

**TRANSFORMAÇÃO DE *Stenocarpella maydis*
COM OS GENES MARCADORES GFP E
DsRED E PATOGENICIDADE DOS
TRANSFORMADOS EM SEMENTES DE
MILHO**

CAROLINA DA SILVA SIQUEIRA

2009

CAROLINA DA SILVA SIQUEIRA

**TRANSFORMAÇÃO DE *Stenocarpella maydis* COM OS GENES
MARCADORES GFP E DsRED E PATOGENICIDADE DOS
TRANSFORMADOS EM SEMENTES DE MILHO**

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

Orientador
Prof. Dr. José da Cruz Machado

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

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

Siqueira, Carolina da Silva.

Transformação de *Stenocarpella maydis* com os genes marcadores GFP e DsRed e patogenicidade dos transformados em sementes de milho / Carolina da Silva Siqueira. – Lavras : UFLA, 2009.

53 p. : il.

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

Orientador: José da Cruz Machado.

Bibliografia.

1. Milho. 2. *Stenocarpella maydis*. 3. Transformação genética. 4. Protoplastos. 5. GFP. 6. DsRed. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.1594

CAROLINA DA SILVA SIQUEIRA

**TRANSFORMAÇÃO DE *Stenocarpella maydis* COM OS GENES
MARCADORES GFP E D_sRED E PATOGENICIDADE DOS
TRANSFORMADOS EM SEMENTES DE MILHO**

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

APROVADA em 29 de julho 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

Com eterna gratidão e amor, a minha mãe, Ivone e minha irmã, Janaina, que sempre me apoiaram, ajudaram e incentivaram. Aos meus amados tias e tios. Aos meus companheiros primos. A minha guerreira avó Maria.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Fitopatologia, ao Laboratório de Virologia Vegetal e ao Laboratório de Patologia de Sementes, pela oportunidade da realização deste trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. José da Cruz Machado, pelos valiosos ensinamentos, amizade e atenção que sempre me dedicou em todo o mestrado.

À professora Dra. Antonia dos Reis Figueira, pelos ensinamentos e colaboração neste trabalho.

Ao professor Dr. Renato Mendes Guimarães, pela participação na banca examinadora.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Sementes e do laboratório de Virologia Vegetal, Carlinha, Vivi, Jajá, Ellen, Luiza, Ângela, Biotita, Elenice, Neto, Pepe, Cláudio, Gustavo, Luiz, Tião, Ivan, Chicão, Adriano, Priscila, João, Suellen, Carlos, Romário e Douglas, que ajudaram com tanta disposição para a realização deste trabalho e pela amizade. Em especial, aos amigos Luana e Rodrigo, pela amizade, presença e ajuda constantes em todas as etapas deste trabalho. Às amigas Mirella e Flavinha, sempre tão dispostas a ajudar e pelo carinho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Isolados de <i>Stenocarpella maydis</i> e determinação do perfil de sementes de milho	13
3.2 Avaliação do crescimento e aspectos morfológicos de <i>Stenocarpella maydis</i> na presença de higromicina-B, em diferentes concentrações, em meio de cultura agarizado	14
3.3 Multiplicação do plasmídeo	14
3.4 Obtenção de protoplastos de <i>Stenocarpella maydis</i>	16
3.5 Obtenção dos isolados de <i>Stenocarpella maydis</i> transformados	17
3.6 Avaliação das características morfológicas e culturais dos isolados transformados	18
3.7 Confirmação dos genes GFP e DsRed utilizando <i>primers</i> específicos	20
3.8 Inoculação de sementes	22
3.8.1 Teste de germinação	23
3.8.2 Teste de condutividade elétrica	23
3.9 Delineamento experimental e análises estatísticas	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5 CONCLUSÕES	45
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

RESUMO

SIQUEIRA, Carolina da Silva. **Transformação de *Stenocarpella maydis* com os genes marcadores GFP e DsRed e patogenicidade dos transformados em sementes de milho.** 2009. 53p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

Entre os principais fungos que se associam às sementes de milho encontra-se *Stenocarpella maydis*, agente causal de podridões do colmo e de espiga que acarreta perdas consideráveis em regiões produtoras desta cultura no Brasil. Na literatura, poucas são as informações sobre os mecanismos de infecção e da dinâmica de transmissibilidade deste fungo via sementes deste hospedeiro. Para estes tipos de estudos, uma ferramenta importante tem sido o uso de microrganismos transformados por meio de marcadores moleculares, como GFP e DsRed. Dessa forma, com a realização deste trabalho, os objetivos foram transformar o referido fungo e avaliar o seu comportamento em associação com sementes de milho. Para a transformação do fungo, o protocolo utilizado permitiu obter protoplastos íntegros e em concentração necessária. O plasmídeo utilizado foi multiplicado satisfatoriamente e a concentração do antibiótico utilizado foi aferida. O protocolo de transformação foi adaptado em alguns aspectos, revelando ser eficaz, com base em observações da fluorescência em microscópio de epifluorescência. O fungo manteve suas características morfológicas, quando comparado aos isolados originais, sem transformação, e sua infectividade em sementes de milho também não foi alterada. Pela técnica de PCR foi confirmada a presença dos genes nos isolados transformados. A inoculação de sementes com os transformantes não só confirmou a patogenicidade destes, como possibilitou a observação da colonização nas sementes.

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

ABSTRACT

SIQUEIRA, Carolina da Silva. **Transformation of *Stenocarpella maydis* with genes markers GFP and DsRed and pathogenicity of transformed into maize seeds.** 2009. 53p. Dissertation (Master Science Program in Plant Pathology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*.

One of the fungi which can associate to maize seeds is *Stenocarpella maydis*, causal agent of stalk and ear rot, which is responsible by considerable losses in producing regions of this crop in Brazil. From literature, there is little information on the mechanisms of infection and on the transmission dynamics of this fungus in relation to maize seeds. For this sort of investigation the transformation of the fungus by mean of molecular markers such as GFP and DsRed has been an important tool. So, this work was carried out aiming the transformation of the fungus and assessing its behavior in maize seeds. For transformation, the protocol used provided a reasonable number of protoplasts, reaching a satisfactory concentration for the purpose of this study. The plasmid was successfully multiplied and the concentration of the antibiotic was adequate, as it is recommended for other cases. The protocol was therefore adjusted and proved to be efficacy as demonstrated by the fluorescence in the fluorescence microscope. The transformed isolates maintained their morphological characteristics when compared to the original isolates, and their infectivity in maize seeds was confirmed. By the PCR technique, it was possible to confirm the presence of genes in the transformed isolates. From the inoculation of seeds it was possible to confirm the pathogenicity of the transformed isolates as well as it was possible to observe their colonization in the infected seeds.

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

1 INTRODUÇÃO

Culturas de grande importância econômica, como o milho, atingem altas produções por meio da otimização dos fatores de produção, como fertilidade do solo, disponibilidade hídrica, controle da erosão, população de plantas, manejo de doenças e pragas, época de semeadura, cultivar e rotação de culturas, dentre outras (Reis et al., 2004).

As podridões causadas por *Stenocarpella maydis* acarretam grandes perdas nas produções de grãos e sementes, em condições brasileiras. Além disso, sementes constituem um excelente meio pelo qual os fitopatógenos são introduzidos em novas áreas e são responsáveis pela disseminação desses agentes a longas distâncias. Os mecanismos de transmissão do fungo, da semente à planta, ainda são pouco esclarecidos pela pesquisa, havendo poucas informações sobre este aspecto na literatura. Dessa maneira, torna-se importante o estudo desses mecanismos de infecção e da dinâmica da transmissibilidade de *S. maydis* a partir de sementes de milho. Para estes estudos, torna-se pertinente a utilização de métodos mais adequados e precisos, como é o caso de marcadores moleculares.

Vários marcadores genéticos são utilizados na atualidade, em biotecnologia, mas muitos empregam técnicas onerosas e que podem ocasionar modificações indesejadas nos organismos em estudo. Entretanto, os marcadores moleculares GFP (*green fluorescent protein*) e DsRed (*red fluorescent protein*), que codificam as proteínas fluorescentes verde e

vermelha, respectivamente, aparecem como excelente opção para estudos sobre a interação de agentes patogênicos. Estes marcadores apresentam inúmeras vantagens, como a não descaracterização do isolado transformado em relação ao seu isolado selvagem ou original.

Atualmente, na literatura, são encontrados relatos sobre a transformação de diversos fungos, havendo para cada espécie ajustes nos protocolos utilizados. Os resultados destes estudos indicam também grande variação sobre a intensidade da fluorescência emitida pelos organismos transformados, por observações em microscópios apropriados. Por meio desta tecnologia, tem sido possível esclarecer os processos de infecção e colonização dos agentes patogênicos em tecidos de espécies hospedeiras, com vantagens pela observação *in vivo* (Tsien, 1998; Lorang et al., 2001).

Além disso, fica evidente que tal ferramenta configura-se como das mais viáveis para estudos que envolvem a interação de patógenos com sementes, principalmente na elucidação da patogenicidade e da transmissibilidade desses agentes por esta via.

A partir disso, o que se propôs com a realização deste trabalho foi adequar um protocolo de transformação que emprega genes marcadores tipo GFP e DsRed, com vistas à sua aplicação para a espécie *Stenocarpella maydis* e, por meio desta transformação, estudar alguns eventos da relação que existe entre este patógeno e o milho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A produção de sementes de milho (*Zea mays* L.) é uma das atividades de maior peso na agricultura brasileira, sendo ela muito expressiva, em âmbito mundial, acarretando constante esforço para a superação de fatores que limitam o aumento da produção, como é o caso das doenças.

