

**TRANSFORMAÇÃO DE *Fusarium oxysporum*
f. sp. *vasinfectum* COM OS GENES
MARCADORES GFP e DsRed**

RODRIGO PEDROZO

2009

RODRIGO PEDROZO

**TRANSFORMAÇÃO DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* COM OS
GENES MARCADORES GFP e DsRed**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. José da Cruz Machado

Lavras
Minas Gerais-Brasil
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Pedrozo, Rodrigo.

Transformação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* com os genes marcadores GFP and DsRed / Rodrigo Pedrozo. – Lavras : UFLA, 2009.

44 p. : il.L

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: José da Cruz Machado.

Bibliografia.

1. Algodão. 2. *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. 3. Transformação genética. 4. Gene repórter 5. Green Fluorescent Protein (GFP) 6. Red Fluorescent Protein (DsRed) I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.5194

RODRIGO PEDROZO

**TRANSFORMAÇÃO DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* COM OS
GENES MARCADORES GFP e DsRed**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 27 de março de 2009

Prof. Dra. Antonia dos Reis Figueira UFLA

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães UFLA

Prof. Dr. José da Cruz Machado
UFLA
(Orientador)

Lavras
Minas Gerais-Brasil
2009

Com muito carinho e amor, como forma de minha eterna gratidão, à minha irmã Bianca Pedrozo, minha mãe Luzia A. B. Pedrozo e ao meu pai, Sérgio D. Pedrozo., que sempre me incentivaram, me apoiaram e estiveram presentes em todas as etapas de minha vida,

OFEREÇO

Em memória de meu avô Antônio Bombo e de minhas avós Irene e Olímpia, pela convivência e alegria transmitida durante tantos anos,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Fitopatologia e ao Laboratório de Patologia de Sementes juntamente ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade da realização do meu curso mestrado e pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. José da Cruz Machado, pelos valiosos conselhos, ensinamentos, amizade e principalmente por mais uma oportunidade de realização de mais um grande trabalho.

À Profa. Dra. Antonia dos Reis Figueira e ao pesquisador Dr. Theo van der Lee, pelo entusiasmo, confiança e colaboração.

Às minhas amigas Luana da Silva Botelho e Carolina da Silva Siqueira (Carol), pelo auxílio, sempre presente e muito eficiente, em todas as etapas desenvolvidas neste trabalho.

Aos colegas e colaboradores do Laboratório de Patologia de Sementes e Virologia Vegetal, que contribuíram para realização deste trabalho e pelo incontestável acolhimento e amizade.

A todas as outras pessoas que de alguma forma me auxiliaram direta ou indiretamente para o desenvolvimento não só deste, mais de tantos outros trabalhos.

Aos meus pais, pela educação e ensinamentos concedidos, que sempre estiveram comigo e me ajudaram em vários momentos de minha vida.

Sumário

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Características gerais da fusariose do algodoeiro	4
2.2 Transformação genética de fungos	6
2.3 Gene repórter	8
2.4 Proteínas verde e vermelha fluorescentes (GFP e DsRed) como genes repórteres	10
2.5 Uso das proteínas fluorescentes GFP e DsRed em estudos com fungos fitopatogênicos.....	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f sp. <i>vasinfectum</i> e plasmídeo	17
3.2 Transformação de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>vasinfectum</i> (<i>Fov</i>).....	18
3.3 Avaliação das características morfológicas e culturais dos isolados transformados	19
3.4 Detecção dos genes GFP e DsRed utilizando primers específicos	20
3.5 Teste de patogenicidade.....	22
3.6 Delineamento experimental e análises estatísticas	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5 CONCLUSÕES	37
6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	38

RESUMO

PEDROZO, Rodrigo. **Transformação de *Fusarium oxysporum* f sp. *vasinfectum* com os genes marcadores GFP and DsRed**. 2009. 44p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

Fusarium oxysporum f. sp. *vasinfectum* é o agente etiológico da fusariose, uma das principais doenças do algodoeiro nas condições brasileiras. Trata-se de uma doença cujos sintomas se iniciam com o amarelecimento e abscisão dos cotilédones e folhas, seguida por descoloração do sistema vascular, resultado da obstrução dos vasos do xilema, e posteriormente a murcha e morte das plantas infectadas. Para investigar o mecanismo da interação patógeno hospedeiro, neste trabalho fez-se a transformação desse fungo com dois genes que codificam proteínas fluorescentes, a GFP e a DsRed, que fluorescem quando excitadas a 558 e 395nm, respectivamente, usando apenas um dos genes em cada transformação. Todas as estruturas dos fungos transformados, tanto com o gene da GFP como com o da DsRed, apresentaram uma alta fluorescência quando examinadas ao microscópio, nos respectivos comprimentos de onda. Ambos apresentaram crescimento micelial típico, semelhante aos dos não transformados, com as mesmas características morfológicas *in vitro*, e a presença dos genes foi confirmada por PCR, utilizando primers específicos. Nos testes de inoculação artificial verificou-se que a patogenicidade dos isolados transformados não foi alterada e, quando reisolados pelos métodos convencionais, foram capazes de reproduzir a infecção e manter a fluorescência nas gerações seguintes.

*Comitê orientador: José da Cruz Machado – UFLA (Orientador); Antonia dos Reis Figueira–UFLA

ABSTRACT

PEDROZO, Rodrigo. **Transformation of *Fusarium oxysporum* f sp. *vasinfectum* with GFP and DsRed gene markers**. 2009. 44p. Dissertation (Master Science Program in Plant Pathology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*.

Fusarium oxysporum f sp. *vasinfectum*, the causal agent of fusarium wilt disease of cotton, is frequent in most cotton-producing regions in Brazil. The fungus infects roots, colonizes the rhizomes and eventually blocks the vascular system of the pseudostems, leading to the plant collapse. The Green and Red Fluorescent Proteins (GFP and DsRed) emit green and red fluorescence respectively when excited by blue and green light, making them useful tools to study early pathogen infection and other aspects of interest in plant pathology. In this context the aim of this study was to transform *Fusarium oxysporum* f sp. *vasinfectum* isolates with those markers and to compare the transformants with the wild-type isolates. Two isolates, with different geographic origins in Brazil, were transformed with the GFP and DsRed derivative markers using hygromycin B as an indicative marker. The results showed that the transformed isolates did not differ from the wild-type isolates in relation to growth and morphological characteristics in vitro. Analyses in fluorescence microscope showed expression of the green and red fluorescent proteins in the fungal structures. Also, the presence of GFP and DsRed in the fungal isolates was confirmed by PCR using specific primers. In the pathogenicity tests it was observed that the virulence of the transformant isolates was maintained. From infected tissues of artificially inoculated plants of cotton the transformed isolates were re-isolated and they expressed both proteins markers in the fluorescence microscope.

*Advising Committee: José da Cruz Machado – UFLA (Adviser); Antonia dos Reis Figueira– UFLA

1 INTRODUÇÃO

A fusariose do algodoeiro tem como agente etiológico *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, caracterizado como patógeno de solo e colonizador do sistema vascular da planta (Smith et al., 1981; Shi et al., 1992; Davis et al., 2006). Apesar da importância econômica desse fitopatógeno, os mecanismos de patogenicidade e desenvolvimento de sintomas ainda não foram bem esclarecidos (Aboul-Soud et al., 2003), levando-se, em alguns casos, ao diagnóstico errôneo e pouco fundamentado em pesquisas científicas. Isso decorre, na maioria dos casos, em razão das plantas apresentarem-se de forma assintomática, o que faz com que o patógeno possa permanecer por vários anos viável, mesmo na ausência do hospedeiro (Armstrong & Armstrong, 1948).

O estudo do mecanismo de infecção e colonização de plantas tem sido bastante facilitado com o uso de genes marcadores, que podem ser empregados para transformar o genoma do patógeno de modo a torná-lo mais facilmente detectável nos tecidos vegetais. Essa abordagem vem se destacando em estudos de transformação genética de *Fusarium oxysporum* (Zimmer, 2005; Olivain et al., 2005; Sarroco et al., 2007). Nos estudos pioneiros, realizados com a aplicação de marcadores tradicionais como β -glucuronidase-GUS e luciferase, a maior limitação para a visualização da interação planta-fungo era a necessidade de se fixar os tecidos, levando à perda de produtos celulares, dificultando, portanto, o entendimento dos eventos no momento em que eles ocorrem (Maor et al., 1998). Uma excelente alternativa apareceu com o sequenciamento e clonagem do gene *gfp*, que codifica a proteína denominada *green fluorescent protein* (GFP) (Maor et al., 1998; Di Pietro et al., 2001; Di Pietro et al., 2003; Oren et al., 2003)

Essa proteína é produzida por uma água-marinha bioluminescente chamada *Aequorea Victoria*, resultante de uma ligação iônica entre cálcio e uma fotoproteína denominada aequorin, presente em todo o corpo desse organismo marinho (Shimomura, 2005). Ela possui 238 amino-ácidos que absorvem luz azul em picos de 395nm até no máximo 470nm, emitindo posteriormente uma luz verde nos comprimentos de onda entre 509nm a 540nm. Essa proteína verde fluorescente (GFP) vem se destacando como gene marcador, por ser um composto muito estável e com baixa ou nenhuma toxicidade quando fundidas a muitas outras proteínas celulares e extracelulares de interesse, além de não necessitar de cofatores externos para seu uso, o que possibilita sua visualização *in vivo*. (Tisen, 1998; Cubbit et al., 1995; Cubbit et al., 1999; Schwartz & Patterson, 2003).

A partir da molécula de GFP, várias outras proteínas fluorescentes têm sido desenvolvidas, alterando somente a posição de algumas cadeias dos amino ácidos constituintes, tais como, 'blue, cyan and yellowish green fluorescent proteins' possibilitando, dessa forma, a utilização simultânea de mais de um marcador. Porém, nenhuma dessas novas proteínas fluorescentes possui picos de emissão superiores a 529nm. Isso as torna não muito confiáveis quando estudadas juntamente com o GFP, dependendo da finalidade do trabalho, pois essa similaridade nos comprimentos de onda poderia gerar diagnósticos errôneos. Nesse contexto, a partir de outro organismo marinho, mais precisamente um coral, denominado *Discosoma* spp, surgiu uma outra proteína fluorescente, porém de cor vermelha (DsRed) e com comprimento de emissão de até 583 nm. (Heim & Tsien, 1996; Schwartz & Patterson, 2003; Zimmer, 2005)

Devido a essa diferença entre os picos de emissão, a distinção entre DsRed e GFP com a utilização microscópio de fluorescência torna-se mais fácil sendo, portanto, a DsRed uma excelente ferramenta para estudos de interação entre microrganismos em combinação com a GFP. Entretanto, podem também

ser empregadas separadamente para transformar diferentes microrganismos visando a detectar a sua presença em tecidos vegetais vivos. Estudos já realizados têm demonstrado a eficácia da utilização dessa proteína vermelha fluorescente em fungos filamentosos fitopatogênicos (Nahalkova & Faheti, 2003; Sarroco et al., 2007).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi transformar isolados de *Fusarium oxysporum* f sp. *vasinfectum* utilizando os genes marcadores green e red fluorescent proteins (GFP e DsRed) separadamente, e em seguida determinar a estabilidade dos fungos transformados em relação à sua integridade fenotípica e patogênica, quando comparados aos isolados originais não transformados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características gerais da fusariose do algodoeiro

Uma das principais doenças da cultura do algodoeiro, capaz de provocar grandes perdas em campos de produção, é conhecida por fusariose, cujo agente etiológico é o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov). Taxonomicamente, *Fusarium oxysporum* é um fungo do grupo dos Ascomycetes, embora sua fase teleomórfica ainda não seja conhecida. A espécie difere em *formae speciales* e raças que são caracterizadas conforme o hospedeiro, no qual se realizou o primeiro isolamento. A *formae specialis vasinfectum* é patogênica ao algodoeiro. No entanto, o patógeno tem uma ampla gama de hospedeiros, sendo encontrado em leguminosas, malváceas e solanáceas. Mesmo na ausência de planta hospedeira (Algodoeiro) o *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* persiste no solo, na forma de estruturas de resistência denominadas clamidosporo por até 12 anos, apresentando alta incidência da doença (Davis et al., 2006). Além disso, podem ser encontradas formas capazes de colonizar raízes assintomaticamente por meio de crescimento saprofítico em matéria orgânica. De maneira geral, o patógeno é caracterizado morfológicamente por apresentar microconídios, macroconídios e estruturas de resistência denominadas clamidósporos. Os microconídios são unicelulares produzidos abundantemente em fiálides curtas, formando falsas cabeças. Os macroconídios são falcados quase retos, apresentando três a cinco septos (Nelson et al., 1983, Smith et al., 1981; Agrios, 2005).

