento em placas contendo doses entre $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, após trinta dias da inoculação (Figura 3).

O uso de marcadores de seleção adequados é essencial para o sucesso da transformação genética em fungos, visto que permite a eliminação das células não transformadas e assegura alto nível de resistência dos transformantes.

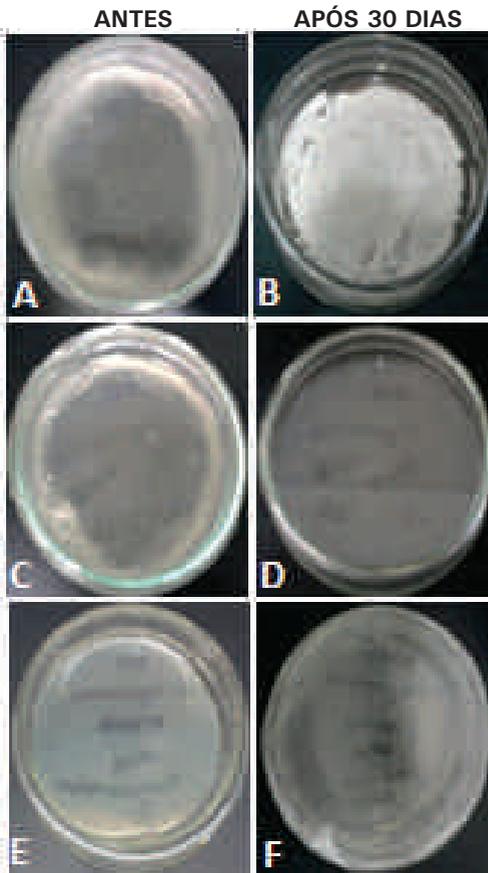


Figura 1. A e B) Controle: houve crescimento do fungo após 30 dias, em meio BDA sem antibiótico; C e D) 40 μmL^{-1} ; E e F) 100 μmL^{-1} .

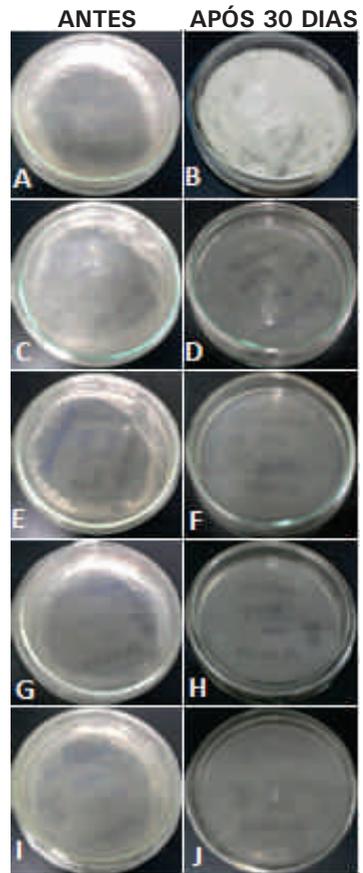


Figura 2. A e B) Controle: mostrou-se presente após 30 dias, em meio BDA sem antibiótico; C e D) 40 μmL^{-1} ; E e F) 60 μmL^{-1} ; G e H) 80 μmL^{-1} ; e I e J) 100 μmL^{-1} .