Entre as doenças do milho cuja ocorrência vem aumentando em várias regiões do Brasil estão as podridões de espiga e do colmo, causadas pelo complexo *Stenocarpella*, antes mais comum na região sul do país e em algumas áreas do centro-oeste (Casela et al., 2006).

O chamado “complexo *Stenocarpella*” é constituído pelos fungos *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*, que se diferenciam morfológicamente. Essa diferenciação se baseia, principalmente, no tamanho dos conídios, sendo os de *S. maydis* de duas a três vezes menores do que os conídios de *S. macrospora* (44-82 x 7,5-11,5 µm, com 1 a 3 septos) (Sutton, 1980). Mario & Reis (2001) apontam que estas duas espécies também podem ser diferenciadas por meio da coloração de suas colônias, embora esta distinção não tenha sido consistente em alguns casos. Com base em relatos encontrados na literatura, observa-se um maior número de informações sobre *S. maydis*, provavelmente pela sua maior incidência em testes de sanidade de sementes e grãos e também pela maior constatação em lavouras de milho (Denti & Reis, 2003).

Taxonomicamente, o fungo *Stenocarpella maydis* (Berk.) B. Sutton (sin. *Diplodia maydis* (Berk.) Sacc.) pertence ao grupo dos Ascomycetes, sendo caracterizado morfológicamente por apresentar picnídios imersos, conídios cilíndricos, fusiformes, retos a ligeiramente curvados, bicelulados, comumente com um septo (Sutton & Waterston, 1966; Sutton, 1980). Em relação a hospedeiros, esta espécie parasita, preferencialmente, plantas de milho, entretanto, já foi encontrada como parasita de bambu, não havendo relatos de outros hospedeiros nas condições brasileiras (Reis et al., 2004; Casa et al., 2006).

A doença causada pela *S. maydis* apresenta, como um dos danos mais importantes, o efeito negativo sobre a germinação de sementes, podendo matar o embrião ou comprometer o vigor das plantas emergidas. Danos subsequentes podem ser observados na forma de podridão do colmo e da espiga. A podridão do colmo interfere no desenvolvimento normal da planta, afetando suas funções, ocasionando quebra da base do colmo, acamamento e, conseqüentemente, morte prematura da planta. A podridão branca da espiga pode causar redução na produtividade e na qualidade dos grãos colhidos. Além disso, este fungo é produtor de micotoxinas, o que afeta o valor econômico e nutricional do produto, mas das quais ainda não se tem a identificação correta (Trento et al., 2002; Pinto, 2005; Casa et al., 2006).

Um sinal importante para a diagnose da doença é a presença dos picnídios subepidérmicos, pequenos, pardo-negros, agrupados nas lesões

próximas aos tecidos dos nós, principalmente quando o tecido encontra-se senescido, ou seja, próximo da colheita ou após a colheita. O quadro sintomatológico inclui alteração da cor externa do colmo, parte interna dos nós e desintegração da medula, deixando apenas os feixes vasculares intactos. Os sintomas na espiga se iniciam na sua base, logo após a fecundação. As brácteas da espiga tornam-se despigmentadas e de coloração parda. Quando a infecção ocorre duas semanas após a polinização, toda a espiga pode tornar-se podre, apresentando coloração pardo-cinzenta a esbranquiçada, enrugada e leve, com as palhas internas fortemente aderidas umas às outras ou aos grãos, devido ao crescimento do micélio do fungo. Os picnídios negros podem se formar sobre a palha, brácteas florais, sabugo e grãos. Os grãos infectados apresentam cor cinza fosco a marrom. As espigas infectadas ao final do ciclo da cultura não mostram sintomas externos e, quando são despalhadas e os grãos assintomáticos removidos, o micélio branco pode ser visto entre os grãos remanescentes nas espigas. Alguns isolados de *S. maydis* induzem à viviparidade, ou seja, a germinação prematura dos grãos. Também foi verificado que as plantas com podridão do colmo normalmente apresentam as espigas com a ponta voltada para baixo (Reis et al., 2004; Casa et al., 2006; Casela et al., 2006).

Informações sobre aspectos epidemiológicos deste complexo de doenças são relatados, com maiores detalhes, por alguns pesquisadores, como Reis & Casa (1996), Casa et al. (1998, 2003, 2004, 2006, 2007), Reis & Mario (2003) e Reis et al. (2004).

Além de ser considerado um dos principais veículos de disseminação deste patógeno, a semente de milho infectada é responsável pela introdução dos fungos em novas áreas de cultivo, mesmo distante de seu local de produção, constituindo-se assim importantes fontes de inóculo primário para podridão de semente, morte de plântulas e podridão de raízes. A transmissão dos patógenos pelas sementes assume, portanto, um papel ainda mais preocupante em lavouras nas quais o milho nunca foi cultivado, ou em áreas de rotação de culturas. O processo de transmissão de *S. maydis*, descrito na literatura, tem início por meio do micélio do fungo, que coloniza o sistema radicular e a base do colmo. A passagem do inóculo da semente via mesocótilo, alcançando a coroa, raízes e, finalmente, a base do colmo, é um processo lento, que pode coincidir com o ciclo da cultura (Reis et al., 2004; Casa et al., 2006).

Para os estudos sobre mecanismos de transmissão de patógenos, com o objetivo de acompanhar a trajetória do patógeno a partir de sementes contaminadas/infectadas à progênie, tem sido comum o uso de técnicas de isolamento convencionais, em que tecidos de plantas suspeitas de infecção são incubados em meios de cultura agarizados ou em substrato de papel com assepsia. Após a incubação, observações microscópicas são realizadas para a identificação de estruturas típicas dos patógenos. Em níveis mais avançados, pode se lançar mão do uso de técnicas baseadas em análises de marcadores moleculares/bioquímicos ou observações em microscópios eletrônicos. Mais

recentemente, marcadores genéticos, tipo GFP e DsRed, têm sido utilizados com sucesso.

Alguns genes marcadores empregados em estudos, como o da β -galactosidade (GUS), cloranfenicol acetiltransferase (CAT) e luciferase (LUC), podem causar efeitos indesejáveis e não permitir a observação de tecidos vivos, necessitando de fixação de material e da adição de substratos exógenos. Além disso, existe a desvantagem, no caso de observação de tecidos e células fixadas, que está na observação da célula em um único estágio no decorrer do evento que se quer estudar, não sendo possível fazer um acompanhamento cronológico do mesmo, ou seja, da dinâmica celular (Figueira, 2002).

O gene *gfp*, que codifica a proteína *green fluorescent protein* (GFP), foi encontrado originalmente na medusa *Aequorea victoria*, animal marinho do oceano Pacífico (Cubitt et al., 1995). Em 1992, o cDNA do gene, responsável pela luminescência, foi clonado e sequenciado, apesar de ser conhecido desde a década de 1950 (Prasher, 1992). A proteína GFP 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 (Cubitt et al., 1995; Lorang et al., 2001). A fluorescência é derivada de uma sequência de ativação de duas fotoproteínas, aequorina e a *green fluorescent protein* (GFP). Inicialmente, a aequorina se liga ao cálcio, emitindo uma luz azul que, por sua vez, excita a GFP que produz fluorescência verde (Figueira, 2002). Entretanto, o DsRed, a proteína

vermelha fluorescente, é originado de um coral, o *Discoma* sp., e se diferencia do GFP por necessitar de um comprimento de onda maior, aproximadamente 583 nm, para a sua visualização.

Em 1994, Chalfie et al. desenvolveram a técnica que permite fazer o acompanhamento de eventos que ocorrem no ambiente de células de procariotas e eucariotas, como visualizar organelas e monitorar a localização, a movimentação e a atuação de produtos gênicos; possibilitar o detalhamento sobre o processo de colonização e infecção por patógenos; rastrear proteínas de microrganismos e, até mesmo, o próprio microrganismo no ambiente celular. Por meio da microscopia confocal e técnicas de análise quantitativa de imagens, a técnica utilizando GFP e DsRed pode ser utilizada sem a manipulação das amostras (evitando análises destrutivas), para isolar células transformadas ou células específicas de uma população (Cormack et al., 1996), quantificar a expressão de genes de células individuais dentro de organismos ou avaliar a dispersão e a biomassa de organismos em ambientes (Valdivia et al., 1996; Maor et al., 1998).

A utilização da técnica de GFP e DsRed apresenta inúmeras vantagens na marcação gênica, pois a sua expressão pode ser visualizada em observações *in vivo* de células individuais, populações de células ou em organismos interagindo com simbiontes ou com o ambiente em tempo real. Além disso, possui baixa ou nenhuma toxicidade ou atividade endógena, é extremamente estável, além de manter a atividade, quando associada a muitas proteínas celulares e extracelulares (Lorang et al., 2001; Lagopodi et

al., 2002). Por meio de luz azul ou ultravioleta e oxigênio, ocorre a emissão de fluorescência, não afetando, assim, o tecido examinado, ao contrário do que ocorre com outros genes repórteres, que dependem da adição de cofatores ou de substratos exógenos aos tecidos da planta (Maor et al., 1998; Lorang et al., 2001).

