

## Anais da IX Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Occidental



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.cpa.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

# Obtenção de transformantes Mediados por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

---

*Flávia da Silva Fernandes*

*Nelcimar Reis Sousa*

*Luadir Gasparotto*

*Miguel Angel Dita Rodríguez*

*Gilvan Ferreira da Silva*

## Resumo

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), agente causal do mal-do-panamá em bananeiras (*Musa* spp.), é uma das doenças mais importantes na bananicultura. No Brasil, estão presentes as raças 1 (R1) e 2 (R2), que são responsáveis por severas perdas em banana dos grupos Maçã (AAB), Prata (AAB) e Figo (ABB). O controle por meio de fungicida é inviável e o uso de cultivares resistentes está condicionado ao surgimento de novas raças do patógeno. Contudo, a identificação de genes ou componentes de rotas metabólicas que atuam efetivamente na patogenicidade pode contribuir para o desenvolvimento de várias estratégias de controle da doença. Entre as ferramentas disponíveis para identificação de novos genes relacionados à patogenicidade ou virulência destaca-se a mutagênese insercional. Este trabalho teve como objetivo a obtenção de transformantes por mutagênese insercional através de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* e análise dos mutantes quanto ao crescimento e esporulação. A

transformação foi realizada com dois vetores binários: pGW-higromicina e pGW-higromicina-gfp em isolados da raça 1 (R1) e raça 2 (R2) de Foc. A análise comparativa entre selvagem e mutantes foi realizada em oito transformantes e revelou redução na esporulação que variou de ~90% a 57%. Dois transformantes R1 exibiram redução na produção de macro e microconídios de 89,2% e quatro R2 de 57,0%, em média. Quanto ao crescimento, quatro transformantes R2 e um R1 apresentaram deficiência no crescimento. Os resultados sugerem que a inserção do T-DNA provavelmente ocorreu em genes relacionados à esporulação e crescimento em Foc.

**Palavras-chave:** mal-do-panamá, transformação genética e *Musa* spp.

## Introdução

A bananeira é cultivada em mais de 100 países nas regiões tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil, que se destaca como um dos maiores produtores de banana, sendo responsável por 7% de toda a produção mundial (FAO, 2011; DANTAS et al., 1999 citado por MONTARROYOS, 2005). Na região Norte do País, os estados do Pará e do Amazonas concentram 88% da produção de banana dessa região. No Amazonas, o consumo per capita de banana é de aproximadamente 60 kg ano<sup>-1</sup>, sendo uma das principais bases alimentares da população amazonense (GASPAROTTO et al., 2006). O mal-do-panamá, causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (Foc), é também reconhecido como uma das doenças mais destrutivas em *Musa* spp. no mundo (PLOETZ, 2006). Inicialmente os sintomas são amarelecimento e murcha das folhas mais velhas, que progridem para as folhas mais jovens, até a morte de toda a planta. As plantas com infecção avançada apresentam descoloração do rizoma e necrose de vasos do xilema do pseudocaule. Assim, uma vez que o solo é infestado com Foc, variedades sensíveis não podem ser replantadas com sucesso por até 30 anos (STOVER, 1962, 1990).

Os dados genômicos têm criado uma demanda crescente por ferramentas e metodologias para o estudo da patogenicidade em escala genômica, oferecendo uma oportunidade sem precedentes para análise da estrutura genômica, bem como dos possíveis atributos que conferem a virulência ou patogênese (JEON et al., 2008). Em fungos a investigação da função dos genes relacionados à doença em plantas pode ser realizada pela obtenção de mutantes por meio da mutagênese insercional. Diferentemente da identificação realizada por meio de homologia e comparação de genomas, a mutagênese insercional permite identificar inclusive novos genes ainda não descritos. Em *F. oxysporum*, a identificação de novos genes relacionados à patogenicidade foi realizada por mutagênese insercional mediada por *Agrobacterium* (MICHIELSE et al., 2009). Essa abordagem tem sido utilizada com sucesso com outros fungos patogênicos de plantas, como *Magnaporthe oryzae*, *M. grisea* e *Leptosphaeria maculans*, para gerar grandes coleções de mutantes insercionais e para identificar genes de patogenicidade (BETTS et al., 2007; JEON et al., 2007). Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo obter mutantes por transformação mediada por *A. tumefaciens* (ATMT) e analisá-los quanto ao crescimento e esporulação.