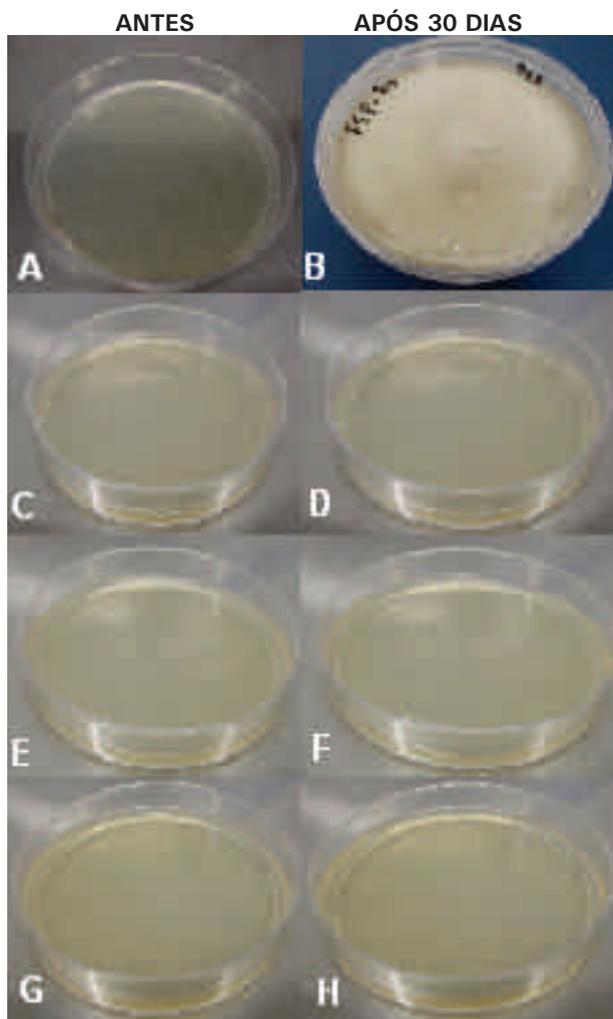


Figura 3. A e B) Controle: houve crescimento do fungo após 30 dias, em meio BDA sem antibiótico; C e D) Concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Não houve crescimento); E e F) Concentração de 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Não houve crescimento; e G e H) Concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Não houve crescimento.

Conclusões

As análises feitas neste estudo indicam que *Fsp* é suscetível aos antibióticos higromicina B ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$), geneticina ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) e nourseotricina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), e os genes que conferem resistência a esses antibióticos podem ser utilizados como marcadores de seleção em transformação genética.

Referências

BARBOSA, F. B. C. Biotecnologia molecular e novo padrão de financiamento: possibilidades para pesquisa da fusariose na pimenta-do-reino. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 19, n. 3, p. 429-449, 2002.

BENCHIMOL, R. L.; CHU, E. Y.; MUTO, R. Y.; DIAS-FILHO, M. B. Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas: sobrevivência e respostas morfofisiológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 7, p. 1343-1348, 2000.

FRANSEN, R. J. N. A guide to binary vectors and strategies for targeted genome modification in fungi using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 87, p. 247-262, 2011.

GOLD BIOTECHNOLOGY. **Antibiotics & Media Components**. St. Louis, 2012. Disponível em: <www.goldbio.com>. Acesso em: 29 jul. 2012.

GROOT M. J.; BUNDOCK P.; HOOYKAAS, P. J.; BEIJERSBERGEN, A. G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. **Nature Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 839-842, Sep. 1998.

HYGROMYCIN.NET. **Hygromycin**: mechanism of action. San Diego, CA, USA. 2012. Disponível em: <www.hygromycin.net>. Acesso em: 13 ago. 2012.

JENA BIOSCIENCE. **Nourseothricin superior selection antibiotic in molecular genetics**. Jena, Germany, 2012. Disponível em: <www.jenabioscience.com>. Acesso em: 29 jul. 2012.

KNOWLEDGE BASE, THE ANTIMICROBIAL INDEX. **Geneticin G418**. Bellingham, WA, USA. Disponível em: <www.antibiotics.toku-e.com>. Acesso em: 14 ago. 2012.

MORIOKA, L. R. I.; FURLANETO, M. C.; BOGAS, A. C.; POMPERMAYER, P.; DUARTE, R. T. D.; VIEIRA, M. L. C.; WATANABE, M. A. E.; FUNGARO, M. H. P. Efficient genetic transformation system for the Ochratoxigenic Fungus *Aspergillus carbonarius*. **Current Microbiology**, v. 52, p. 469-472, 2006.

MICHIELSE, C. B.; HOOYKAAS, P. J. J.; van der HONDEL, C. A. M. J. J.; RAM, A. F. J. Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Current Genetics**, v. 48, p. 1-17, 2005.

SHARMA, K. K.; KUHAD, R. C. Genetic transformation of lignin degrading fungi facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. **BMC Biotechnology**, v. 10, p. 67, 2010.

SUGA, H.; HYAKUMACHI, M. Genomics of Phytopatogenic *Fusarium*. **Applied Mycology & Biotechnology**, v. 4, p. 161-189, 2004.

YING-QING, Y.; MEI, Y.; MING-HAI, L.; YOUNG, L.; XIAO-XIA, H.; ER-XUN, Z. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation System for Rice Sheath Blight Pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. **Rice Science**, v. 18, n. 4, p. 297-303, 2011.