Por ser um patógeno de solo, o fungo invade a planta hospedeira pela ponta das raízes, preferencialmente por ferimentos encontrados nas mesmas, causados tanto por fatores bióticos como abióticos (Smith et al., 1981; Shi et al., 1992). Uma vez dentro do hospedeiro sua colonização se dá no tecido vascular, acarretando a formação de tilose, micélio, géis vasculares e esporos nesses

tecidos, resultando em resistência ao livre fluxo de seiva, levando a planta a apresentar um de seus principais sintomas - a murcha generalizada. Além da murcha, outra importante característica da doença, também relacionada à colonização dos tecidos vasculares, é a ocorrência de coloração avermelhada ao longo dos mesmos que podem estar relacionadas com a produção de etileno e a oxidação de fenóis (Smith et al., 1981).

Os sintomas da murcha podem ocorrer desde a emergência até a fase adulta da planta. Quando as plântulas são expostas à alta concentração de inóculo, podem apresentar sintomas de epinastia, descoloração dos cotilédones e de folhas jovens e paralisação do crescimento, culminando com a murcha e queda de folhas. Geralmente, em infecções precoces, o patógeno encontra-se somente no córtex da raiz, não evidenciando sintomas (Smith et al., 1981). Em plantas adultas, inicialmente ocorre perda de turgescência, sendo caracterizada a murcha. Em seguida, as folhas apresentam lesões irregulares de coloração amarelada evoluindo para necrose. O patógeno é disseminado dentro e entre as lavouras pelo movimento de solo infestado, restos culturais, água de irrigação, equipamentos agrícolas e sementes contaminadas (Kraft et al., 1981), evidenciando, ainda mais, a importância do controle com base em medidas de exclusão para evitar a entrada do patógeno em áreas isentas. A disseminação é mais acentuada em solos arenosos e potencializada na presença de nematóides, principalmente das espécies *Meloidogyne incognita*, *Rotylenchulus reniformis* e *Pratylenchus brachyurus* (Martin et al., 1956; Mitchell & Powell, 1972).

Entre as medidas de controle que restringem a disseminação do agente da murcha de fusarium destacam-se o uso de sementes sadias e variedades resistentes. Entretanto, o sucesso da utilização de variedades resistentes como medidas de controle depende do conhecimento da variabilidade patogênica do fungo (Smith et al., 1981; Davis et al., 2006).

2.2 Transformação genética de fungos

A terminologia “transformação genética” refere-se aos processos de inserção de fragmentos de DNA exógeno em células hospedeiras, com a finalidade de promover a alteração genotípica do organismo receptor e/ou a expressão desse DNA exógeno, permitindo dessa maneira estudos de determinados aspectos da biologia molecular de praticamente qualquer organismo vivo (Mullins & Kang, 2001).

O processo de transformação genética pode ser dividido em três etapas principais: (I) indução da competência da célula hospedeira; (II) introdução do DNA exógeno, e finalmente (III) seleção das células transformadas (Mullins & Kang, 2001). As metodologias utilizadas na introdução do DNA exógeno estão diretamente vinculadas ao tipo de célula hospedeira, podendo ser divididas em três grupos: 1) obtenção de protoplastos, seguida de tratamento químico (Polietilenoglicol-PEG) ou eletroporação; 2) biobalística (Bombardeamento de partículas) e 3) Intermediada pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens*.

No caso de fungos filamentosos, a estratégia de transformação que envolve a utilização de protoplasto fungico, juntamente com o composto polietilenoglicol (PEG), tem sido a mais utilizada. Entretanto, comparativamente às outras duas técnicas mencionadas, essa metodologia possui uma serie de desvantagens, sendo primeiramente tida como um processo demorado e laborioso que exige a otimização de várias etapas e tem como variáveis mais relevantes: o tipo de composto lítico, o estabilizador osmótico e o tempo de digestão da parede celular, além de ser considerada uma metodologia com baixa eficiência no processo de transformação.

Essa metodologia baseia-se, primeiramente, na indução da competência da célula hospedeira, realizada através da obtenção de protoplastos, que são caracterizados por células desprovidas de parede, obtidas artificialmente a partir da digestão enzimática da parede celular. Parte-se do princípio que a entrada do

DNA exógeno é facilitada pela ausência da parede (Mullins & Kang, 2001). Sem a parede os protoplastos estão sujeitos à lise osmótica, portanto faz-se necessária a presença de um estabilizador desse potencial. Após a entrada do DNA exógeno, os protoplastos devem ser incubados em meios seletivos específicos, adicionados ao estabilizador osmótico para promover a regeneração da hifa. Uma série de compostos pode ser utilizada como estabilizadores osmóticos. Os mais comuns são sais inorgânicos, carboidratos e açúcares, tais como: KCl, NaCl (0,7 M), sorbitol 1,2 M e a sacarose 0,6 M (PEBERDY, 1979). Conseqüentemente, a entrada do DNA transformante é promovida pelo tratamento dos protoplastos com íons cálcio (CaCl_2) e pela ação caotrópica do composto polietilenoglicol (PEG), que auxilia no aumento da solubilidade das proteínas da membrana celular. A suspensão de protoplastos (em estabilizador osmótico e tampão) é misturada ao cloreto de cálcio, PEG e o DNA exógeno. O cloreto de cálcio é capaz de neutralizar a carga negativa da membrana celular, enquanto o PEG proporciona a interação das moléculas de DNA com os protoplastos (Ballance & Turner, 1985). É comum ocorrer a fusão de protoplastos em solução, e acredita-se que é nesse momento que o DNA é incorporado.

Além desses aspectos necessários ao desenvolvimento de uma metodologia de transformação genética, é preciso que os vetores utilizados contenham genes marcadores de seleção, os quais permitem, como seu próprio nome já diz, a seleção das células que receberam o DNA exógeno ou também chamadas de células transfectadas.

Dentre os genes marcadores de seleção, utilizados na transformação genética de fungos, pode-se destacar os marcadores de resistência, também conhecidos como marcadores dominantes, que atuam aumentando o nível de resistência da linhagem contra antibióticos e outras drogas, exigindo dessa forma

que a linhagem a ser transformada seja sensível ou parcialmente sensível a esses antibióticos ou drogas (Ruiz-Díez, 2002).

Os marcadores de resistência mais empregados consistem em genes clonados tanto de organismos procariotos como de eucariotos, onde se destacam genes de resistência à bleomicina (bleo), fleomicina (ble), higromicina-B (hph), oligomicina (oliC31) e ao fungicida benomil (bml), sendo o marcador higromicina-B (hph) o mais utilizado para transformar fungos filamentosos. (van Den Hondel & Punt, 1990; Austin et al., 1990; Gritz & Davies, 1983).

Higromicina B é um antibiótico do grupo aminoglicosídeo, produzido por uma bactéria chamada *Streptomyces hygroscopicus*, que atua no bloqueio da síntese de proteínas, o que, conseqüentemente, resulta no impedimento do crescimento de microorganismos tanto eucariontes como procariontes. Foi descoberta originalmente na década de 50 através de uma amostra de solo, e era utilizada a princípio para fins veterinários. Somente na década de 80 os genes relacionados à sua resistência foram descobertos, e a partir desse período tem sido usado na seleção de vários organismos transformados geneticamente (Rao et al., 1983; Borovinskaya et al., 2008).

2.3 Gene repórter

Um gene repórter pode ser compreendido como sendo uma sequência de nucleotídeos, a qual, quando introduzida dentro de um sistema biológico, produz uma medida fenotípica da expressão gênica sendo, portanto, um parâmetro conveniente que correlaciona eventos moleculares associados com a expressão genética (Mullins & Kang, 2001; Zimmer, 2005).

O uso de genes repórteres é uma técnica bastante utilizada para estudar a regulação de um gene específico, que utiliza a região regulatória do gene alvo fundida a um gene repórter permitindo, dessa maneira, a verificação de sua regulação por observação da expressão do gene repórter. Por exemplo, através

do fenótipo de um gene repórter pode-se estimar quantitativamente a taxa de transcrição imediata do gene ao qual está fundida.

Vários tipos de genes repórteres encontram-se atualmente disponíveis no mercado, cada qual com suas características particulares bem como suas limitações. Ao se conduzir um experimento a escolha do tipo mais adequado dependerá do tipo de questão que se pretende abordar e das peculiaridades fisiológicas do modelo em estudo. Portanto, dependendo da investigação, deve-se optar por uma proteína repórter que seja expressa intra ou intercelularmente (presente somente no núcleo ou somente no citoplasma) ou, inversamente, que seja secretada, para sua quantificação, em meio de cultura (Mullins & Kang, 2001).

Os ensaios utilizando genes repórteres podem ser conduzidos tanto *in vitro* como *in vivo* sendo que nos ensaios *in vitro* a proteína repórter é quantificada a partir de lisados de células ou tecidos ou usando meio de cultura das células transfectadas, no caso de proteínas secretadas. Em caso de ensaios *in vivo*, a proteína repórter é detectada em células e/ou tecidos vivos ou ainda através de materiais fixados, sendo nesse caso mais empregada em estudos histoquímicos. Atualmente, dentre os genes repórteres mais amplamente utilizados em estudos relacionados à expressão gênica, como os que codificam enzimas como cloranfenicol acetil-transferase (CAT), luciferase de vaga lume (Luc) e β -Glucoronidase (GUS) destacam-se as proteínas fluorescentes GFP e DsRed, devido à sua maior eficiência e facilidade de manipulação (Wood, 1995; McFadden et al., 2002; Zimmer, 2005).

2.4 Proteínas verde e vermelha fluorescentes (GFP e DsRed) como genes repórteres

As proteínas fluorescentes como genes repórteres têm se tornado uma das mais eficientes ferramentas utilizadas atualmente na biologia molecular, permitindo, desde a localização de proteínas até a quantificação da expressão de determinados genes tanto em análise em *in vivo* como em *in vitro*.