## Material e Métodos

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, onde foram realizados os seguintes procedimentos:

- **Transformação por eletroporação de *A. tumefaciens***

A transformação de *A. tumefaciens*, linhagem AGL 1, com os plasmídios pGW - higromicina e pGW - higromicina-gfp ocorreu com o auxílio do equipamento *multiporator* (Eppendorf®), como descrito no protocolo Eppendorf nº 4308915.502, com as seguintes modificações: foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de cada plasmídeo ( $80 \text{ ng mL}^{-1}$ ) a um microtubo com 200  $\mu\text{L}$  de células eletrocompetentes; a solução

foi homogeneizada por meio de pipetagem e a mistura foi transferida a uma cubeta com abertura de 1 mm de largura. As condições para eletroporação foram utilizadas segundo recomendações da Eppendorf<sup>®</sup>. Após a eletroporação, foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  do meio LB-Manitol (10 g  $\text{L}^{-1}$  de triptona, 5 g  $\text{L}^{-1}$  de extrato de levedura, 2,5 g  $\text{L}^{-1}$  de NaCl, 10 g  $\text{L}^{-1}$  de manitol) e a solução foi transferida para um microtubo estéril, incubado por 1 hora e meia a 28 °C. Posteriormente as células foram plaqueadas em meio seletivo, contendo 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de espectinomicina e 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de carbenicilina. O período de incubação foi de 48 horas.

- ***Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* e condições de cultivo**

Foram utilizados isolados pertencentes à raça 1 (R1) e raça 2 (R2) de *F. oxysporum* f. sp. *ubense*, cedidos pelo Dr. Miguel Angel Dita (Embrapa Mandioca e Fruticultura, BA). O fungo foi crescido em BDA (batata-dextrose-ágar) (10 g  $\text{L}^{-1}$  de dextrose, 20 g  $\text{L}^{-1}$  de ágar e 200 g  $\text{L}^{-1}$  de disco de batata), a 25 °C.

- **Transformação genética de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT)**

A transformação genética em *F. oxysporum* f. sp. *ubense* foi realizada empregando a linhagem AGL1 de *A. tumefaciens* abrigando os vetores binários: pGW-higromicina (*hph* (*hygromycin B phosphotransferase* de *E. coli*)) sob o controle do promotor *P<sub>trpC</sub>* de *Aspergillus nidulans*), e pGW-higromicina-*gfp* (no qual a higromicina é controlada pelo promotor *P<sub>trpC</sub>* de *Aspergillus nidulans* e o gene repórter *gfp* - (*green fluorescent protein*) sob o controle do promotor *P<sub>toxA-5'</sub>* UTR de *Pyrenophora tritici-repentis*). O cocultivo foi realizado na proporção volumétrica de 1:1 (esporos: bactérias), com 10<sup>6</sup> esporos dos isolados das raças 1 e 2, sendo incubado a 22 °C, por 48 horas. Após os dois dias, a mistura foi plaqueada em meio de cultura BDA, suplementado com 130  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de higromicina e 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de cefotaxima. As placas foram incubadas a 25 °C.

- **Análise Morfológica**

A análise do crescimento e da esporulação foi realizada com oito transformantes que foram comparados aos isolados selvagens quanto ao crescimento e esporulação. Para contagem dos esporos (macro e microconídios) foi utilizada a câmara de Neubauer. O número de esporos visualizados em 5 subquadrantes do quadrante C do aparelho foi somado e desse total tirou-se uma média. Depois disso, o volume de esporos foi ajustado a  $10^6$  esporos / mL<sup>-1</sup> através do cálculo da média x 0,25 x  $10^6$ . O crescimento dos transformantes em relação ao selvagem foi observado sem auxílio de instrumento óptico.