Para o sucesso da expressão das proteínas fluorescentes numa célula, são necessários diversos fatores. Primeiramente, deve-se lembrar que, além da importância da qualidade do microscópio e dos filtros utilizados, uma quantidade mínima de GFP e DsRed deve ser sintetizada dentro da célula para que ela possa ser detectada. Por isso é tão importante a escolha dos promotores e das metodologias empregadas para a transformação da célula. Os plasmídios e os promotores devem ser adquiridos observando-se o mais indicado para o tipo de célula com que se está trabalhando; a partir daí, a técnica pode ser desenvolvida em laboratórios que tenham condições mínimas para o trabalho com as técnicas básicas em biologia molecular (Figueira, 2002).

Para o estudo das interações de microrganismos fitopatogênicos com as plantas hospedeiras, diversos trabalhos já foram desenvolvidos por meio do uso de marcador GFP, tendo os primeiros sido realizados com leveduras (Cormack, 1998). Os primeiros trabalhos de expressão do GFP em fungo filamentosos, no caso *Ustilago maydis*, foram realizados por Spellig et al. (1996). A partir deste trabalho, inúmeros outros foram realizados com diversas espécies de fungos (Fernández-Ábalos et al., 1998; Du et al., 1999;

Dumas et al., 1999; Bae & Knudson, 2000; Horowitz et al., 2002; Lee et al., 2002; Oren et al., 2003; Aboul-Soud et al., 2003; Saint-Jean et al., 2005; Rajasekaran et al., 2008). Já o DsRed foi utilizado, em 2003, por Nahalkova & Fatehi, para transformação genética de *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici*. Esses acontecimentos se devem ao fato de, além de todas as vantagens já mencionadas, o GFP e o DsRed não terem apresentado nenhuma interferência no desenvolvimento normal das células fúngicas, não afetando, assim, a morfologia do fungo e da colônia, a taxa de crescimento, a pigmentação e a formação de conídios, e os isolados são tão patogênicos quanto o tipo selvagem. Portanto, a técnica empregada permite o acompanhamento de detalhes do processo de infecção, penetração, colonização e crescimento do fungo, dentro e fora dos tecidos.

Para detectar a expressão de uma endopoligalacturonase de *Colletotrichum lindemuthianum* em feijão, foi utilizada a proteína GFP 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 estudos de interações patogênicas e não-patogênicas de *Colletotrichum acutatum*, foi possível, segundo Horowitz et al. (2002), por meio da GFP, observar a dinâmica dessas interações. Nas relações patogênicas com morango, os autores observaram o fungo se desenvolvendo rapidamente, preenchendo o mesófilo da planta com crescimento denso do micélio e posterior invasão de células, causando necrose dos tecidos. Já nas

interações não-patogênicas com pimenta, berinjela e tomate, os conídios germinados produziram tubos germinativos finos e frágeis. Os autores sugeriram que essas diferenças no desenvolvimento do fungo poderiam estar ligadas à presença de moléculas sinais, em plantas de morango, desencadeando a germinação de apressórios e a penetração do patógeno no hospedeiro primário.

Oren et al. (2003), utilizando a proteína GFP, acompanharam os eventos iniciais de infecção de plantas de milho por *Fusarium verticillioides*. Nesse trabalho, além das sementes de milho, o solo utilizado, também foi inoculado com o isolado transformante, tendo a infecção a partir das sementes sido monitorada e observada desde as primeiras horas. Foi caracterizado, a partir da observação do desenvolvimento do patógeno, em diferentes tecidos de plântulas, que a ausência de sintomas ocorre devido à infecção de determinados tecidos, ao crescimento intercelular de um número limitado de hifas e à ocorrência da reprodução do fungo em poucas células, sem a invasão das adjacentes. Em *Fusarium oxysporum* expressando GFP, foi realizado o estudo da colonização e da infecção de raízes de tomate e os autores concluíram que o fungo inicia, nos pelos radiculares, o contato com o hospedeiro, ocorrendo também colonização preferencial de raízes superficiais. Observou-se, ainda, que não ocorre infecção em sítios específicos ou estruturas específicas e que, após o contato inicial, o fungo desenvolve intensa colonização dos tecidos da parte aérea (Lagopodi et al., 2002).

Outras aplicações de grande interesse são relatadas na literatura envolvendo patógenos, como *Fusarium oxysporum* em tomate (Lagopodi et al., 2002), *Mycosphaerella fijiensis* e *Mycosphaerella musicola* em banana (Balint-Kurti et al., 2001), *Sclerotinia sclerotiorum* em feijão, canola, girassol e soja (Silva et al., 2009) e o processo de infecção causada por *Rosellinia necatrix* (Pliego et al., 2009).

Alguns trabalhos envolvendo, principalmente, fungos transformados e sementes foram desenvolvidos satisfatoriamente. Du et al. (1999) conseguiram um bom nível de expressão do GFP em *Aspergillus flavus*, mostrando a viabilidade do uso da técnica para monitorar a colonização de sementes de milho e indicando também ser possível a sua utilização na triagem de sementes provenientes de linhagens resistentes obtidas em programas de melhoramento genético.

Em estudo de sementes de algodão com *Aspergillus flavus* transformado com GFP, conseguiu-se elucidar com detalhes a dinâmica do processo de colonização desse fungo. Assim, foram observados todos os tecidos das sementes colonizadas e a velocidade dessa colonização, concluindo-se que o fungo coloniza o interior da semente, o tegumento e os cotilédones, no prazo de 72 horas, e a sua entrada na semente ocorre através de poros. Ainda foi possível observar a produção de aflatoxina do fungo (Rajasekaran et al., 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

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 *Stenocarpella maydis* e determinação do perfil de sementes de milho

Os isolados de *Stenocarpella maydis* (CML 698 e MY2), patogênicos ao milho, designados para a transformação com GFP e DsRed, foram obtidos da coleção micológica do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Minas Gerais e da Empresa Nacional de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Milho e Sorgo), em Sete Lagoas-MG, Brasil.

O perfil do lote das sementes de milho utilizadas (qualidade sanitária e fisiológica inicial do lote) foi determinado de acordo com testes indicados nas Regras de Análises de Sementes (*International Seed Testing Association* – ISTA, 1976; Brasil, 1992). O resultado da análise foi: germinação 96%, umidade 11,66%, *blotter test* (fungos de armazenamento) 24%.

3.2 Avaliação do crescimento e aspectos morfológicos de *Stenocarpella maydis* na presença de higromicina-B, em diferentes concentrações, em meio de cultura agarizado

Os dois isolados de *Stenocarpella maydis* (CML 698 e MY2) foram transferidos para placas de Petri, contendo meio de cultura BDA acrescido do antibiótico higromicina-B (hygromycin-B, Sigma), nas seguintes concentrações: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 µg/mL. Diariamente, foi realizada a análise morfológica e de algumas características culturais, tais como coloração e crescimento das colônias. Para cada isolado, nestes bioensaios, foram utilizadas cinco repetições de cada concentração do antibiótico.

3.3 Multiplicação do plasmídeo

Os plasmídeos utilizados, pSC001 e pSC002, contendo o gene de resistência ao antibiótico higromicina-B e o gene promotor *pToxA*, originado do fungo *Aspergillus nidulans*, para expressão das proteínas fluorescentes verde e vermelha, foram cedidos pelo pesquisador Dr. Theo van der Lee (Plant Research International, The Netherlands). Inicialmente, os plasmídeos foram multiplicados em células competentes de *Escherichia coli* DH5ac. Para tanto, a célula competente foi transformada, adicionando-se 1 µL de DNA (plasmídeos: GFP e DsRed), seguido de incubação em tubos por 30 minutos no gelo e choque térmico por 30 segundos, a 42°C. Os tubos foram

colocados no gelo por 5 minutos, sendo acrescentados aos mesmos, em seguida, 280 μ L de meio líquido SOC (2 g triptona; 0,5 g extrato de levedura; 1 mL NaCl 1M; 0,25 mL KCl 1M; 97 mL de água destilada; 1 mL de glicose 2M, filtrado e 1 mL Mg^{2+} 2M, filtrado). Logo depois, procedeu-se a agitação em *shaker* (80 rpm), por 30 minutos, à temperatura de 37°C.

Em placas de Petri de poliestireno, foi vertido meio LB sólido (10 g triptona; 5 g extrato de levedura; 10 g NaCl; 15 g ágar, completando-se para 1000 mL com água destilada) contendo ampicilina (100 mg/mL). Posteriormente, fez-se o plaqueamento das células transformadas e estas foram incubadas a 37°C, por 18 horas. Após a incubação, realizou-se a multiplicação das colônias transformadas, em meio LB líquido com ampicilina (10 g triptona; 5 g extrato de levedura; 10 g NaCl; completando-se para 1.000 mL com água destilada). Estes tubos foram novamente colocados em incubadoras sob agitação (80 rpm), a 37°C, por 18 horas. Decorrido esse tempo, fez-se a extração do DNA plasmidial, pelo método da lise alcalina. Para isso, 1,5 mL das culturas crescidas *overnight* foi transferido para microtubos e centrifugados, a 12.000 rpm, por 10 segundos. Descartado o sobrenadante, o pellet foi ressuspensionado e agitado em vórtex, aos quais foram adicionados 300 μ L TENS buffer, seguido de nova agitação em vórtex. Em seguida, após a adição de 150 μ L de NaOAc 3M, procedeu-se a centrifugação por 3 minutos, sendo descartado o pellet e adicionados 5 μ L de RNAase A, com incubação imediata a 37°C, por 30 minutos. Ao conteúdo dos tubos, foram adicionados 200 μ L de PCI

(fenol:clorofórmio:álcool isoamílico), na proporção 25:24:1, com agitação, em vórtex e centrifugação, por 5 minutos, a 12.000 rpm. Após este processo, o sobrenadante foi transferido para novos tubos e a estes adicionados 900 µL de etanol absoluto (EtOH 95%) gelado, seguindo-se de agitação em vórtex e centrifugação, a 12.000rpm, por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, lavou-se o pellet com 300 µL de etanol 70% e secou-se o precipitado a vácuo. O pellet foi ressuscitado em 30 µL de água ultrapura autoclavada. Os plasmídios multiplicados foram analisados em gel de agarose a 1%, corado com GelRed Nucleic Acid Gel Strain.