A primeira proteína fluorescente conhecida a GFP, sigla em inglês para proteína verde fluorescente, é um polipeptídeo de 238 aminoácidos com peso molecular de 28 kDa que absorve luz em picos máximos de 395 e 475 nm e emite no pico máximo de 508 nm. Foi descoberta em 1955 por Osamu Shimomura, um pesquisador japonês responsável pelos primeiros estudos relacionados a essa proteína. Ele a isolou de uma água viva denominada *Aequorea victoria*, que possui um órgão bioluminescente capaz de emitir um brilho verde quando o animal é agitado. Nos anos seguintes, mais precisamente em 1970, ele conseguiu desvendar o mecanismo bioquímico que conferia essa propriedade à proteína. No entanto, apenas em 1992 o gene responsável por essa bioluminescência foi clonado e seqüenciado através de estudos realizados pelo pesquisador Douglas Prasher (Prasher, 1992). Após dois anos dessa contribuição, o pesquisador Martin Chalfie (Chalfie et al., 1994), juntamente com seus colaboradores, relatou a primeira transformação genética bem sucedida utilizando essa proteína como gene repórter em microrganismos (Cubitt et al., 1995; Karlsson & Pines, 1998; Lorang et al., 2001, Shomomura 2005, Zimmer, 2005)

Após cinquenta anos da descoberta da proteína verde fluorescente (GFP) juntamente com o advento da biotecnologia, varias outros marcadores fluorescentes originados da molécula da proteína original GFP, denominados variantes, estão disponíveis no mercado (Figura 1). Entretanto, tais variantes, apesar de possuírem colorações das mais distintas comparadas a GFP, não

possuem diferenciação em seus comprimentos de onda de emissão para sua distinção total com a molécula de GFP, o que, em outras palavras, as tornam não muito úteis em estudos para monitoramento simultâneo entre dois microorganismos, por exemplo. Nesse sentido, originado a partir de outro organismo marinho, mais precisamente um coral, conhecido cientificamente por *Discosoma* sp., surgiu a proteína vermelha fluorescente (DsRed), que apesar de apresentar características semelhantes a GFP, necessita de um comprimento de onda maior - cerca de 583nm - para sua visualização, o que definitivamente facilita sua distinção com a molécula de GFP.

O grande interesse do uso dessas proteínas fluorescentes na marcação gênica deve-se às vantagens oferecidas por essas ferramentas, tais como: as expressões de GFP e DsRed podem ser visualizadas em observações *in vivo* de células individuais, populações de células ou em organismos que interagem com simbiontes ou com o ambiente em tempo real. Isso porque para a visualização da fluorescência é exigida somente luz azul (no comprimento de onda 508nm) ou verde (no comprimento de onda 583nm), juntamente com oxigênio atmosférico, não necessitando por tanto do preparo dos tecidos analisados (adição de cofatores), ao contrário do que ocorre com outros genes repórteres (ex. β -glucuronidase, β -galactosidase, cloranfenicol acetiltransferase e luciferases) que dependem da adição de cofatores ou substratos exógenos aos tecidos examinados. Além disso, essas proteínas são extremamente estáveis, possuem baixa ou nenhuma toxicidade ou atividade endógena, além de manter a atividade quando fusionada a muitas proteínas celulares e extracelulares. (Lorang et al., 2001; Lagopodi et al., 2002).

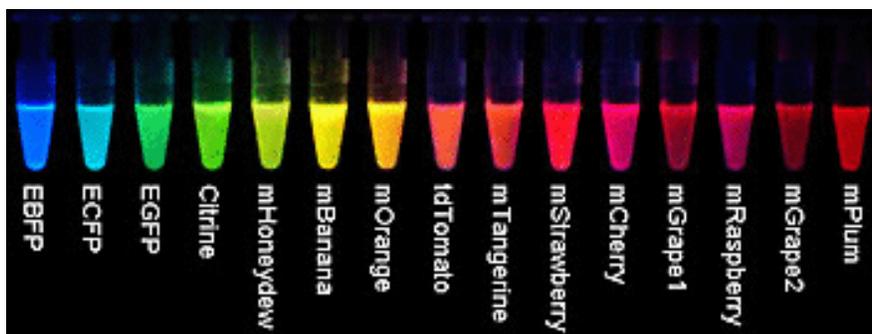


FIGURA 1 Novos variantes da molécula de GFP disponíveis atualmente no mercado*

2.5 Uso das proteínas fluorescentes GFP e DsRed em estudos com fungos fitopatogênicos

Os primeiros estudos envolvendo o emprego de proteínas fluorescentes em fungos foram relatados com leveduras, conforme relato de Cormack, (1998), sendo *Ustilago maydis* o primeiro fungo filamentoso, ao qual a expressão de GFP foi relatada (Spellig et al., 1996). Desde então, inúmeros trabalhos foram realizados com diversas espécies de fungos expressando GFP (Suelmann et al., 1997; Fernández-Ábalos et al., 1998; Dumas et al., 1999; Liu & Kalattukudy, 1999; Du et al., 1999; Van West et al., 1999; Bae & Knudson, 2000; Inoue et al., 2002; Horowitz et al., 2002; Lee et al., 2002; Oren et al., 2003; Aboul-Soud et al., 2003; Olivain et al., 2005; Sarroco et al., 2007).

A proteína vermelha fluorescente DsRed, por sua vez, foi utilizada pela primeira vez para transformação gênica em fungos filamentosos somente em 2003 por Mikkenlsen e colaboradores que relataram o uso dessa ferramenta para a transformação de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens* e *Penicillium paxilli*. No mesmo ano os autores Nahalkova e Fatehi relataram a utilização da

* <http://www.tsienlab.ucsd.edu>.

DsRed no processo de transformação genética em *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*. (Mikkenlsen et al., 2003; Nahalkova & Fatehi, 2003)

O grande número de trabalhos realizados utilizando essas proteínas fluorescentes, GFP e DsRed ressaltam como vantagens, além das já mencionadas, o fato de que esses marcadores não afetam a morfologia dos fungos (formação de conídios e estruturas de resistência e formação de apressórios, estruturas utilizadas para penetração nos tecidos dos hospedeiros), além de não afetarem a patogenicidade dos isolados transformados. Entretanto, pequenas modificações em relação à taxa de crescimento micelial e pigmentação das colônias dos isolados transformados, comparados aos seus isolados originais não transformados podem ocorrer, o que é compreensível de certa forma, uma vez que tais características podem ser alteradas, com frequência, devido à mudanças de pH do meio de cultura, temperatura, regime de luz e mutações que podem ocorrer naturalmente.

Devido ao fato de que as proteínas GFP e DsRed são produzidas e acumuladas no citoplasma das células de organismos transformados, fornecendo-lhes colorações intensas, sua distinção do meio torna-se indiscutível, possibilitando grandes avanços em estudos citológicos. Sendo assim, estudos na área de fitopatologia e detalhes do processo de infecção, tais como o modo correto de penetração e crescimento do fungo dentro do tecido, a expressão de certos genes em diferentes estádios do processo de infecção, utilizando somente um ou mais fungos transformados, simultaneamente, podem ser facilmente acompanhados usando isolados que expressam GFP e outros que expressam DsRed (Maor et al., 1998; Dumas et al., 1999; Aboul-Soud, 2003).

Em estudos para verificar genes de patogenicidade envolvidos na manifestação de sintomas da fusariose, Inoue et al. (2002) usaram GFP como marcador da expressão do gene *FWOI*, codificador de uma proteína mitocondrial. Nos experimentos foram comparados transformantes normais

expressando GFP e transformantes com deleções na região do gene de patogenicidade. Por meio de testes de patogenicidade e monitoramento da emissão de fluorescência, os autores concluíram que o gene *FWO1* é requerido no processo de colonização de tecidos de plantas por *Fusarium oxysporum*. Em feijão, a proteína GFP foi usada para detectar a expressão de uma endopoligalacturonase de *Colletotrichum lindemuthianum* durante o processo de infecção. A presença de fragmentos de cDNA na análise de ‘Southern blot’ confirmou o acúmulo do gene codificador da endopoligalacturonase durante a patogênese (Dumas et al., 1999). Em outro trabalho, tendo *Fusarium oxysporum* como alvo de estudo, Aboul-Soud et al. (2003) descreveram um método de transformação desse patógeno e obtiveram resultados satisfatórios com os transformantes expressando a proteína GFP. Nesse trabalho utilizou-se o promotor *Pgdp* de *Aspergillus nidulans* ligado ao gene repórter *gfp*, o qual apresentou forte expressão citoplasmática do marcador, sendo observada alta virulência nos transformantes com maior expressão em plântulas de *Arabidopsis* e ativação de genes de defesa.

Eventos iniciais de infecção de plantas de milho por *Fusarium verticillioides* foram caracterizados usando a proteína GFP (Oren et al., 2003). Nesses experimentos, conduzidos com um isolado transformante inoculado em sementes e no solo, observou-se o desenvolvimento do patógeno em diferentes tecidos de plântulas desde as primeiras horas de infecção. Foi constatado nesse trabalho que a ausência de sintomas é caracterizada pela infecção de certos tecidos, pelo crescimento intercelular de um número limitado de hifas e que a reprodução do fungo ocorre em algumas células sem a invasão das adjacentes. Em estudos conduzidos por Lagopodi et al. (2002) com o patossistema *Fusarium oxysporum*, expressando GFP e tomate foi verificado que o contato entre o fungo e o hospedeiro se inicia predominantemente nos pêlos radiculares, ocorrendo grande colonização dos tecidos da parte aérea após esse contato.

A proteína GFP foi testada também em estudo com *Aspergillus flavus* colonizando sementes de milho. Neste trabalho foram comparados cinco genótipos com diferentes graus de resistência em relação a dois transformantes expressando GFP, que foram inoculados artificialmente em sementes (Du et al., 1999). Os genótipos mais susceptíveis apresentaram maior fluorescência, sendo ela visualizada sob luz UV sem necessidade de filtros ou equipamentos especializados. Sendo assim, a expressão de GFP na semente de milho pode ser usada na seleção de genótipos resistentes ao acúmulo de aflatoxina, possibilitando uma seleção mais rápida e mais econômica (Du et al., 1999).

Estudos com mais de um isolado transformado e mais de um gene fluorescente marcador, encontram-se no trabalho conduzido por Olivian et al. (2006), os quais acompanharam a dinâmica de colonização de raízes de tomateiro por isolados não patogênicos transformados com GFP e isolados patogênicos transformados com DsRed de *Fusarium oxysporum*. Neste trabalho o alvo foi elucidar a hipótese de que a competição entre isolados ocorre em relação ao sítio de infecção e não por nutrientes. Entretanto, ao final do estudo os autores concluíram que competição existente entre os isolados era preferencialmente por nutrientes, contradizendo a hipótese sugerida (Olivian et al., 2006).

Um outro exemplo, encontrado na literatura, que diz respeito a uma outra espécie de *Fusarium*, no caso *Fusarium oxysporum* f sp *dianthi*, confirma a aplicação valiosa do uso de marcadores protéicos para monitorar a colonização desse patógeno na raiz de plantas de cravo, sendo usados isolados transformados com os genes marcadores, GFP e DsRed. (Sarrocó et al., 2007). Neste estudo o objetivo foi comparar a eficácia dos dois marcadores mencionados. Devido ao alto nível de fluorescência apresentado pelo tecido vegetal no comprimento de onda para visualização da DsRed, não foi possível visualizar a colonização pelos isolados transformados com proteína vermelha.

Por outro lado, isolados transformados com GFP foram facilmente monitorados nos tecidos analisados, demonstrando que esse patógeno preferencialmente penetra na planta através das raízes pela coifa.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Patologia de Sementes, Virologia Vegetal e de Microscopia Eletrônica do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras-UFLA.

3.1 Isolados de *Fusarium oxysporum* f sp. *vasinfectum* e plasmídeo

Para a transformação genética com os genes marcadores green e red fluorescent protein, dois isolados patogênicos de *Fusarium oxysporum* f sp. *vasinfectum* (CML 1098 e CML 1119) foram fornecidos pelo laboratório de Sistemática e Ecologia de fungos do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras-UFLA.

Os dois plasmídeos - pSC001 e pSC002 (Figura 2) - utilizados no presente trabalho, contendo o gene de resistência ao antibiótico hygromycin B e o gene promotor *pToxA*, originado do fungo *Aspergillus nidulans*, para expressão das proteínas fluorescentes verde e vermelha, foram cedidos pelo pesquisador holandês Dr. Theo van der Lee (Plant Research International, The Netherlands).