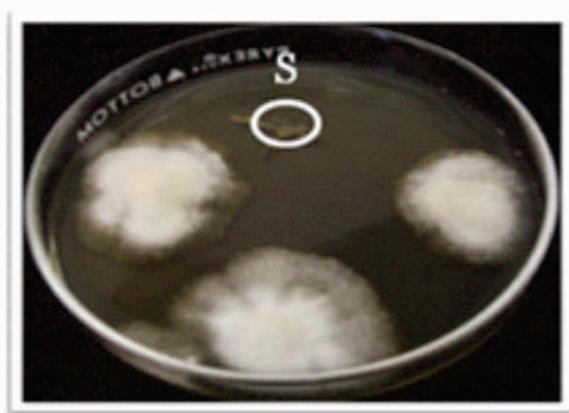
## Resultados e Discussão

A transformação mediada por *Agrobacterium* (ATM) é uma ferramenta para transformação em leveduras e fungos filamentosos (BUNDOCK, 1995; DE GROOT, 1998). A ATM é uma nova possibilidade para a mutagênese insercional, além de inserção mediada por enzima de restrição (REMI) e metodologias baseadas em transposon (TAGKO - Transposon-Arrayed Gene Knockout) (WELD et al., 2006). A inserção mediada por *Agrobacterium* foi realizada com sucesso para identificar fatores de patogenicidade em vários fungos fitopatogênicos como *Magnaporthe oryzae*, *M. grisea*, *Leptosphaeria maculans*, *Cryptococcus neoformans*, *Coniothyrium minitans* (BETTS et al., 2007; JEON et al., 2007; IDNURM et al., 2004; ROGERS et al., 2004). Neste trabalho, a partir das duas construções utilizadas, construção 1 (*hph*) e construção 2 (*gfp-hph*), foram obtidos 25 transformantes (Tabela 1). A análise desses transformantes quanto ao nível de resistência a higromicina mostrou que 100% deles eram capazes de crescer em concentração de até  $130 \mu\text{g mL}^{-1}$  de higromicina B. Desses transformantes, oito foram selecionados aleatoriamente para análise da esporulação e crescimento, sendo um da raça 1 (M10) e cinco da raça 2 (M21, M25, M49, M16, M23) de *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, a partir de pGW-higromicina, e dois transformantes foram obtidos a partir de pGW-higromicina-gfp, (G3) e (G10), pertencentes à raça 1 e à raça 2 de foc, respectivamente.

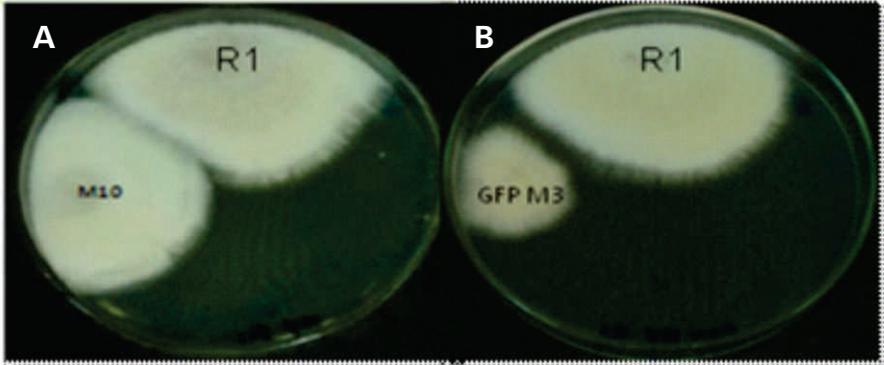
Quando comparados ao Foc selvagem, a redução na esporulação dos transformantes variou de ~90% a 57%. Dois de R1 exibiram redução na produção de macroconídios e microconídios de 89,2% e quatro R2 de 57,0% em média. Dos oito isolados avaliados, quatro transformantes R2 e um R1 apresentaram deficiência no crescimento. Não foi observada correlação entre a deficiência no crescimento e a esporulação dos transformantes. Os resultados sugerem que a inserção do T-DNA provavelmente ocorreu em genes relacionados à esporulação e ao crescimento em Foc.