3.4 Obtenção de protoplastos de *Stenocarpella maydis*

Os isolados foram cultivados em meio de cultura BDA por cinco dias, em temperatura de 25°C e sob regime luminoso de 12 horas de luz/12 horas de escuro. Os seguintes fatores foram avaliados: estabilizadores osmóticos (NaCl 0,37 e 0,7 M; KCl 0,37 e 0,7 M; NH₄Cl 0,6 M; MgSO₄ 0,62 M; sacarose 0,56 M e sorbitol 0,63 M), tempo de crescimento do fungo em caldo de batata-dextrose (24, 48 e 72 horas) e tempo de geração de protoplastos (1, 2, 3 e 4 horas). Esses fatores foram analisados em ensaios independentes. O pH das soluções estabilizadoras foi ajustado na faixa de 5,5-5,7 e estas foram autoclavadas.

A partir do desenvolvimento dos isolados, foram retirados discos de micélio de suas colônias e transferidos para Erlenmeyers (100 mL) contendo

50 mL de caldo de batata-dextrose. Estes foram dispostos em agitador mecânico horizontal a 125 rpm e 25°C. Após a produção de massas miceliais, realizaram-se a filtragem e a secagem, com o auxílio de bomba a vácuo. Posteriormente, para cada 3 mL de estabilizador osmótico, foram adicionados 100 µg de micélio seco e a enzima *lyzing enzymes* (Sigma-L1412-10G), na proporção de 10 mg/mL de estabilizador osmótico. A geração dos protoplastos de *S. maydis* foi realizada em agitador com 75 rpm a 28°C.

3.5 Obtenção dos isolados de *Stenocarpella maydis* transformados

Para a transformação dos isolados selecionados foram utilizados protocolos, anteriormente desenvolvidos por Maier et al. (2005) e Silva et al. (2009) para *Fusarium graminearum* e *Sclerotinia sclerotiorum*, com modificações. Após o tempo de geração dos protoplastos, as respectivas soluções enzimáticas e os protoplastos resultantes foram filtrados em uma camada de gaze previamente esterilizada e posteriormente centrifugadas por 5 minutos a 2.000 rpm e à temperatura de 4°C. Em seguida, foram ressuspensos uma vez em KCl (0,7 M) gelado (4°C) e novamente em tampão de armazenamento, contendo quatro partes de STC (0,8 M sorbitol, 50 mM Tris HCl pH 8,0 e 50 mM CaCl₂) e uma parte de SPTC (0,8 M Sorbitol, 40% PEG4000, 50 mM Tris HCl pH 8,0 e 50 mM CaCl₂).

As soluções protoplasmáticas na concentração final de aproximadamente 10^7 protoplastos/mL, acondicionadas em tubos eppendorf (2,2 ml) foram adicionadas 10 μ L de DNA plasmidial (0,35-1,66 μ g/ μ L) 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 em incubadora em temperatura ambiente por mais 20 minutos. Após esse período, essa solução foi vertida em 200 mL de meio de regeneração a 43 $^{\circ}$ C, 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 1.000 mL de água destilada. Em seguida, esse meio contendo os possíveis isolados transformados foi vertido em dez placas Petri (94 milímetros) contendo 20 ml do meio. Cada um deles foi seguido de incubação por 72 horas, a 25 $^{\circ}$ C. Decorrido esse tempo, a cada placa foram adicionados 10 mL de ágar-água contendo o antibiótico higromicina-B na concentração de 100 μ g/mL, sendo elas mantidas em câmara do tipo BOD, a 25 $^{\circ}$ C, por até quinze dias.

3.6 Avaliação das características morfológicas e culturais dos isolados transformados

Após a transformação, foram conduzidos dois bioensaios. No primeiro, os isolados, marcados com GFP e DsRed, foram transferidos para

o meio BDA comum e, no segundo, foram transferidos para meio BDA acrescido do antibiótico higromicina-B, na concentração de 100 µg/mL. Ambos foram realizados para análise morfológica e de algumas características culturais, tais como coloração e crescimento das colônias. Para tanto, seis isolados foram utilizados para cada bioensaio, sendo dois contendo o gene GFP, dois contendo DsRed e outros dois como testemunhas, ou seja, isolados originais não transformados (CML 698 e MY 2). Adicionalmente, foi realizado o teste de estabilidade mitótica com os transformantes, repicando-se as colônias marcadas com os genes fluorescentes, sucessivamente, em meio BDA, por sete vezes, sendo que a última repicagem em BDA continha o antibiótico higromicina-B (100 µg/mL).

Um segundo teste de estabilidade mitótica foi realizado, no qual as repicagens foram realizadas em meio BDA contendo higromicina B (100 µg/mL). Tanto para os bioensaios como para os testes de estabilidade mitótica, observações foram realizadas utilizando-se microscopia de epifluorescência (Zeiss Axio Observer Z.1) equipada com os filtros: 1) GFP, excitação filtro 470 a 490 nm e pico de transmissão para excitação em 510 a 560 nm e 2) DsRed, excitação filtro 510 a 560 nm e pico de transmissão para excitação em 540 a 583 nm. As imagens obtidas das avaliações foram editadas utilizando-se os softwares Axio Vision Release V.4,7 e o Microsoft Office Picture Manager.

3.7 Confirmação dos genes GFP e DsRed utilizando *primers* específicos

Por meio da técnica de PCR foi confirmada a presença dos genes marcadores, GFP e DsRed, nos fungos transformados, utilizando-se *primers* específicos (TABELA 1) desenhados com base nas sequências de nucleotídeos de ambos os genes. Os isolados transformados e não transformados (Controles), utilizados na reação de PCR, foram cultivados em caldo de batata (100 mL) com dextrose em agitador horizontal a 125rpm, a 25°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 100 mg de micélio macerado, em nitrogênio líquido foram adicionados 10 volumes (1 ml) 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; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH8). Em seguida, o macerado foi aquecido em banho-maria, por 30 minutos, e agitado por inversão a cada 10 minutos. Após a adição de mesmo volume de clorofórmio - álcool isoamílico (24:1) -, as amostras foram centrifugadas, a 12.000 rpm, por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para novos microtubos, adicionando-se 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 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet

resultante foi lavado com etanol 70%, seco a vácuo, ressuspendido em 500 µl 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 50µL contendo 25 mM Mg Cl₂, 10 mM de cada dNTPs, 5 µM dos *primers*, água ultrapura tratada com DEPC e cerca de 2,5 µg de DNA. As condições da reação (GFP) foram: 1 ciclo de desnaturação, a 95°C, por 2 minutos; 30 ciclos de 95°C, por 1 minuto, anelamento a 52,9°C, por 1 minuto e elongação a 72°C, por 1 minuto, com extensão final de 72°C, por 5 minutos. Para DsRed, as condições da reação foram as mesmas, alterando-se o anelamento para 58°C, por 1 minuto. 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 Stain*.

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'

3.8 Inoculação de sementes

As sementes de milho foram previamente desinfestadas, com hipoclorito de sódio 1% por um minuto e, em seguida, lavadas três vezes em água destilada e colocadas para secar sob papel de filtro, em condições assépticas de laboratório e em temperatura ambiente. Posteriormente, as sementes foram acondicionadas sobre seis isolados diferentes, ou seja, os transformados (MCL698 GFP e MY2 GFP; MCL698 DsRed e MY2 DsRed) e não transformados (MCL698 e MY2) desenvolvidos por três dias, a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, em placas contendo meio de cultura BDA modificado com soluto manitol com potencial hídrico ajustado para $-1,0\text{ MPa}$, conforme descrito por Machado et al. (2001) e calculado pelo software SPPM (Michel & Radcliffe, 1995). Para o crescimento dos isolados transformados, no presente estudo, o meio BDA foi acrescido de higromicina-B na concentração de $100\text{ }\mu\text{g/mL}$.

Durante 0, 48 e 96 horas, as placas contendo as sementes foram mantidas nas mesmas condições, ou seja, com temperatura e fotoperíodo controlados em câmara de crescimento, para a obtenção de sementes com diferentes níveis de infecção. Decorrido o tempo de inoculação, as sementes foram retiradas do meio e secas, à temperatura ambiente, sobre papel “gemitest”, por 48 horas.