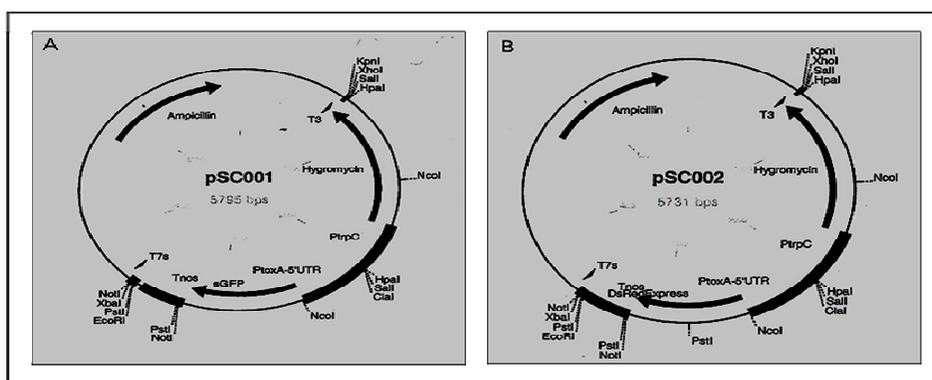


FIGURA 2 Mapa do vetor de transformação pSC001, contendo o gene GFP (A), e do vetor pSC002, contendo o gene DsRed (B).

3.2 Transformação de *Fusarium oxysporum f.sp vasinfectum* (Fov)

A transformação foi realizada seguindo o procedimento utilizado por Maier et al (2005) para transformar *Fusarium graminearum*, com algumas modificações. Para tanto, os isolados CML 1098 e CML 1119 foram cultivados em meio batata dextrose ágar (BDA) durante seis dias à temperatura de 28⁰C e sob regime luminoso de 12 horas de luz / 12 horas de escuro. Com auxílio de uma alça de Drigalsky suspensões de $2,92 \cdot 10^7$ conídeos/mL foram preparadas, sendo 1 mL dessa suspensão adicionada a 50mL de caldo de batata-dextrose em Erlenmeyers (250 mL), posteriormente incubadas em agitador horizontal a 125 rpm, 28⁰C por 16 e 48 horas para obtenção de massas miceliais. As massas miceliais resultantes dos dois isolados foram filtrados e lavadas uma vez, utilizando o estabilizador osmótico NaCl na concentração de 0,7 mM. Posteriormente, para cada 3ml desse estabilizador osmótico adicionou-se 100µg de micélio seco.

Em seguida, com finalidade de provocar a lise da parede celular dos isolados fungicos e promover a liberação dos protoplastos, as soluções osmóticas preparadas (NaCl 0,7M) foram separadas em duas partes, resultando no final em quatro amostras, sendo duas para cada isolado. Na primeira parte foi adicionada às duas soluções osmóticas a enzima Lyzing Enzimes (Sigma-L1412-10G) (10mg/mL de solução osmótica), e nas outras duas soluções osmóticas restantes uma mistura das enzimas, 3% de Glucanase (Sigma- 49103-10MG) e 5% de Driselase (Sigma-D9515-1G), as quais foram posteriormente incubadas a 28⁰C por 3 horas em constante agitação de 75 rpm.

Após as 3 horas de incubação, as respectivas soluções enzimáticas e os protoplastos resultantes foram filtrados em uma camada de gaze, previamente esterilizada, e posteriormente centrifugadas por 5 minutos a 2000rpm e à temperatura de 4⁰C. Em seguida foram ressuspensos uma vez em NaCl (0,7 mM) super gelado (4⁰C) e novamente em tampão de armazenamento, contendo

quatro partes de STC (0,8M Sorbitol, 50mM Tris HCl pH 8,0 e 50mM CaCl₂) e uma parte de SPTC (0,8M Sorbitol, 40% PEG4000, 50mM Tris HCl pH 8,0 e 50mM CaCl₂).

As soluções protoplasmáticas na concentração final de aproximadamente 10⁷ protoplasto/ml, acondicionadas em tubos eppendorf (2,2 ml), foram adicionadas 10μL de DNA plasmidial (0,35-1,66μg/μL) e posteriormente mantidas em gelo por 30 minutos. Na etapa seguinte, adicionou-se a essa nova solução 1 mL de SPTC (40% do PEG4000), deixando-a incubada em temperatura ambiente por mais 20 minutos. Após esse período, essa solução foi vertida em 200 mL de meio de regeneração a 43^oC, previamente autoclavado. O meio de regeneração foi preparado dissolvendo-se 0,1% extrato de levedura (Sigma-Y4250-250G), 0,1% do casienhydrolysate (Sigma-C8845-500MG), 34,2% de sacarose (Sigma-84100-1KG) e 1,0% de ágar granulado (Difco-1016141000-1KG) em 1000mL de água destilada. Em seguida, esse meio contendo os possíveis isolados transformados foi vertido em dez placas Petri (94 milímetros) contendo 20ml do meio. Cada um deles foi seguido de incubação por 72 horas a 28^oC. Decorrido esse tempo, a cada placa foram adicionados 10mL de agar-água contendo hygromycin-B na concentração de 300μg/mL, sendo elas mantidas em câmara do tipo BOD, a 28^oC. por até quinze dias.

3.3 Avaliação das características morfológicas e culturais dos isolados transformados

Após a etapa de transformação, os isolados marcados com GFP e DsRed foram transferidos para o meio BDA para análise morfológica e de algumas características culturais, tais como coloração e crescimento das colônias. Para tanto, seis isolados foram utilizados, sendo dois contendo o gene GFP, dois contendo DsRed e outros dois como testemunhas, ou seja, isolados originais não transformados (CML 1098 e CML 1119). Adicionalmente foi realizado o teste de estabilidade mitótica com os transformantes, repicando as colônias marcadas

com os genes fluorescentes, sucessivamente, em meio BDA, por sete vezes, sendo que a última repicagem em BDA continha o antibiótico Hygromicina B na concentração de 100µg/mL. Tanto para o bioensaio como para o teste de estabilidade mitótica, observações foram realizadas utilizando microscopia de fluorescência (Zeiss Axio Observer Z.1) equipada com os seguintes filtros: 1) GFP, excitação filtro 470 a 490nm e pico de transmissão para excitação em 510 a 560nm e 2) DsRed, excitação filtro 510 a 560nm e pico de transmissão para excitação em 540 a 583nm. As imagens obtidas das avaliações foram editadas utilizando os softwares Axio Vision Release V.4, 7 e o Microsoft Office Picture Manager.

3.4 Detecção dos genes GFP e DsRed utilizando primers específicos

A presença dos genes marcadores GFP e DsRed nos fungos transformados foi confirmada por PCR, utilizando-se primers específicos (Tabela 1) desenhados com base nas seqüências de nucleotídeos de ambos os genes. Os isolados transformados e não transformados (Controles), utilizados na PCR, foram cultivados em caldo de batata (50mL) com dextrose em agitador horizontal a 125rpm a 28°C por seis dias e em seguida passados por filtração em bomba a vácuo.

A extração de DNA total foi realizada pelo método CTAB 2% (Lodhi et al., 1994) a partir do material filtrado de cada um dos isolados estudados. Para cada 100mg de micélio macerado em nitrogênio líquido foram adicionados 10 volumes (1ml) de tampão de extração cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) previamente aquecido a 60°C (2%p/v CTAB; 1,4 M NaCl; 0,2% v/v 2-mercaptoetanol; 20mM EDTA; 100mM Tris-HCl, pH8). Em seguida, o macerado foi aquecido em banho maria por 30 minutos, sendo agitado por inversão a cada 10 minutos. Após a adição de mesmo volume de clorofórmio - álcool isoamílico (24:1) - as amostras foram

centrifugadas a 12.000rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para novos microtubos e adicionados 0,6 volumes de isopropanol gelado (-20°C). Posteriormente foram incubadas à temperatura de -20°C por pelo menos 1 hora e centrifugadas novamente, utilizando-se a mesma rotação de 12.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet resultante foi lavado com etanol 70%, seco a vácuo, ressuspendido em 500µl de tampão TE (1X), e finalmente estocado a -20°C.

Na reação de PCR empregou-se a enzima Go Taq[®] Flexi DNA Polimerase (Promega) em uma reação com volume final de 50uL contendo 25mM Mg Cl₂, 10mM de cada dNTPs, 5 µM dos primers, água ultrapura tratada com DEPC e cerca de 2,5 de DNA. O ciclo de desnaturação inicial utilizado foi de 95°C por 2minutos, seguido por trinta ciclos de 95°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 1 minuto e alongação a 72°C por 1 minuto, com extensão final de 72°C por 5 minutos. O termociclador utilizado foi o PTC-100TM - MJ Research, Inc. Por fim, os produtos obtidos pela reação de amplificação do DNA foram analisados em gel de agarose a 1%, corado com GelRed Nucleic Acid Gel Strain.

TABELA 1 Sequência dos primers usados para identificação dos isolados transformados com os marcadores GFP e DsRed nas reações de PCR realizadas nestes estudos.

Primers	Sequências
GFP Foward	5' ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC 3'
GFP Reward	5' TTA CTTGTACAGCTCGTCCATGCCG 3'
DsRed Foward	5' TACAGGAACAGGTGGTGGCG 3'
DsRed Reward	5' ATGGCCTCCTCCGAGGACG 3'

3.5 Teste de patogenicidade

Além de testes *in vitro* realizados com os isolados transformados, foram feitos testes de patogenicidade para os mesmos, seguindo a metodologia descrita por Nascimento et al. (1995) com algumas modificações. Nesse caso, os isolados foram primeiramente cultivados por seis dias em meio BDA, em câmaras de incubação do tipo BOD a 28°C com fotoperíodo de 12 horas. Ao final desse período, com auxílio de uma alça de Drigalsky, foram preparadas suspensões de inóculo, cuja concentração final estava calibrada em 10^6 conídios/mL. Para a inoculação, 100 sementes de algodão do cultivar Delta Opal foram semeadas em bandejas plásticas com dimensões de 48 x 29 x 10 cm, contendo substrato previamente autoclavado, composto por substrato comercial (Geneplus) e areia, na proporção de 1:1.

A inoculação foi realizada pela técnica de imersão de raízes injuriadas artificialmente na suspensão de conídios dos isolados em teste. Para isso, as plantas com 10 dias de idade foram removidas cuidadosamente das bandejas e seu sistema radicular foi mantido imerso na suspensão de conídios pelo tempo de cinco minutos. Em seguida, as plantas foram transplantadas em vasos (Volume de 500mL) contendo o mesmo substrato mencionado anteriormente, e mantidas em casa de vegetação a 28°C por 30 dias. Para cada isolado testado, foram avaliadas dez plantas em relação à patogenicidade dos transformantes, GFP e DsRed testados. Como controle, dez plantas foram mantidas imersas em água e outros conjuntos de dez plantas foram inoculadas com suspensão de conídios de isolados de *Fov* não transformados, de maneira semelhante ao que foi feito com os isolados transformados. Para a avaliação do índice de doença ou severidade, as plantas foram removidas das bandejas para a realização das observações de sintomas com base em uma escala de notas (Tabela 2). Posteriormente, os dados observados foram submetidos à fórmula de McKinney (1923). Para estimar a incidência da doença foi considerado o percentual de

plantas que apresentavam algum tipo de sintoma em relação às plantas sadias. Para observações de sintomas dos tecidos vasculares as plantas foram arrancadas e cortadas, longitudinalmente, a partir da raiz. Em adição a essas avaliações, as partes das plantas observadas foram plaqueadas em meio ágar-água e, em seguida, observadas em microscópio fluorescente para verificação da expressão dos genes GFP e DsRed nos transformantes, além de observações de tecidos infectados com os mesmos.

TABELA 2 Escala de notas utilizadas no teste de patogenicidade de *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum* em algodoeiro, adaptada de Nascimento et al., 1995.