**Tabela 1.** Número de transformantes obtidos a partir das construções (*hph*) e (*gfp-hph*) em foc.

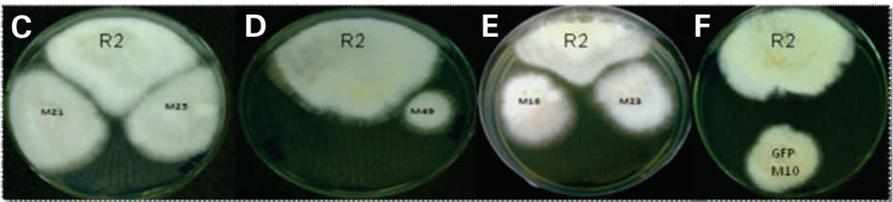
Construções	Fow2 <i>hph</i>		Fow2 <i>gfp hph</i>	
Raças do Foc.	R1	R2	R1	R2
Transformantes	05	08	03	09



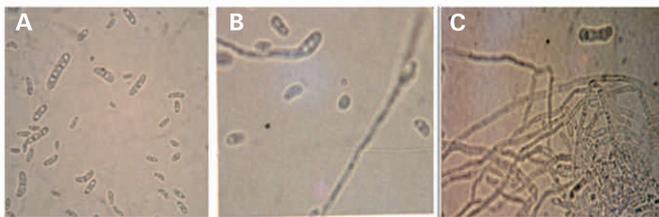
**Figura 1.** Transformantes crescendo em meio BDA suplementado com 130  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de higromicina. S representa o isolado selvagem.



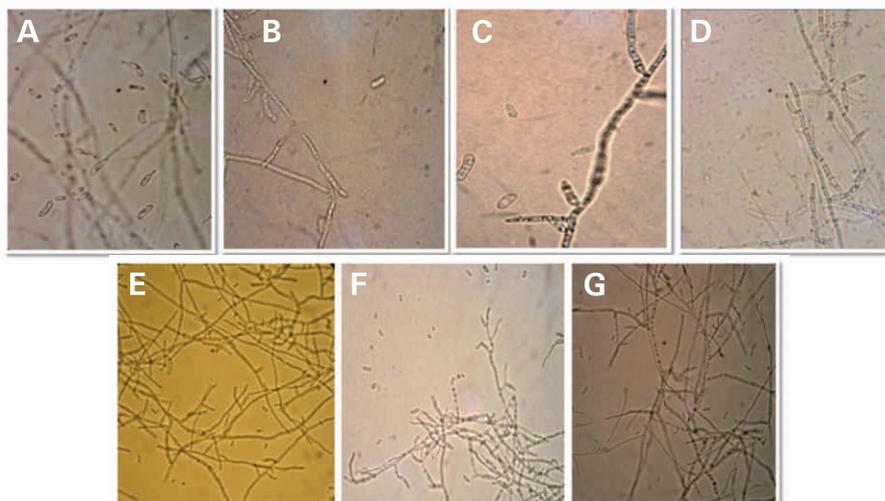
**Figura 2.** Análise comparativa do crescimento entre selvagens da raça 1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e transformantes obtidos a partir de pGW-higromicina (A) e pGW-higromicina-gfp (B). A- Transformante 10, B- Transformante 3.



**Figura 3.** Análise comparativa do crescimento entre selvagens da raça 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e transformantes obtidos a partir do cassete pGW-higromicina (C, D e E) e pGW-higromicina-gfp (F). C- Transformantes 21 e 25, D- Transformante 49, E - Transformantes 16 e 23 e F- Transformante 10.



**Figura 4.** Análise comparativa da esporulação entre o selvagem da raça 1 (R1) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e transformantes obtidos a partir de pGW- higromicina (B) e pGW-higromicina-gfp (C). A- Foc selvagem R1, B- Transformante 10 e C- Transformantes 3.



**Figura 5.** Análise comparativa da esporulação entre o selvagem da raça 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense e transformantes obtidos a partir de pGW-higromicina (B, C, D, E, F) e pGW-higromicina-gfp (G). A- Foc selvagem R1, B- Transformante 25, C- Transformante 21, D- Transformante 49, E - Transformante 23, F- Transformante 16, e G- Transformante 10.