3.8.1 Teste de germinação

Para cada tratamento (sementes inoculadas e períodos de inoculação), foram utilizadas 4 repetições de 50 sementes, distribuídas sobre substrato de papel (tipo germitest) umedecido com água destilada, 2,5 vezes o peso do papel seco. Os rolos de papel foram colocados em germinador regulado à temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. As avaliações foram realizadas no quarto e no sétimo dia, conforme as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

3.8.2 Teste de condutividade elétrica

Para avaliação da condutividade elétrica das sementes de milho inoculadas, foram utilizadas 100 sementes (duas repetições de 50 sementes) por tratamento. Cada subamostra foi, inicialmente, pesada em balança de precisão 0,001g e colocada para embeber em recipientes contendo 75 ml de água deionizada e mantida à temperatura de 25°C , durante 24 horas. Após esse período, fez-se a leitura da condutividade elétrica na solução de

embebição, com o auxílio de um condutivímetro Digimed, modelo DM-21, sendo este calibrado, inicialmente, com uma solução de KCl. Os resultados foram expressos em $\text{mmhos.cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, conforme descrito por Krzyzanowski (1999).

3.9 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os delineamentos experimentais utilizados no trabalho foram blocos casualizados (DBC) e inteiramente casualizados (DIC), tendo as análises de variância sido realizadas com auxílio do programa Sisvar (Ferreira, 2000). As médias entre tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à concentração mínima de higromicina-B inibitória do crescimento dos isolados originais de *Stenocarpella maydis*, observou-se que houve comportamento distinto entre esses isolados (FIGURA 1).

Para o isolado CML 698, não houve interferência do antibiótico nas características morfológicas da cultura, nas doses em que cresceu. Até a concentração de higromicina-B de 25 µg/mL, o fungo apresentou crescimento gradual, havendo redução acentuada entre 30 e 45 µg/mL, o que caracterizou, ainda, o crescimento do referido isolado nessas concentrações (FIGURA 1A). A partir da concentração 50 µg de higromicina-B/mL, o crescimento foi totalmente inibido. Por sua vez, o isolado MY2 comportou-se ligeiramente diferente do isolado CML 698, conseguindo crescer gradualmente até a concentração de 20 µg higromicina-B/mL e em menor intensidade entre 25 a 45 µg/mL. A concentração mínima inibitória do crescimento de MY 2 foi também de 50 µg higromicina-B/mL (FIGURA 1 B).

De acordo com dados da literatura, as concentrações do antibiótico utilizadas nos protocolos de transformações para outros fungos são bastante variáveis, como, por exemplo, para *Mycosphaerella fijiensis*, cuja concentração é 20 µg higromicina-B/mL (Balint-Kurti et al., 2000) ou para *Fusarium graminearum* em que a concentração inibitória do antibiótico

chega a 300 µg/mL (Maier et al., 2005). Isso faz com que essa determinação seja feita para cada caso.

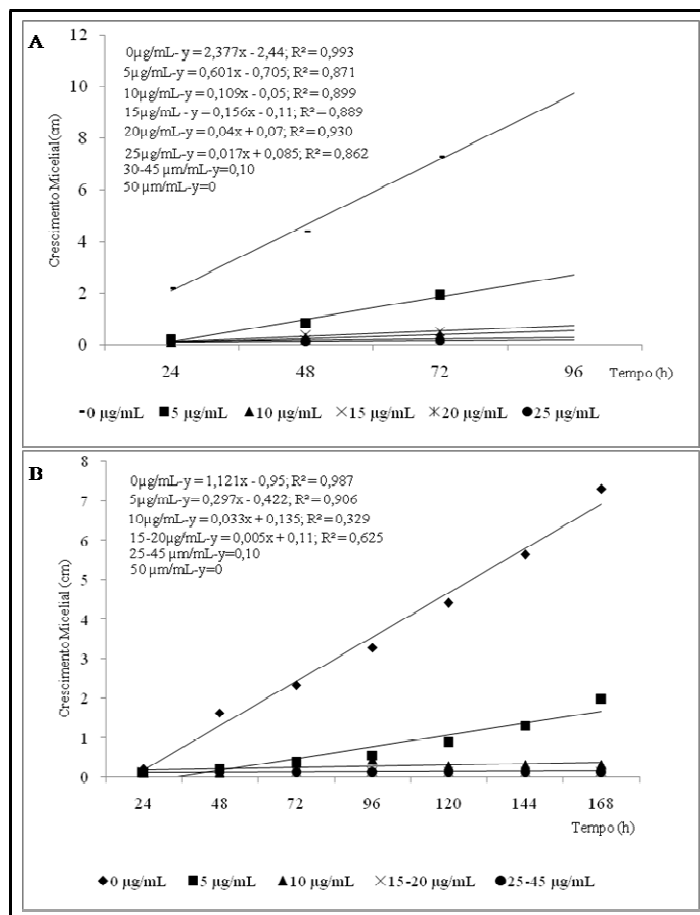


FIGURA 1 Crescimento micelial de isolados originais de *S. maydis*, CML 698 (A) e MY2 (B), em meio de cultura BDA contendo diferentes concentrações de higromicina-B.

Nesta primeira etapa dos trabalhos, os plasmídeos pSC001 (GFP) e pSC002 (DsRed) foram multiplicados em número suficiente em células competentes e a extração e a purificação do DNA foram observadas por meio de eletroforese (FIGURA 2).

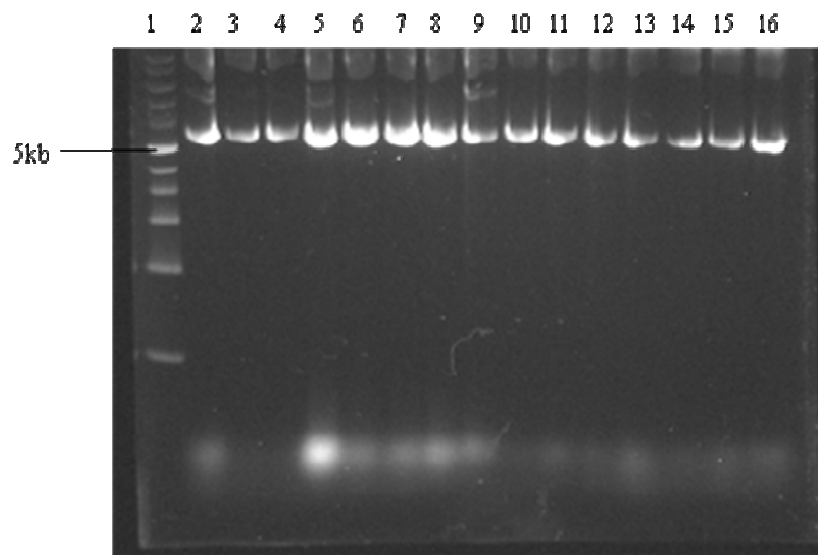


FIGURA 2 Análise eletroforética das bandas originadas da multiplicação do DNA plasmidial, sendo: 1 = Marcador 1kb (Amresco); 2-9 = GFP e 10-16 = DsRed.

Nesta etapa, foram realizados alguns ajustes do protocolo para a obtenção de protoplastos de *S. maydis*, o que possibilitou observar, com

clareza, diferenças nos estabilizadores osmóticos testados, assim como a influência da idade do micélio do fungo, na liberação de protoplastos. O tempo de geração de protoplastos, em que houve a atuação da *lysing enzyme* (Sigma – L1412-10G), também foi influente na caracterização desses protoplastos. Portanto, como descrito por Peberdy et al. (1976), vários são os fatores influenciadores na obtenção de protoplastos, como, por exemplo: a preparação enzimática, o estabilizador osmótico, a idade micelial e o microrganismo a ser utilizado.

Os sais KCl 0,7 M e NaCl 0,7 M foram os mais eficazes estabilizadores osmóticos em relação à liberação de protoplastos, sendo KCl 0,7 M o melhor dentre todos. O tempo de geração de protoplastos mais indicado foi de três horas e, a partir deste tempo, houve produção de protoplastos com deformações (FIGURA 3 A). Os estabilizadores à base de açúcares, como o sorbitol e a sacarose, não foram capazes de estabelecer uma condição favorável para a liberação de protoplastos neste trabalho. Isto foi também observado em outros trabalhos com *Magnaporthe grisea* e *Botryosphaeria* sp. (Marchi et al., 2005; 2006). Por outro lado, estudos com *Gliocladium* sp. mostraram que manitol foi considerado um dos mais eficazes estabilizadores osmóticos (Seh & Kenerley, 1988), demonstrando, assim, a diversidade existente entre os microrganismos nesse campo.

Os estabilizadores mais eficazes na primeira etapa deste estudo foram avaliados com relação à idade do micélio, sendo KCl 0,7 M o estabilizador que permitiu a maior liberação de protoplastos em 48 horas de

cultivo dos fungos (FIGURA 3 B). Nestes estudos, valores de $40-45 \times 10^5$ protoplastos/m foram alcançados por meio do uso de KCL 0,7 M. Almeida et al. (2008) relatam que a liberação de protoplastos é extremamente sensível às condições fisiológicas do micélio, o que explica a variação observada dos resultados nos diferentes experimentos.

Observou-se, ainda, que o aumento da concentração da enzima (*lyzing enzymes*; Sigma – L1412-10G), no estabilizador osmótico, não resultou em maior produção de protoplastos.

Para a transformação dos isolados fúngicos com os genes marcadores GFP e DsRed, a concentração de protoplastos obtidos foi ajustada por meio de centrifugação. Em seguida, os protoplastos foram transfectados com sucesso com os respectivos plasmídeos (pSC001 e pSC002), sendo este o primeiro relato de transformação de *Stenocarpella maydis* com genes de proteína fluorescentes. A confirmação da transformação dos isolados de *S. maydis* foi realizada com base na comprovada resistência ao antibiótico higromicina-B e na presença de proteínas fluorescentes, verde e vermelha.