Nota	Sintomas
0	Ausência de sintomas
1	Presença de escurecimento vascular confinado ao terço inferior da raiz principal; epinastia
2	Sintomas externos iniciais da doença (Clorose e Murcha) e/ou escurecimento vascular atingindo o terço médio da raiz principal
3	Sintomas bem definidos da doença (Clorose, murcha e seca das folhas) e/ou escurecimento vascular atingindo o terço superior da raiz principal
4	Plantas mortas

3.6 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os delineamentos experimentais utilizados no trabalho foram de blocos casualizados (DBC) e inteiramente casualizado (DIC), sendo que as análises de variância foram realizadas com auxílio do programa Sivar (Ferreira, 2000). As médias entre tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott Knott a cinco por cento de probabilidade ($P \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira etapa deste trabalho, voltada para a obtenção de protoplastos, houve uma produção de aproximadamente 8×10^6 protoplastos/mL para ambos isolados utilizados, CML1098 e CML1119. Foi também possível observar que a idade do micélio do fungo em foco exerceu um efeito significativo sobre a frequência dos protoplastos gerados, bem como sobre o tipo de enzima utilizada. A geração de protoplastos foi mais elevada a partir de colônias mais jovens, com 16 horas de cultivo, na presença da enzima “Lyasing enzymes” (Sigma- L1412-10G), em comparação com colônias com 48 horas de idade, na presença de uma mistura enzimática de 5% de Driselase (Sigma-D9515-1G) e 3% de Glucanase (Sigma- 49103-10MG) utilizada neste estudo (Figura. 3 A, B). Resultados semelhantes foram também observados para algumas outras espécies de *Fusarium*, conforme relatos de Vazquez et al. (1996) e Elbouami (2000) em que estudos sobre a influência do tipo e da concentração das enzimas, dos reguladores osmóticos e da idade micelial foram realizados.

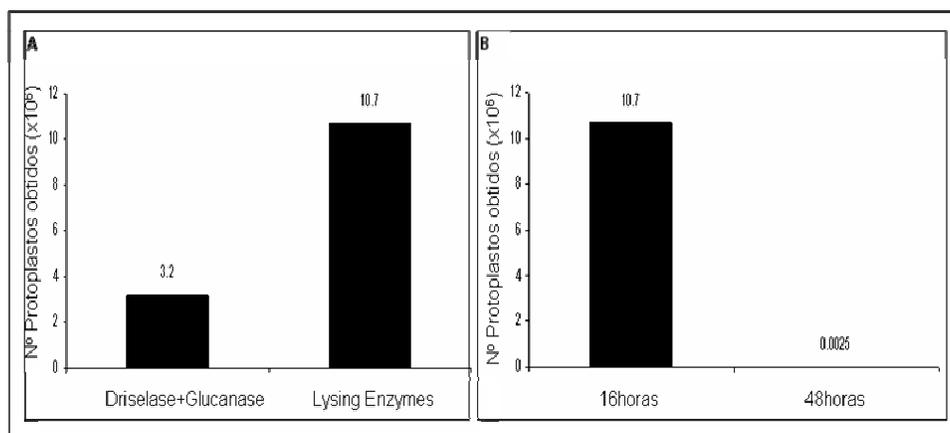


FIGURA 3 Número de protoplastos de *Fusarium oxysporum* f sp. *vasinfectum* gerados pelas enzimas utilizadas neste trabalho (A) e a partir de micélio com 16 e 48 horas de idade (B).

Os protoplastos assim obtidos foram transfetados com sucesso, com os plasmídeos portadores dos genes da GFP e DsRed, pSC001 e pSC002. Assim sendo, o fungo *Fusarium oxysporum* f sp. *vasinfectum*, agente etiológico da fusariose do algodoeiro, foi transformado, com sucesso, com as proteínas verde e vermelha fluorescentes, separadamente. Este é o primeiro relato de transformação desse fungo com genes de proteínas fluorescentes.

Após a otimização do processo de transformação utilizado neste trabalho, foram obtidos 37 transformantes resistentes ao antibiótico hygromycin-B, contendo o gene GFP e 38 com a mesma resistência, contendo o gene DsRed, o que significa 5 transformantes de *Fusarium oxysporum* f sp. *vasinfectum* por μg de DNA plasmidial. Isto evidencia a eficácia satisfatória do processo de transformação realizado com os plasmídeos pSC001(GFP) e pSC002(DsRed), contendo o promotor *PtoxA* originado do fungo *Aspergillus nidulans*.

Fusarium oxysporum é um organismo que tradicionalmente tem sido transformado geneticamente utilizando essa mesma metodologia de obtenção de protoplastos, empregando o polietilenoglicol 4000 (PEG4000). Contudo, quando comparados com outras técnicas de transformação, como a utilização da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* ou ainda o uso do bombardeamento de partículas, a principal desvantagem dessa metodologia é associada à sua baixa eficiência de transformação, normalmente entre 1-5 transformantes por μg de DNA plasmidial, ao fato de ser considerada uma técnica laboriosa (Kistler et al., 1988; Mullins & Kung, 2001; Mourad et al., 2003).

Pela checagem de possíveis efeitos colaterais do processo de transformação dos isolados em estudo, em relação aos isolados originais de *F. oxysporum* f.sp *vasinfectum*, foi possível observar que não houve diferenças fenotípicas nessas comparações nem em relação à estabilidade mitótica. As observações adicionais entre isolados transformados e isolados não transformados mostraram que não houve diferença em relação à forma e ao

tamanho das colônias, havendo, porém, ligeira mudança no crescimento micelial e coloração das colônias (Figura. 4, A). Tais mudanças são também relatadas para outras espécies de *Fusarium*, em resposta à mudança de ambiente, devido às pequenas mutações constantes (Booth 1971; Nelson et al., 1981; Nelson et al., 1983). Quanto à estabilidade mitótica, em média, cinquenta e cinco por cento dos isolados, quando transferidos sucessivamente em meio BDA por sete vezes, sendo a última em BDA contendo antibiótico (100µg hygromycin-B/mL), apresentaram crescimento normal e mantiveram sua fluorescência verde, quando esses foram transformados com GFP e fluorescência vermelha, quando transformados com DsRed (Figura. 4, B).

Em estudos com outras espécies de fungos fitopatogênicos transformados com os genes GFP e DsRed, foi demonstrada também a mesma tendência de comportamento, conforme observado para *F. oxysporum f.sp. vasinfectum* neste estudo. (Lorrang et al., 2001; Visser et al., 2004; Mourad et al., 2003).

Em seu primeiro estudo, realizados com a proteína verde fluorescente como marcador de expressão gênica em células procarióticas e eucarióticas, Chalfie et al., (1994) mencionaram que uma das principais vantagens de se utilizar essa ferramenta é, em grande parte, é que aparentemente, esse marcador molecular não interfere no crescimento celular, nem em outras funções. Nesse sentido, um outro exemplo encontrado na literatura é a publicação de Czymmek et al. (2002) em estudos com proteínas fluorescentes para monitorar o processo de infecção de *Magnaporthe grisea* em plantas de arroz. Esses autores não observaram diferença na formação nem na função de apressórios originados de transformantes que expressam a proteína fluorescente.

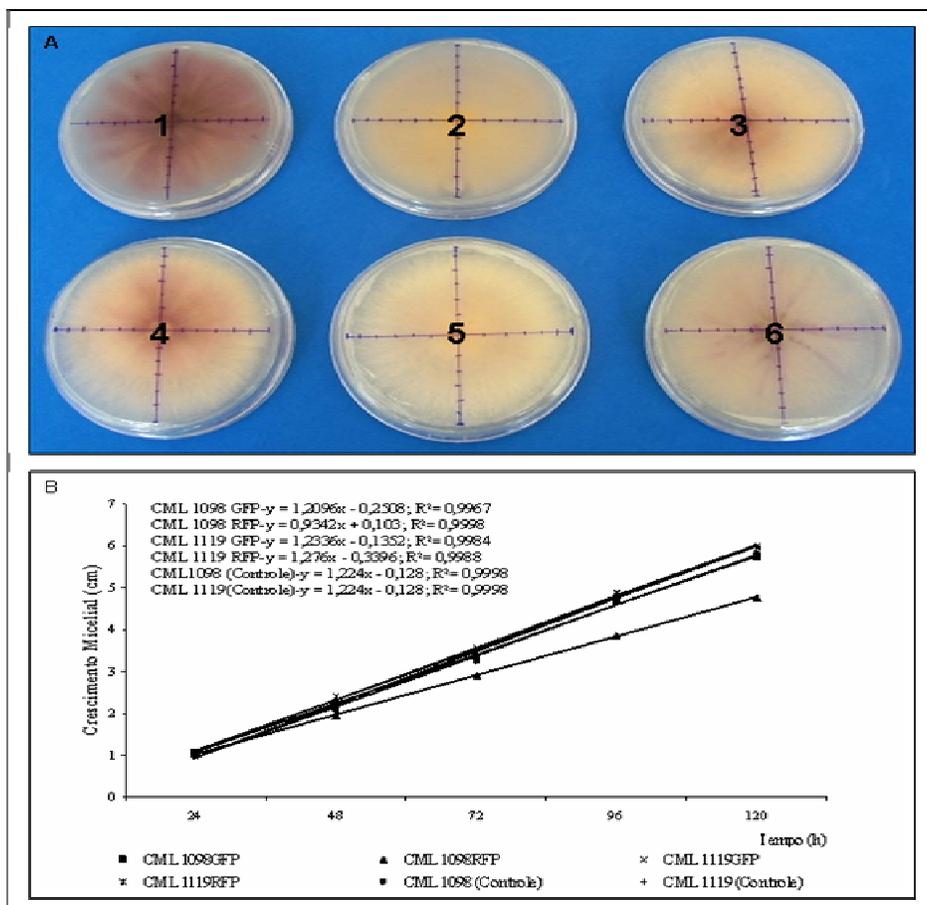


FIGURA 4 Aspectos de coloração (A) e crescimento micelial (B) das colônias dos isolados de *F. oxysporum f.sp. vasinfectum* transformados com os genes GFP e DsRed (A 2, 3, 5, 6) em comparação com os isolados originais (CML 1098 e CML 1119) não transformados (A 1 e 4).

Nas Figuras 5 A, B, observou-se que os isolados transformados com GFP, em análise no microscópio de fluorescência, apresentaram um brilho verde fluorescente intenso em todo citoplasma das hifas do patógeno. Porém, tal fluorescência estava ausente nos núcleos. Atualmente, a GFP tem sido utilizada com sucesso para monitoramento de praticamente a maioria das organelas da célula, nos mais diversos organismos, incluindo membrana citoplasmática,

núcleo, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, vesículas secretoras, mitocôndrias, vacúolos e fagossomos (Tsien, 1998). Além das hifas, em todas as outras estruturas do fungo, tais como estruturas de resistência, clamidósporos bem em macro e microconídios, o mesmo brilho fluorescente pode ser verificado (Figura 5 C, D e E).