## Conclusões

Os dados obtidos indicam que não houve correlação entre deficiência do crescimento e esporulação e sugerem que a inserção do T-DNA pode ter ocorrido em genes relacionados ao crescimento e esporulação.

## Agradecimentos

À Embrapa Amazônia Ocidental, pela estrutura concedida; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam), pela ajuda financeira; ao meu orientador, colegas de laboratório e familiares, pelo apoio.

## Referências

BETTS, M. F.; TUCKER, S. L.; GALADIMA, N.; MENG, Y.; PATEL G.; LI, L.; DONOFRIO, N.; FLOYD, A.; NOLIN, S.; BROWN, D.; MANDEL, M. A.; MITCHELL, T. K.; XU, J. R.; DEAN, R. A.; FARMAN, M. L.; ORBACH, M. J. Development of a high rate of change for insertional mutagenesis in *Magnaporthe oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, p. 1035-1049, 2007.

BUNDOCK, P.; *DEN DULK-RAS, A.*; BEIJERSBERGEN, A.; HOOYKAAS, P. J. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* *Saccharomyces cerevisiae*. **Embo Journal**, v. 14, p. 3206-3214, 1995.

DE GROOT, M. J. A.; BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P. J. J.; BEIJERSBERGEN, A. G. M. *Agrobacterium Tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. , v. 16, p. 839-842, 1998.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R.; HANADA, R. E.; MONTARROYOS, A. V. V. **Sigatoka-negra da bananeira**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2006. 177 p.

FAO. **Food and Agricultural Organization**. 2011. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 24 maio 2011.

IDNURM, A.; REEDY, J. L.; NUSSBAUM, J. C.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* gene discovery virulence by insertional mutagenesis. **Eukaryot Cell**, v. 3, p. 420-429, 2004. Doi: 10.1128/EC.3.2.420-429.2004.

JEON, J.; PARQUE, S.Y.; CHI, M. H.; CHOI, J.; PARQUE, J.; RHO, H.S.; KIM, S.; GOH, J.; YOO, S.; CHOI, J.; PARK, J.Y.; YI, M.; YANG, S.; KWON, M. J.; HAN, S.S.; KIM, B. R.; KHANG, C.H.; PARQUE, B.; LIM, S. E.; JUNG, K.; KONG, S.; KARUNAKARAN, M.; OH, H.S.; KIM, H.; KIM, S.; PARK, J.; KANG, S.; CHOI, W. B.; KANG, S.; LEE, Y. H.: Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. **Nature Genetics**, v. 39, p. 561-565, 2007.

JEON, J.; CHOI, J.; PARK, J.; LEE, Y. Functional genomics in the rice blast fungus to unravel the fungal pathogenicity. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 9, n. 10, p. 747-752, 2008.

MICHIELSE, C. B.; VAN WIJK, R.; REIJNEN, L.; CORNELISSEN, B. J.; REP, M. Visão sobre os requisitos moleculares para patogenicidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em grande escala através de mutagénesis insercional. **Genome Biology**, v. 10, n. 1, p. 4, 2009.

MONTARROYOS, A. V. V. **Análise da diversidade genética e patogênica de *Mycosphaerella fijiensis* e *Mycosphaerella musicola* no Brasil**. 2005. 163 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

PLOETZ, R. C. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Phytopathology**, v. 96, p. 653–656, 2006.

STOVER, R. H. **Fusarial Wilt (Panama Disease) of Bananas and Other Musa Species**. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute, 1962.

STOVER, R. H. Fusarium wilt of banana: some history and current status of the disease. In: PLOETZ, R. C. (Ed.). **Fusarium wilt of banana**. St Paul: APS Press, 1990. p. 1–7.

ROGERS, C. W.; CHALLEN, M. P.; GREEN, J. R.; WHIPPS, J. M. REMI use of Agrobacterium-mediated transformation and to identify mutants pathogenicity biocontrol, *Coniothyrium minitans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 241, p. 207-214, 2004.

WELD, R. J.; PLUMMER, K.M.; CARPENTER, M. A.; RIDGWAY, H. J. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. **Cell Research**, v. 16, p. 31–44, 2006.