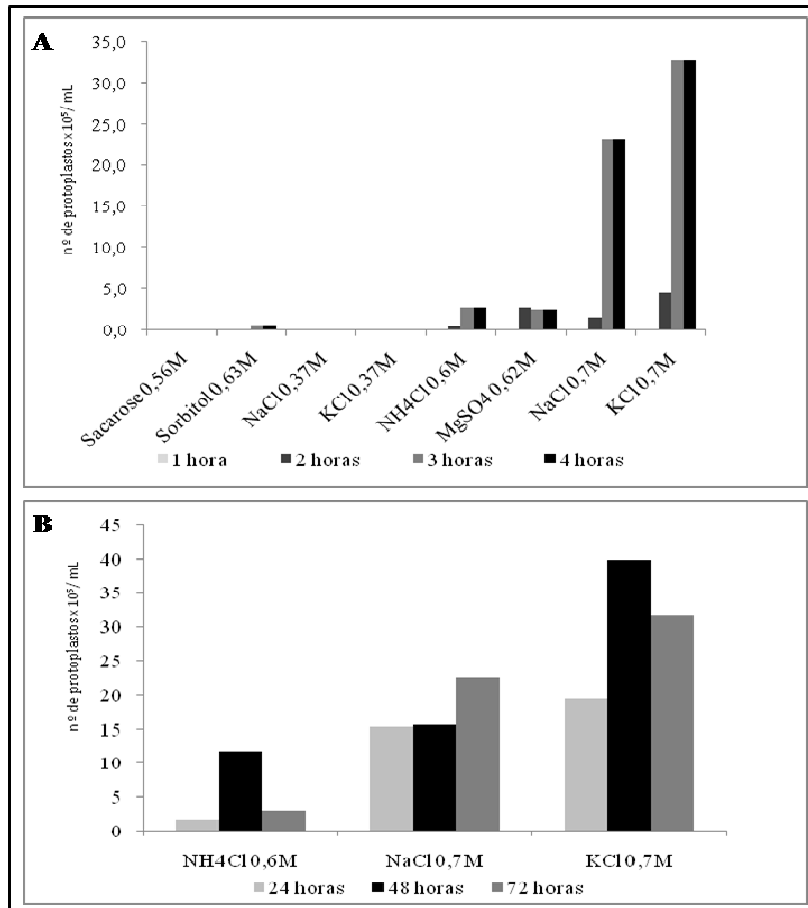


FIGURA 3 Número de protoplastos de *S. maydis* gerados em função de diferentes estabilizadores osmóticos e tempo de liberação de protoplastos (A) e em função de diferentes idades do micélio (B).

Com o ajuste do processo de transformação realizado com o emprego polietilenoglicol 4000 (PEG4000), foram obtidos 38 isolados transformados contendo o gene GFP e 29 contendo o gene DsRed, ou seja, aproximadamente 4-5 transformantes de *S. maydis* por μg de DNA plasmidial. Dessa forma, os ajustes realizados no protocolo de transformação não afetaram a eficácia do processo, levando-se em consideração que esses mesmos níveis foram alcançados em trabalhos com transformações de outros fungos, como *Fusarium oxysporum* (Aboul-Soud et al., 2004) e em valores inferiores, como no caso de *Fusarium verticillioides*, em que se obtiveram dois transformantes por μg de DNA plasmidial (Oren et al., 2003).

Após a transformação gênica, foram realizadas comparações morfológicas entre isolados transformados e não transformados. Em relação à forma e à coloração das colônias, não houve diferenças entre os isolados comparados. Embora tenha sido observada ligeira diferenciação no crescimento micelial em meio BDA, entre isolados transformados e não transformados, ainda assim essas diferenças são aceitáveis, do ponto de vista taxonômico (FIGURA 4 A, B).

Em meio BDA contendo higromicina-B (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a forma e a coloração de colônias dos isolados transformados continuaram não apresentando diferenças, porém, no que tange ao tamanho das colônias e ao crescimento micelial (FIGURA 5 A, B), as diferenças foram mais evidentes. Em geral, essas diferenças podem também ser consideradas dentro dos limites de diferenciação dos fungos com relação a estes quesitos avaliados.

Conforme atestado por Chalfie et al. (1994), o GFP não interfere nas funções normais das células e, portanto, pode ser utilizada para análise dos processos celulares (Cormack, 1998; Tsien, 1998).

Sobre estabilidade mitótica, quando os fungos transformados foram repicados, sucessivamente, por sete vezes em meio BDA, sendo a última em BDA contendo higromicina-B (100 µg/mL), eles apresentaram crescimento normal, mas não mantiveram sua fluorescência verde (transformados com GFP) ou vermelha (transformados com DsRed). Entretanto, quando esses fungos foram transferidos, da mesma maneira, porém, em meio sempre contendo higromicina-B, em média, cinquenta por cento dos isolados transformados com GFP mantiveram sua fluorescência verde e trinta por cento dos isolados transformados com DsRed mantiveram a fluorescência vermelha. Segundo Lorang et al. (2001), isso pode ser explicado pelo fato de alguns fungos, como *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Pyrenophora tritici-repentis*, formarem protoplastos multinucleados, o que pode originar transformantes com fluorescência em apenas algumas células fúngicas, sendo então necessárias, para manter a fluorescência, sucessivas transferências em meio seletivo. Entretanto, pode-se também inferir que o núcleo não manteve a informação para a produção da fluorescência ao longo das sucessivas repicagens.

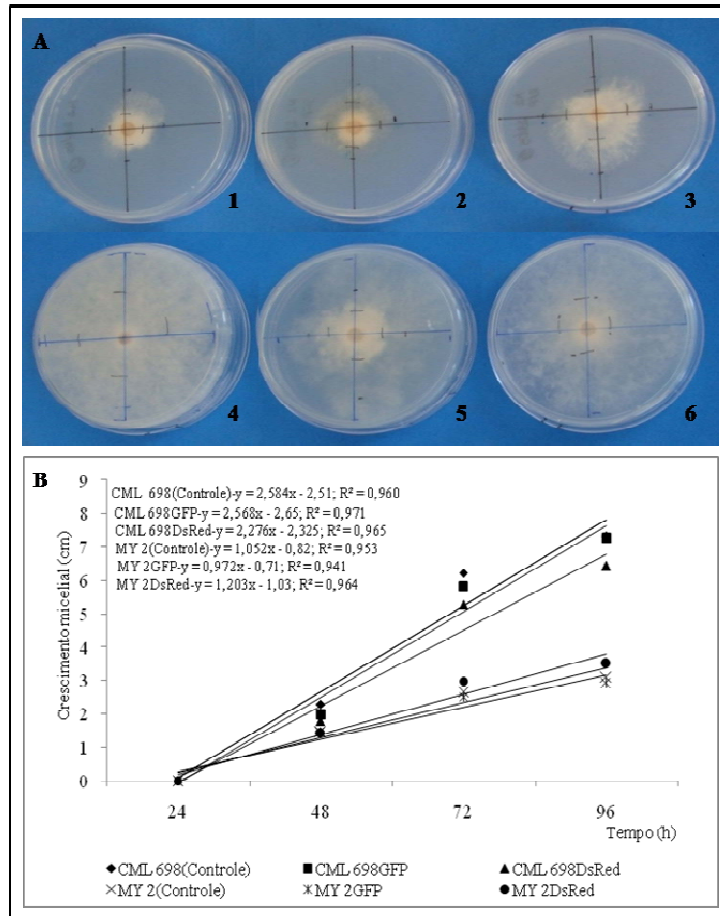


FIGURA 4 Características de coloração (A) e crescimento micelial (B), em meio de cultura BDA, das colônias de isolados originais de *S. maydis* (CML 698, A 1; MY2, A 4), em comparação com isolados transformados com os genes GFP (A 2, 5) e DsRed (A 3, 6).

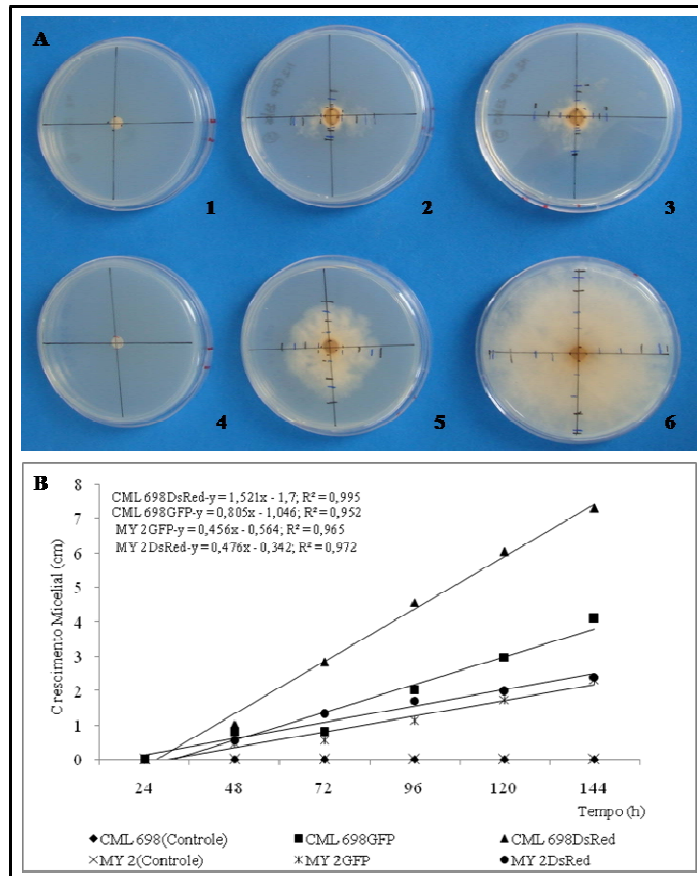


FIGURA 5 Características de coloração (A) e crescimento micelial (B), em meio de cultura BDA acrescido de Higromicina-B, das colônias de isolados originais de *S. maydis* (CML 698, A 1; MY 2, A 4) em comparação com isolados transformados com os genes GFP (A 2, 5) e DsRed (A 3, 6).