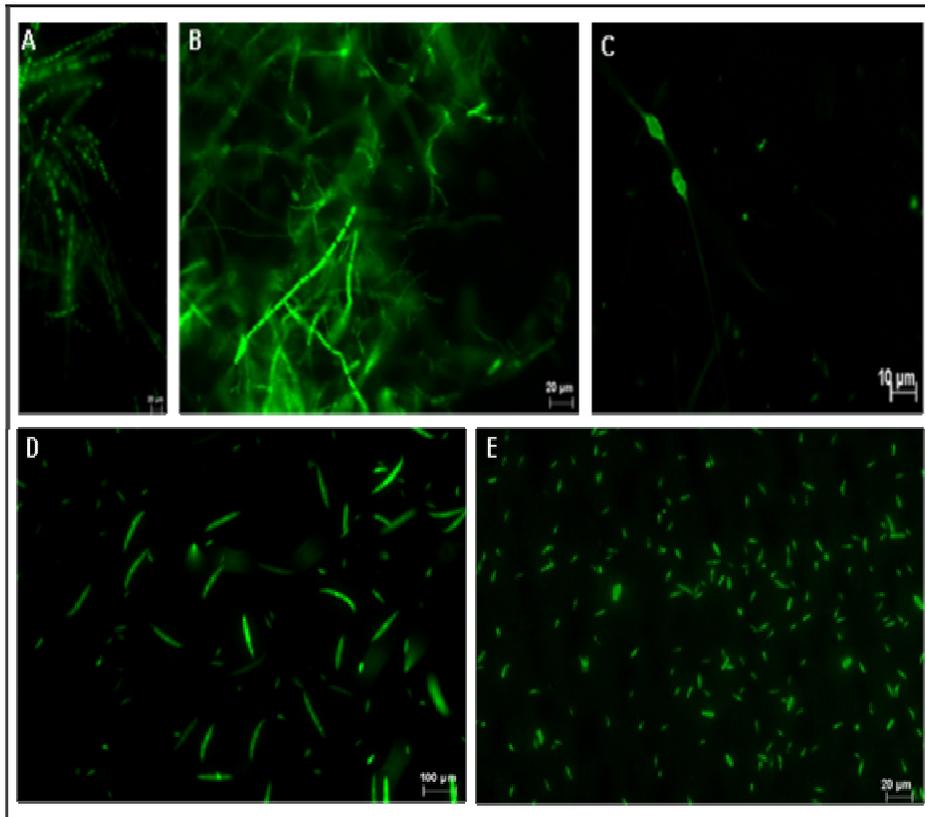


FIGURA 5 Expressão da proteína verde fluorescente, GFP, em *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, observada com auxílio de microscopia de fluorescência. Em hifas, ao longo de todo citoplasma (A e B); em estruturas de resistência, clamidósporos (C) e nos macro e microconídios (D e E).

De maneira semelhante ao que foi observado com o marcador GFP, o marcador DsRed, que apresenta um brilho vermelho fluorescente, demonstrou ser também uma ferramenta das mais valiosas para distinguir os isolados transformados dos isolados não transformados (Figura 6 A, B, C, D).

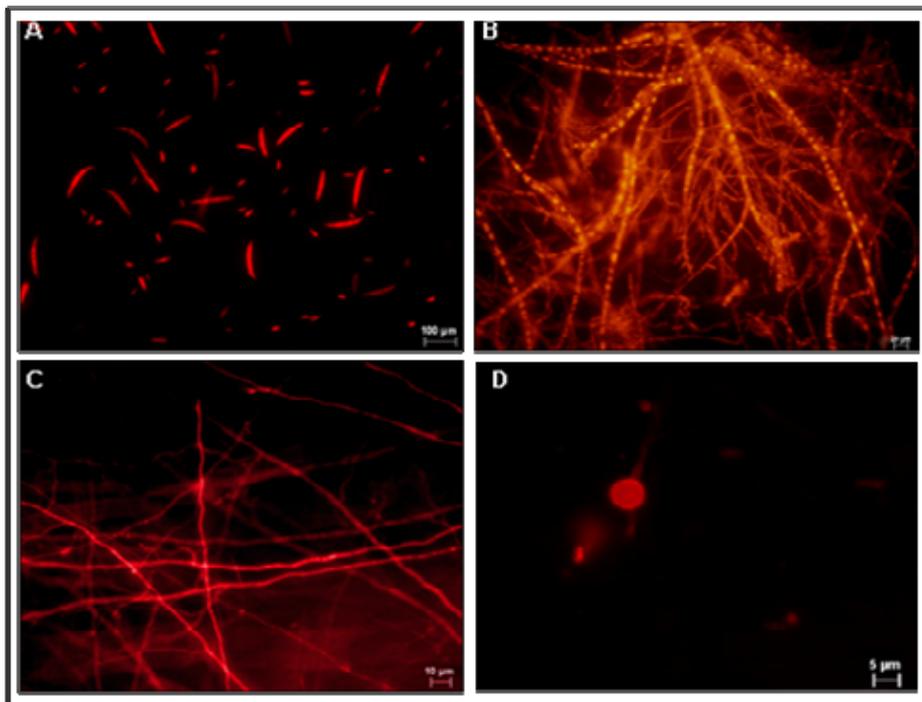


FIGURA 6 Expressão da proteína vermelha fluorescente (DsRed) em estruturas fungicas de *F. oxysporum f.sp vasinfectum*, macro, microconídios (A), hifas (B), diretamente em colônias desenvolvidas em placas (C), e nas estruturas de resistência, clamidósporos (D).

Entretanto, essa fluorescência (tanto verde como a vermelha) na maioria dos transformados foi variável em intensidade entre os isolados utilizados, sendo que em alguns destes a bioluminescência presente foi quase nula, equiparando-se às colônias originais que não continham os genes marcadores GFP e DsRed.

O uso de marcadores protéicos fluorescentes é um campo de estudo que vem sofrendo uma rápida evolução pela pesquisa, sendo um dos alvos a identificação desses compostos com maior estabilidade e consistência. Desta forma, uma série de outras construções, ou seja, outros novos plasmídeos usados para transformação de fungos filamentosos, resultantes de diversas combinações de promotores e novas proteínas fluorescentes, estão atualmente disponíveis no mercado, visando à distinção dos tipos de patógenos bem como a função que estes marcadores exercerão (Cormack, 1998). Lorang et al. (2001), utilizando um único vetor de transformação constitutivo (pCT74), que expressa GFP através do promotor *ToxA* originado do fungo de *P. tritici-repentis*, transformaram com sucesso oito gêneros de fungos fitopatogênicos. As características desse promotor, que conferem versatilidade e alto nível de expressão gênica, ainda não foram elucidadas, porém o vetor pCT74 tem provado ser útil para expressar GFP nos fungos membros do grupo Ascomycota. Estudo semelhante realizado por Nahalkova & Fatehi (2003), a partir do promotor *gpd* advindo do fungo *Aspergillus nidulans*, utilizando o vetor pAN-DsRed2 e pAN-GFP, também expressaram, com êxito, os genes DsRed2 e GFP em *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Confirmando as observações em microscopia de fluorescência, as análises de DNA por PCR, dos fungos transformados e controle, utilizando primer específico para GFP, mostraram a amplificação de uma banda de 720pb, apenas nos fungos transformados (Figura 7 A). O mesmo ocorreu quando isolados transformados com DsRed foram analisados comparativamente com os controle, em que uma banda de 607pb, típica do gene que codifica essa proteína, apareceu apenas nos fungos transformados (Figura 7 B). Dumas et al. (1999) também relataram o uso bem sucedido de primers específicos para confirmar eventos iniciais da infecção por *Colletotrichum lindemuthianum* transformado com a proteína fluorescente GFP em relação a plantas do feijoeiro.

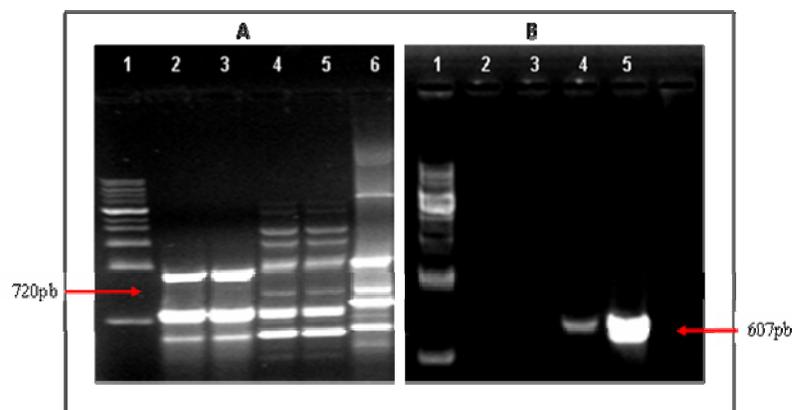


FIGURA 7 Análise eletroforética das bandas originadas pela amplificação do DNA, extraído de colônias de *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum* transformado com GFP e DsRed, utilizando-se os primers específicos estudados. Gel A: 1. Marcador Ladder 1Kb (Amresco); 2. CML 1098 (Controle Negativo); 3 CML 1119 (Controle Negativo); 4. 1098 GFP; 5.1119 GFP; 6 Controle Positivo (Vetor pSC001). Gel B: 1. Marcador Ladder 1Kb (Amresco); 2. CML 1098 (Controle Negativo); 3. CML 1119 (Controle Negativo); 4. 1098 GFP; 5. 1119 GFP.

Por meio de outro teste realizado neste trabalho, para averiguação da capacidade dos isolados transformados de infectar plantas de algodão e a manutenção do nível de virulência, foi observado que todos os isolados de *F. oxysporum* f.sp *vasinfectum* transformados, tanto com GFP como com DsRed mantiveram sua capacidade infectiva ao algodão e ainda a manutenção de seus níveis de virulência quando comparados aos isolados não transformados (Figura 8 A, B). Outros autores também observaram que a capacidade infectiva dos fungos transformados foi mantida e equiparável aos isolados originais não transformados com esses marcadores. (Maor et al., 1998; Van West et al., 1999; Mourad et al., 2003).

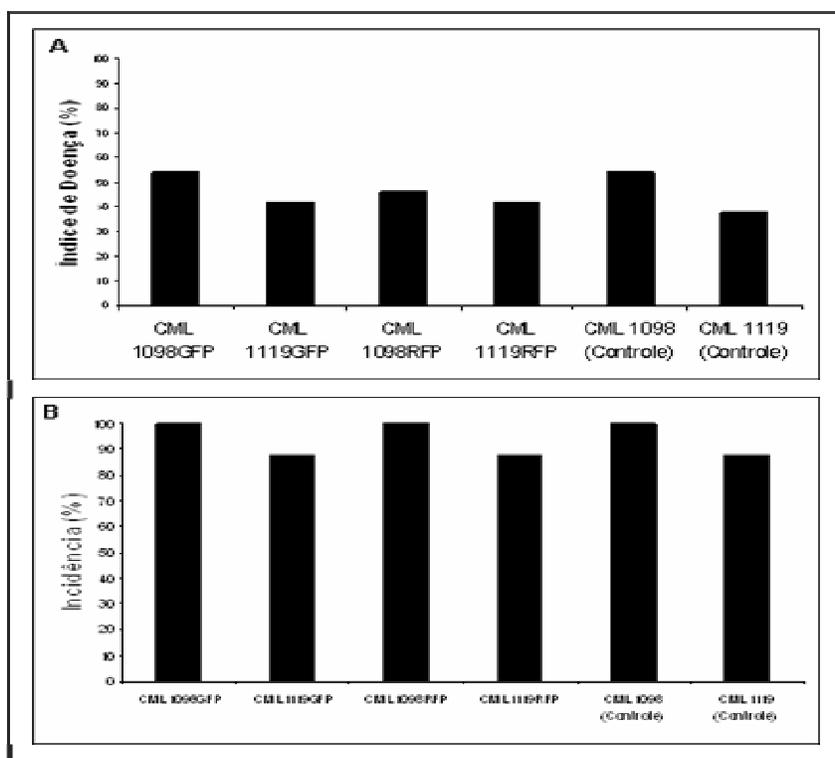


FIGURA 8 Índice de doença (severidade) (A) e incidência (B) de isolados *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* expressando GFP e DsRed em plantas de algodoeiro aos trinta dias após inoculação artificial.