A fluorescência verde, evidenciada nos isolados transformados com GFP, apareceu no citoplasma das hifas e não nos núcleos (FIGURA 6 A, B). Nesses isolados, os conídios também apresentaram fluorescência (FIGURA 6 C, D). A fluorescência vermelha foi também observada nas hifas do fungo transformado com DsRed (FIGURA 7 A, B, C, D).

A intensidade da fluorescência, seja esta verde ou vermelha, foi variável entre os isolados transformados; em alguns, esta intensidade foi quase nula. No geral, os isolados transformados com DsRed foram os que alcançaram os níveis mais baixos de intensidade da fluorescência. A variação de intensidade é também relatada em isolados transformados de *Sclerotinia sclerotiorum*, em que o fungo apresentou intensidade de fluorescência entre fraca e forte, sendo isso causado, provavelmente, pela composição variada do número de núcleos nas células que compõem as hifas nessas espécies de fungos. Com a multiplicação das células nesta condição multinucleada, podem ser originadas hifas com maior ou menor número de núcleos transformados, assim explicando esta variação na intensidade de fluorescência (Lorang et al., 2001; Silva et al., 2009).

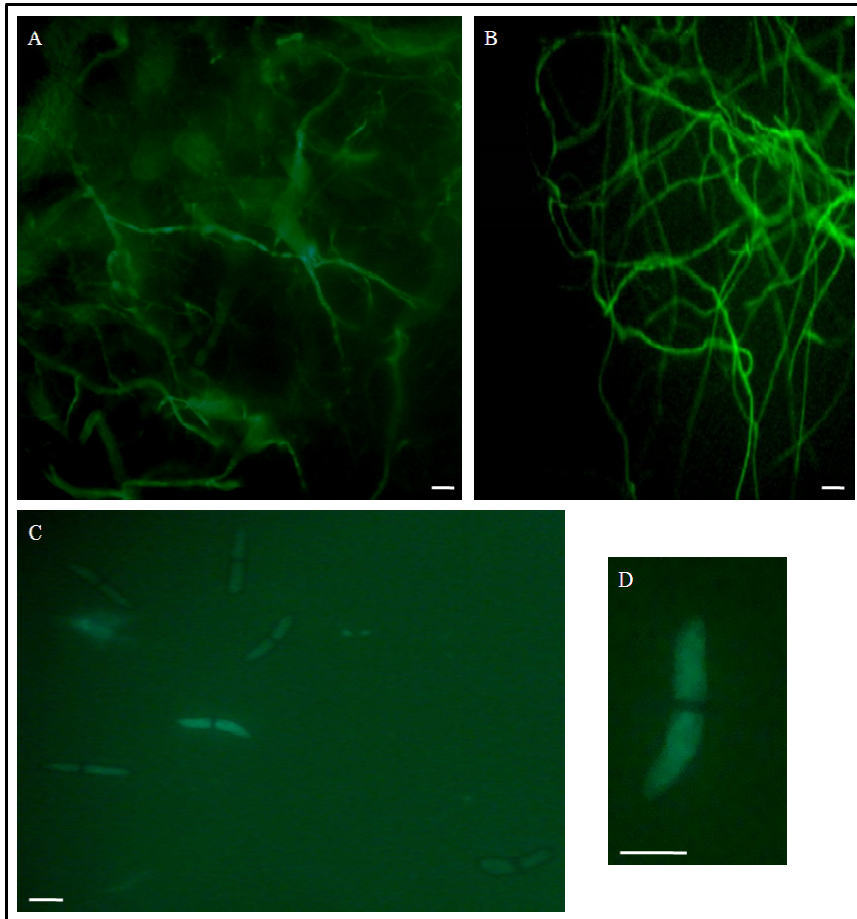


FIGURA 6 Fotografias de microscópio de epifluorescência, da expressão da proteína verde fluorescente, GFP, em *S. maydis*. Hifas (A e B) e conídios (C e D) apresentando fluorescência.

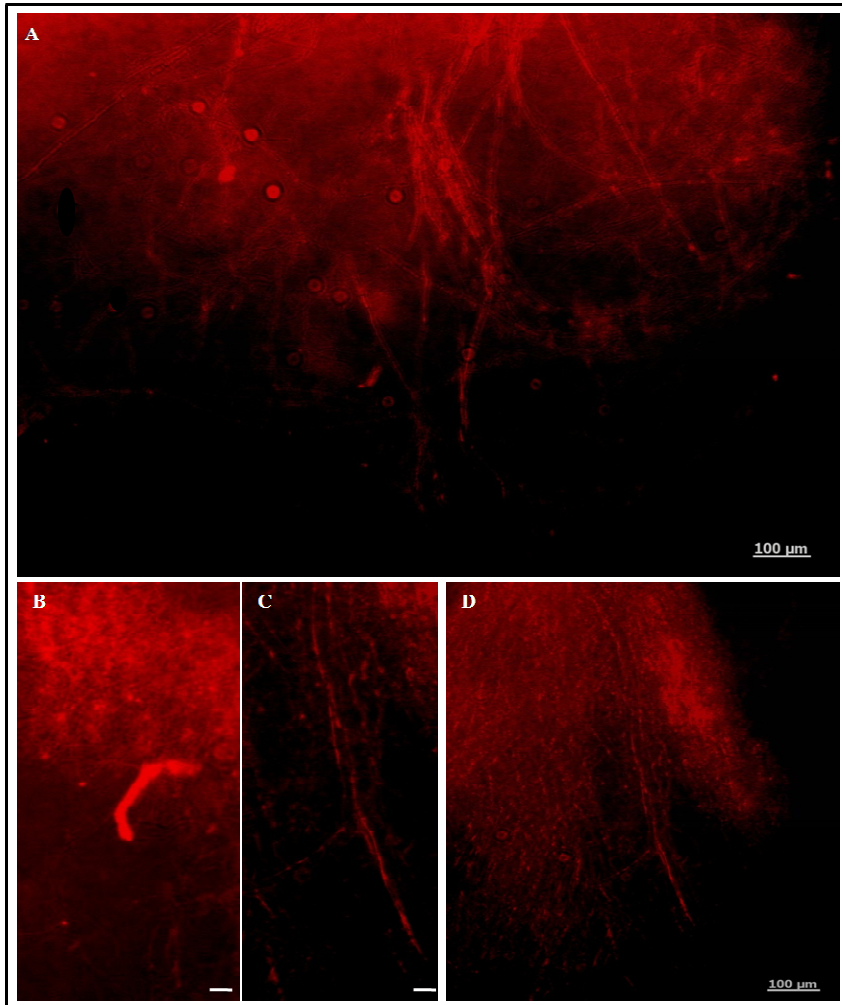


FIGURA 7 Fotografias de microscópio de epifluorescência, da expressão da proteína vermelha fluorescente, DsRed, em *S. maydis*. Hifas apresentando fluorescência (A, B, C e D).

As análises de DNA por PCR (FIGURA 8) confirmaram as observações realizadas em microscopia de epifluorescência, tanto para os isolados transformados como para o controle. A confirmação foi realizada por meio da utilização de *primers* específicos, tanto para o GFP como para o DsRed. A amplificação de uma banda de 720 pb ocorreu apenas para os fungos transformados com o GFP e a amplificação de outra banda de 607 pb ocorreu para isolados transformados com DsRed, o que não foi observado no controle. É relevante ressaltar que a utilização de *primers* específicos, para confirmação da transformação com GFP, é relatada em vários trabalhos com transformação de fungos (Fernández-Ábalos et al., 1998; Dumas et al., 1999; Balint-Kurti et al., 2000; Lee et al., 2002; Aboul-Soud et al., 2004; Silva et al., 2009).

Pelo teste realizado no intuito de averiguar a patogenicidade dos isolados transformados de *S. maydis* em sementes de milho, ficou evidenciado que estes isolados mantiveram a sua capacidade de infectar e causar danos às sementes, nessas condições. Este patógeno é apontado como um dos responsáveis pela diminuição da germinação e do vigor das sementes. A capacidade infectiva de todos os isolados transformados com os marcadores GFP e DsRed neste estudo foi comparável à dos isolados originais. Este fato também já foi relatado em diversos trabalhos com *Colletotrichum destructivum* e *C. orbiculare*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides* e *Rosellinia necatrix*, conforme relatos de Chen et

al. (2003), Nonomura et al. (2003), Oren et al. (2003) e Pliego et al. (2009), respectivamente.