Com base nos sintomas de fusariose avaliados aos trinta dias da inoculação, dois tipos foram observados nas plantas, sendo o primeiro relacionado à parte aérea, caracterizados por amarelecimento e/ou murcha dos cotilédones e folhas e o segundo relacionado a sintomas nos tecidos internos, na região radicular e do colo, próximo à superfície do solo. Em relação aos sintomas aéreos, nenhum dos sintomas típicos esperados, na forma de murcha, foi verificado em plantas inoculadas com os isolados transformados ou nas inoculadas com os isolados originais não transformados (Figura 9 A). Uma possível explicação para esse comportamento seria, talvez, o fato de que os sintomas visuais típicos da fusariose em algodoeiro ocorrem mais comumente

em condições naturais em estádios mais avançados da planta, além dos trinta dias, o que não foi o caso neste trabalho. (Davis et al., 2006).

Por outro lado, sintomas de fusariose nos tecidos internos das plantas inoculadas foram observados com nitidez, tanto para os isolados transformados quanto para os isolados não transformados. Tais sintomas foram caracterizados por uma coloração avermelhada da região vascular das plantas, que variou entre o mais escuro e mais claro, dependendo do nível de infecção (Figura 9 C). Por sua vez, nenhum sintoma da doença foi observado em plantas não inoculadas com o patógeno em foco (Figura 9 B).

Pelos testes convencionais de isolamento em laboratório, sob assepsia, tanto o isolado CML 1098 transformado com o gene GFP como com o gene DsRed, como também os isolados não transformados, puderam ser re-isolados daqueles tecidos avaliados em uma proporção de 100%. O mesmo observou-se para o isolado CML 1119, transformado e não transformado com os marcadores, porém em uma proporção de 87%. Posteriormente, essas colônias foram checadas em relação à presença de fluorescência e somente os isolados transformados apresentaram tal característica (Figura. 9 E, F).

Com base no exame dos sintomas visuais, originados de plantas inoculadas, além dos re-isolamentos convencionais, observações preliminares de cortes de tecidos da região radicular em microscópio de fluorescência deixaram claro também a presença do fungo nestes locais. (Figura 10 C).

Por meio deste mesmo procedimento, Oren et al. (2003) demonstraram a ação inicial de *Fusarium verticillioides*, transformado com o marcador GFP, em interação com plantas de milho, que é uma espécie hospedeira deste fungo. Através desses marcadores Sorrocco et al. (2007) acompanharam também a colonização radicular de plantas de cravo por isolados de *Fusarium. oxysporum* f.sp. *dianthi* transformados com os genes GFP e DsRed.

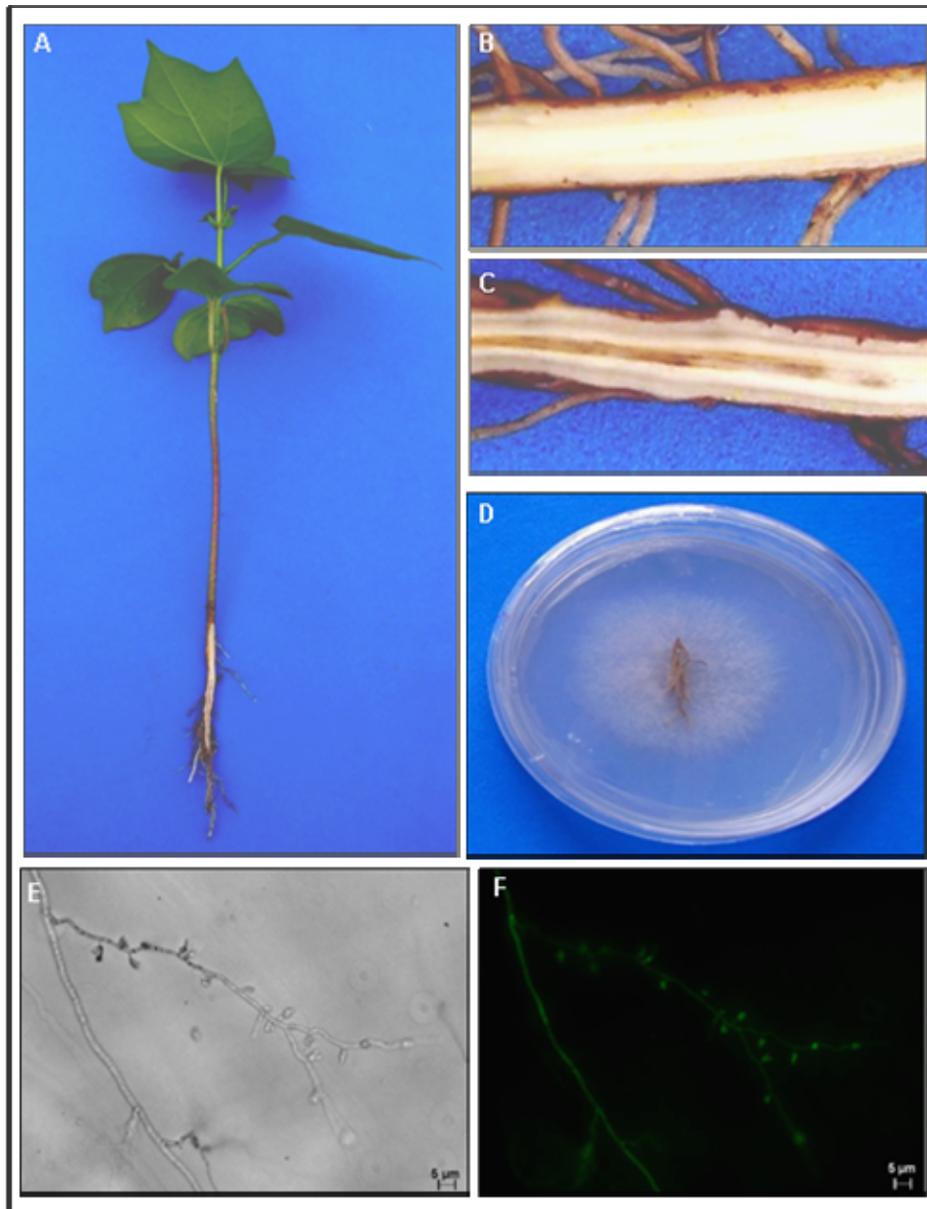


FIGURA 9 Plantas de algodoeiro assintomáticas (A e C) e com sintomas da fusariose em tecidos vasculares (B). Colônia de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, transformado com GFP, isolada de tecidos de plantas com sintomas da doença (D) e estruturas do patógeno examinadas no microscópio de fluorescência (E e F).

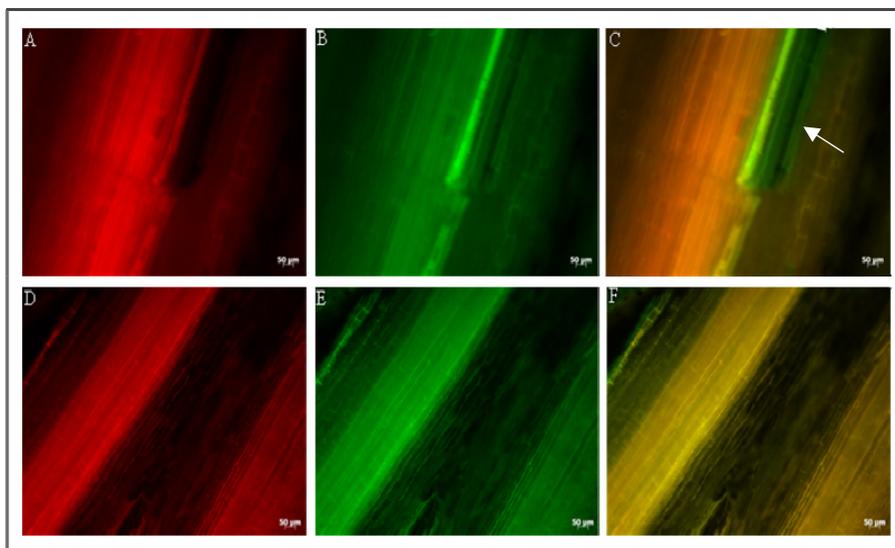


FIGURA 10 Presença de *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum*, transformado com GFP, em tecidos de plantas jovens de algodoeiro, inoculadas artificialmente e observadas por microscopia de fluorescência, com utilização de filtro DAPI (A), filtro GFP (B) e sobreposição das duas imagens, evidenciando a colonização do fungo transformado nos tecidos analisados (C). Figuras D, E e F referem-se a luminescência natural dos tecidos analisados em plantas não inoculadas.

Mediante esses resultados, fica evidenciado o enorme potencial de uso dos marcadores protéicos, tipo GFP e DsRed testados neste trabalho, lembrando que os mesmos poderão ser de grande utilidade em estudos de patologia de sementes, em que a interação do patógeno com os seus hospedeiros, já na fase inicial de infecção das sementes, poderá ser melhor acompanhada e compreendida proporcionando, assim, informações das mais valiosas para o estabelecimento de estratégias de controle e manejo deste tipo de doença de forma preventiva. Atualmente, há uma grande dificuldade de se estabelecer taxas de transmissão de patógenos por sementes, principalmente em casos que os sintomas da doença não são claros nas etapas iniciais dos cultivos em condições de campo. Por meio dessa ferramenta, será possível acompanhar a trajetória de

fungos como *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* a partir de sementes, independente da formação ou não de sintomas das doenças em estudo. Segundo Machado (2009)*, essa ferramenta será também de grande utilidade em estudos de tratamento de sementes, seja pelos métodos químicos, biológicos e físicos, seja por outros tipos de aplicações.

* Comunicação pessoal. José da Cruz Machado (2009)

5 CONCLUSÕES

- ✓ O promotor *pToxA*, presente nos dois vetores utilizados (pSC001 e pSC002), permitiu expressar com êxito os genes marcadores GFP e DsRed no processo de transformação genética em isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum*.
- ✓ A expressão dos genes GFP e DsRed em isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum* não provocou nenhuma alteração nas características morfológicas analisadas nem na natureza patogênica dos mesmos em comparação com o isolados originais não transformados.
- ✓ Pelo protocolo de transformação utilizado, a estabilidade mitótica dos isolados transformados com GFP foi de 60% e com os isolados transformados com DsRed foi de 50%. Por sua vez, a eficiência de transformação dos isolados foi de 3 e 7 transformantes por micrograma de DNA plasmidial, utilizando as proteínas fluorescentes GFP e DsRed, respectivamente.
- ✓ O uso de marcadores fluorescentes, tipo GFP e DsRed, nos isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum* configura-se como uma importante ferramenta que será de grande utilidade para inúmeros tipos de em estudos focando a interação desse patógeno com o algodoeiro.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABOUL-SOUD, M.A.M.; UN, B.W.; HARRIER, L.A.; LOAKE, G.J. Transformation of *Fusarium oxysporum* by particle bombardment and characterisation of the resulting transformants expressing a GFP transgene. **Mycopatologia**, Edinburg, v.158, n.4, p.475-482, Dec. 2004.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 4th ed. San Diego: Academic, 1997. 635 p.
- ARMSTRONG, G.; ARMSTRONG, J.K. Nonsusceptible hosts as carries of wilt Fusaria. **Phytopathology**, St. Paul, v.38, p.808-826, 1948.
- AUSTIN, B.; HALL, R. M.; TYLER, B. M. Optimized vectors and selection for transformation of *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans* to bleomycin and phleomycin resistance. **Gene**, Amsterdam, v. 93, n.1, p. 157-162, Sept. 1990.
- BAE, Y.S.; KNUDSON, G.R. Cotransformation of *Trichoderma harzianum* with beta-glucuronidase and green fluorescent protein genes provides a useful tool for monitoring fungal growth and activity in natural soils. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.2, p.810, Feb. 2000.
- BOOTH, C. **The genus fusarium**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 237p
- BOROVINSKAYA, M. A.; SHOJI, S.; KURT, F.; CATE, J.H. D. Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. **RNA**, New York, v.14, n.8, p.1590-1599, 2008.
- CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W.W.; PRASHER, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, Washington, v.263, n.5148, p.802-80, 1994.
- CORMACK, B. Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.1, n.4, p.406-410, Aug. 1998.
- CUBITT, A.B.; HEIM, R.; ADAMS, S.R.; BOYD, A.E.; GROSS, L.A.; TSIEN, R.Y. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. **Trends in Biochemical Science**, Oxford, v.20, n.11, p.448-455, Nov. 1995.

CZYMMEK, K.J.; BOURETT, T.M.; DEZWAAN, T.M.; SWEIGARD, J.A.; HOWARD, R.J. Utility of cytoplasmic fluorescent proteins for live-cell imaging of *Magnaporthe grisea* in planta. **Mycologia**, New York, v.94, n.2, p.280-289, Mar./Apr. 2002.

DAVIS, R.M.; COLYER, P.D.; ROTHROCK, C.S.; KOCHMAN, J.K. Fusarium Wilt of Cotton: Population Diversity and Implications for Management. **Plant Disease**, St. Paul, v.90, n.6, p.692-703, June 2006.

DI PIETRO, A.; GARCÍA-MACEIRA, F.I.; MÉGLECZ, E.; RONCERO, M.I.G. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.39, n.5, p.1140-1152, Mar. 2001.

DI PIETRO, A.; MADRID, M.P.; CARACUEL, Z.; DELGADO-JARANA, J.; RONCERO, M.I.G. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v.4, n.5, p.315-325, Sept. 2003.

DU, W.; HUANG, Z.; FLAHERTY, J.E.; WELLS, K.; PAYNE, G.A. Green fluorescent protein as a reporter to monitor gene expression and food colonization by *Aspergillus flavus*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.3, p.834-836, Mar. 1999

DUMAS, B.; CENTIS, S.; SARRAZIN, N.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T. Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.4, p.1769-1771, Apr. 1999.

ELBOUAMI, F. Isolation and regeneration of protoplasts from mycelium of *Fusarium solani*. **African Crop Science Journal**, Toronto, v.9, n.2, p.351-358, 2000.

FERNÁNDEZ-ÁBALOS, J.M.; FOX, H.; PITT, C.; WELLS, B.; DOONAN, J.H. Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.27, n.1, p.121-130, Jan. 1998.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.

GRITZ, L.; DAVIES, J. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, Amsterdam, v.25, n.2-3, p.179-188, 1983.

HEIN, R.; TSIEN, R.Y. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelength and fluorescence resonance energy transfer. **Current Biology**, London, v.3, n.2, p.178-182, Feb. 1996.

HOROWITZ, S.; FREEMAN, S.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein-transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.92, n.7, p.743-749, July 2002.

INOUE, I.; NAMIKI, F.; TSUGE, T. Plant colonization by the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* requires FOW1, a gene encoding a mitochondrial protein. **The Plant Cell**, Rockville, v.14, n.8, p.1869-1883, Aug. 2002.

KARLSSON, C.; PINES, J. Green Fluorescent Protein. In: CELIS, J. (Ed.). **Cell biology: a laboratory handbook** (Ed.). 2nd d. San Diego: Academic, 1998. v. 4, p. 246-252.

KISTLER H.C.; BENNY, U.K. Genetic transformation of the fungal plant wilt pathogen, *Fusarium oxysporum*. **Current Genetics**, New York, v.13, p.145-149, Feb. 1988.

KRAFT, J.M.; BURK, D.W.; HAGLUND, W.A. *Fusarium* diseases of beans, peas, and lentils. In: NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; COOK, R.J. **Fusarium: disease, biology, and taxonomy**. Pennsylvania: Pennsylvania State University, 1981. p. 142-156.

LAGOPODI, A.L.; RAM, A.F.J.; LAMERS, G.E.M.; PUNT, P.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J.; LUGTENBERG, B.J.J.; BLOEMBERG, G.V. Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.15, n.2, p.172-179, Feb. 2002.

LEE, S.; KIM, S.H.; BREUIL, C. The use green fluorescent protein as a biomarker for sapstain fungi. **Forest Pathology**, Berlin, v.32, n.3, p.153-161, July 2002.

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**, Washington, v.181, n.11, p.3571-3577, June 1999.

LODHI, M.A.; YE, G.-N.; WEEDEN, N.F.; REISCH, B.I. A simple and efficient method for DNA extractions from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, Adelaide, v.12, n.1, p. 6-13, 1994.

LORANG, J.M.; TOURI, R.P.; MARTINEZ, J.P.; SAWYER, T.L.; REDMAN R.S.; ROLLINS, J.A.; WOLPERT, T.J.; JOHNSON, K.B.; RODRIGUEZ, R.J.; DICKMAN, M.B.; CIUFFETTI, L.M. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.5, p.1987-1994, May 2001.

MAIER, F.J.; MALZ, S.; LOSH, A.P.; LACOUR, T.; SCHAFER, W. Development of a highly efficient gene targeting system for *Fusarium graminearum* using the Disruption of a polyketide synthase gene as a visible marker. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.5, n.6-7, p.653-662, Apr. 2005.

MAOR, R.; PUYESKY, B.A.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. **Mycological Research**, New York, v.102, n.4, p.491-496, Apr. 1998.

MARTIN, W.J.; NEWSOM, L.D.; JONES, J.E. Relationship of nematodes to the development of *Fusarium* wilt in cotton. **Phytopathology**, St. Paul, v.46, n.5, p.285-289, May 1956.

McKINNEY, R.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Cambridge, v.26, p.195-218, 1923.

MICHELL, R.E.; POWELL, W.M. Influence of *Pratylenchus brachyurus* on the incidence of *Fusarium* wilt in cotton. **Phytopathology**, St. Paul, v.62, n.3, p.336-338, Mar. 1972.

MÖLLER, E.M.; BAHNWEIG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H.H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruitbodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.22, n.22, p.6115-6116, Nov. 1992.

MULLINS, E.D.; KANG, S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v.58, n.14, p.2043-2052, Dec. 2001.

NAHALKOVA, J.; FATEHI, J. Red fluorescent protein (DsRed2) as a novel reporter in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.225, n.2, p.305–309, Aug. 2003.

NASCIMENTO, S.R.C.; KUROZAWA, O. C.; MARINGONI, O. C. Avaliação de raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f sp phaseoli. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, n.2 p.214-217, abr./jun. 1995.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; COOK, R.F. **Fusarium**: disease, biology and taxonomy. Pennsylvania: Pennsylvania State University, 1981.p. 29-38.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. **Fusarium species**: an illustrated manual for identification. Pennsylvania: Pennsylvania States University, 1983. 193p.

NONOMURA, T.; MATSUDA, Y.; TAKASUGI, M.; OOTANI, T.; HASEGAWA, T.; MYAJIMA, K.; HATASA, T.; TOYODA, H. A monitoring system for green fluorescent protein gene-transformed *Fusarium oxysporum* in melon seedlings. **Journal General Plant Pathology**, Oxford, v.67, p.273–280, 2001.

OLIVAIN, C.; HUMBERT, C.; NAHALKOVA, J.; FATEHI, J.; HARIDON, F. L.; ALABOUVETE, C. Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.72, n.2, p.1523-1531, Feb. 2006

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 Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n.3, p.1695-1701, Mar. 2003.

- PEBERDY, J. F. Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. **Annual Reviews of Microbiology**, Palo Alto, v.33, p.21-39, 1979.
- PRASHER, D.C. Primary structure of *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. **Gene**, Amsterdam, v.111, n.2, p.229-233, Feb. 1992.
- RAO, R.N.; ALLEN, N.E.; HOBBS, J.N.; ALBORN, W.E.; KIRST, H.A.; PASCHAL, J.W. "Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in *Escherichia coli*". **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.24, n.5; p.689-695, 1983.
- RUIZ-DÍEZ, B. A review: strategies for the transformation of filamentous fungi. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, n.2, p.189-195, 2002.
- SARROCO, S.; FALASCHI, N.; VERGARA, M.; NICOLETTI, F.; VANNACCI, G. Use of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* transformed with marker genes to follow colonization of carnation roots. **Journal Plant Pathology**, Pisa, v.89, n.1, p.61-68, Mar. 2007.
- SCHAWARTZ, J.L.; PATTERSON, G.H. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. **Science**, v.300, n.5616, p.87-91, Apr. 2003
- SHI, J.; MUELLER, W.C.; BECKMAN, C.H. Vessel occlusion and secretory activities of vessel contact cells in resistant or susceptible cotton plants infected with *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.40, p.133-147, Feb. 1992.
- SHIMOMURA, O. The discovery of aquorin and green fluorescent protein. **Journal of Microscopy**, Oxford, v.217, n.1, p.3-15, Jan. 2005.
- SMITH, S. N.; EBBELS, D.L.; GARGER, R.H.; KAPPELMAN, A.J. *Fusarium* wilt of cotton. Pages 29-38 In: NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; COOK, R.J. (Ed.). **Fusarium: diseases, biology, and taxonomy**. Pennsylvania: Pennsylvania State University, 1981.p.28-38.
- SPELLIG, T.; BOTTIN, A.; KAHMANN, R. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. **Molecular General Genetics**, New York, v.252, n.5, p.503-509, Oct. 1996.
- SUELMANN, R.; SIEVERS, D.; FISCHER, R. Nuclear traffic in fungal hyphae: in vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.25, n.4, p.757-769, Aug. 1997.

TSIEN, R.Y. The green fluorescent protein. **Annual Review Biochemistry**, Oxford, v.67, n.4, p.509–544, Aug. 1998.

VALQUEZ, F.; FIGUEROA, L.I.C. Protoplast formation in *Fusarium* species. **Biotechnology techniques**, London, v.10, n.2, p. 93-98, 1996.

VISSER, M.; GORDON, T.R.; WINGFIELD, B.D. Transformation of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, casual agent of Fusarium wilt of banana, with green fluorescent protein (GFP) gene. **Australian Plant Pathology**, Victoria, v.33, n.1, p.69-75, 2004.

ZIMMER, M. **Glowing genes: a revolution in Biotechnology**. New York: Prometheus Books, 2005. 221p.

WEST, P. van; REID, B.; CAMPBELL, T.A.; SANDROCK, R.W.; FRY, W.E.; KAMOUN, S.; GOW, N.A.R. Green fluorescent protein (GFP) as a reporter gene for the plant pathogenic oomycete *Phytophthora palmivora*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.178, n.1, p.71-80, Sept. 1999.

WOOD, D.W.; SETUBAL, J.C.; KAUL, R.; MONKS, D.E.; KITAJIMA, J.P.; OKURA, V.K.; ZHOU, Y.; CHEN, L.; WOOD, G.E.; ALMEIDA JUNIOR, N.F.; WOO, L.; CHEN, Y.; PAULSEN, I.T.; EISEN, J.A.; KARP, P.D.; BOVEE, D.S.R.; CHAPMAN, P.; CLENDENNING, J.; DEATHERAGE, G.; GILLET, W.; GRANT, C.; KUTYAVIN, T.; LEVY, R.; LI, M.J.; MCCLELLAND, E.; PALMIERI, A.; RAYMOND, C.; ROUSE, G.; SAENPHIMMACHAK, C.; WU, Z.; ROMERO, P.; GORDON, D.; ZHANG, S.; YOO, H.; TAO, Y.; BIDDLE, P.; JUNG, M.; KRESPAN, W.; PERRY, M.; GORDON-KAMM, B.; LIAO, L.; KIM, S.; HENDRICK, C.; ZHAO, Z.Y.; DOLAN, M.; CHUMLEY, F.; TINGEY, S.V.; TOMB, J.F.; GORDON, M.P.; OLSON, M.V.; NESTER, E.W. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science**, Washington, v.294, n.5550, p. 2317-2323, Dec. 2001.