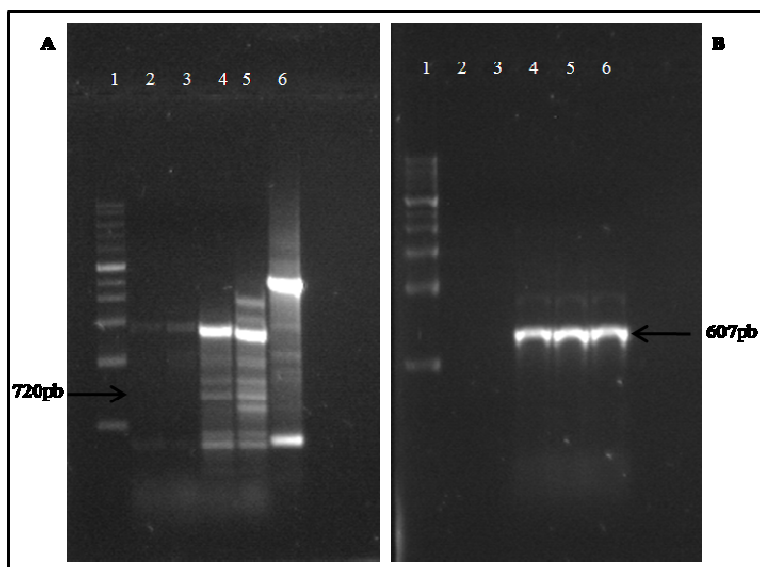


FIGURA 8 Análise eletroforética de bandas originadas pela amplificação do DNA, extraído de colônias de *S. maydis* transformado com GFP e DsRed. Gel A: 1. Marcador 1Kb (Amresco); 2. CML 698 (Controle Negativo); 3. MY 2 (Controle Negativo); 4. CML 698 GFP; 5. MY 2 GFP; 6. Controle Positivo (Vetor pSC001). Gel B: 1. Marcador 1Kb (Amresco); 2. CML 698 (Controle Negativo); 3. MY 2 (Controle Negativo); 4. CML 698 DsRed; 5. MY 2 DsRed; 6. Controle positive (Vetor pSC002).

No teste de germinação em laboratório, a porcentagem de plântulas/plantas normais foi variável entre os isolados, em cada tempo de

exposição das sementes ao fungo testado (FIGURA 9). O efeito negativo observado sobre a germinação de sementes indica que os isolados são capazes de atacar e matar o embrião (FIGURA 10). Nos casos em que a semente germina e a plântula emerge infectada, o vigor da planta sobrevivente é comprometido (Casa et al., 1998; 2006).

Os isolados de CML 698, transformados e não transformados com GFP e DsRed, foram os que mais causaram morte de sementes, em comparação com os isolados transformados e não transformados de MY2 (FIGURA 10 C, D). Para cada isolado de *S. maydis*, houve um comportamento semelhante entre os isolados transformados e não transformados, o que reforça a hipótese de que há preservação das características patogênicas dos isolados transformados em relação aos isolados originais (FIGURA 10 E). Os isolados originais de MY2 e seus transformados também se apresentaram patogênicos com redução da incidência de plântulas normais e se comportando, similarmente, entre si (FIGURA 10 A, B).

A análise de sementes inoculadas, avaliadas pelo teste de germinação e observadas no microscópio de epifluorescência, demonstrou a presença do patógeno no seu interior, tanto nas camadas externas (pericarpo) como na camada de aleurona (endosperma), o que confirma a capacidade infectiva dos isolados transformados. Este tipo de observação foi também relatado para o caso de *Aspergillus flavus* transformado com GFP em

sementes de milho e de algodão colonizadas (Du et al., 1999; Rajasekaran et al., 2008).

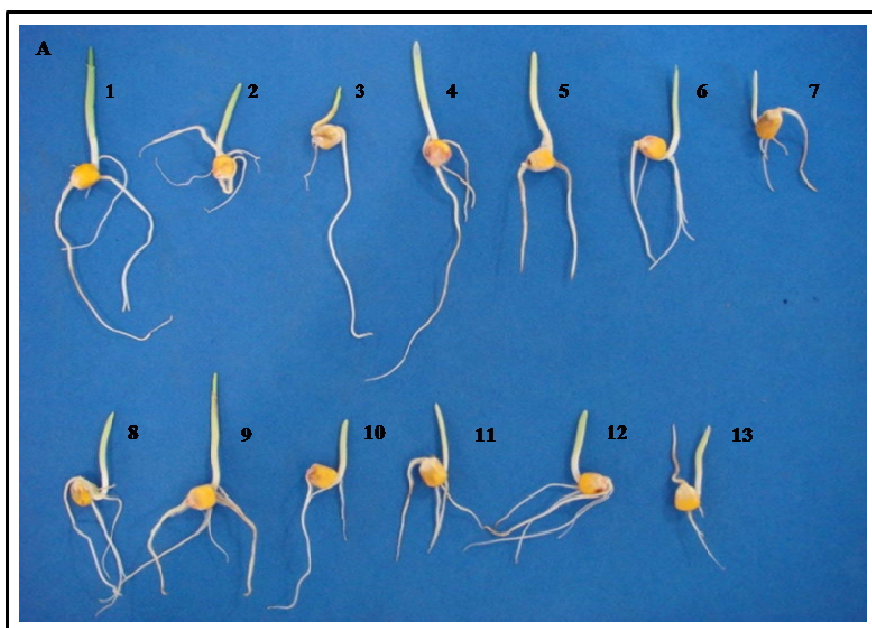


FIGURA 9 Plântulas originadas de sementes de milho inoculadas com *S. maydis* em diferentes tempos de exposição (0, 48 e 96 horas) sendo: 1- semente sem inoculação, 0 h; 2- MY 2(controle) 48 h (tempo de exposição ao fungo); 3- CML 698(controle) 48h; 4- MY 2 GFP 48h; 5- CML 698 GFP 48h; 6- MY 2 DsRed 48h; 7- CML 698 DsRed 48h; 8- MY 2(controle) 96 h; 9- CML 698(controle) 96h; 10- MY 2 GFP 96h; 11- CML 698 GFP 96h; 12- MY 2 DsRed 96h; 13- CML 698 DsRed 96h.

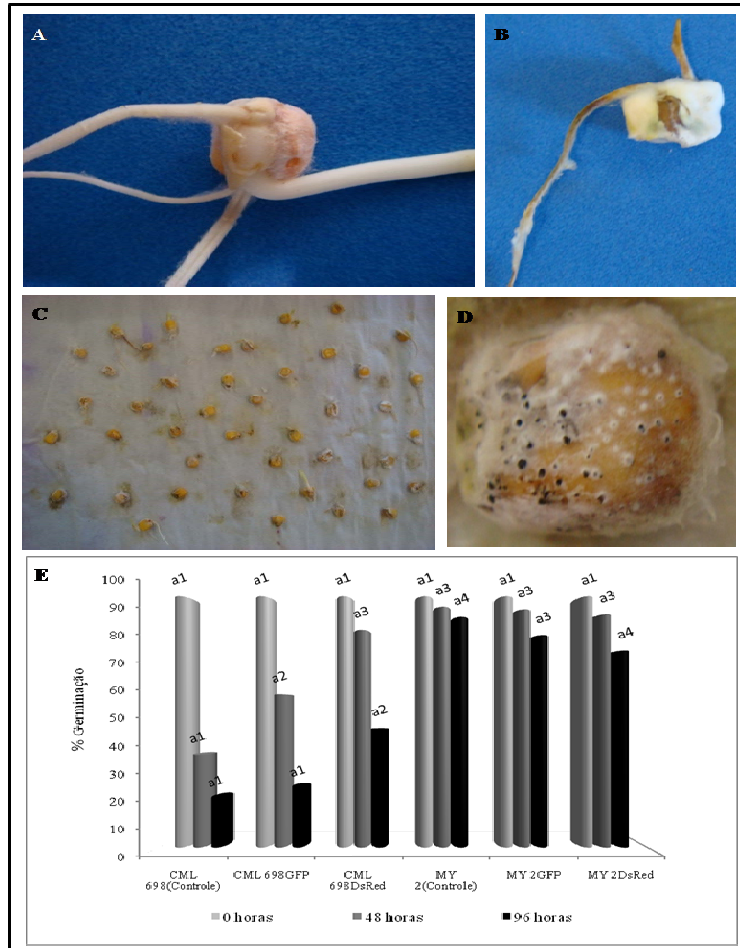


FIGURA 10 Germinação de sementes de milho inoculadas com *S. maydis*. Em A e B, plântulas infectadas com isolados transformados com DsRed. Sementes mortas decorrente da infecção por isolado transformado com GFP (C e D). E: Médias do teste de germinação, teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Pelo teste de condutividade elétrica, que evidencia de forma indireta o grau de degradação de membranas celulares, observou-se que houve comportamento semelhante ao que foi revelado pelo teste de germinação em laboratório. Em resumo, houve variação entre os isolados originais e, para cada um deles, houve um comportamento semelhante entre os isolados transformados. Pelo gráfico da FIGURA 11 percebe-se que a quantidade de lixiviados na solução de embebição das sementes foi mais elevada nas sementes inoculadas, o que demonstra a capacidade destrutiva de *S. maydis* em relação a sementes de milho. As sementes inoculadas, com os isolados transformados CML 698 GFP e MY 2 DsRed, por 96 horas, apresentaram os valores mais elevados no teste, demonstrando que a transformação não alterou a patogenicidade dos isolados.

Diante dos resultados deste trabalho pode-se inferir o grande potencial do uso de marcadores moleculares, do tipo GFP e DsRed, como ferramenta para estudos de patossistemas importantes na patologia de sementes, principalmente para o planejamento de estratégias de controle das doenças, incluindo tratamento sanitário, esquema de armazenamento e outros aspectos ligados à epidemiologia.

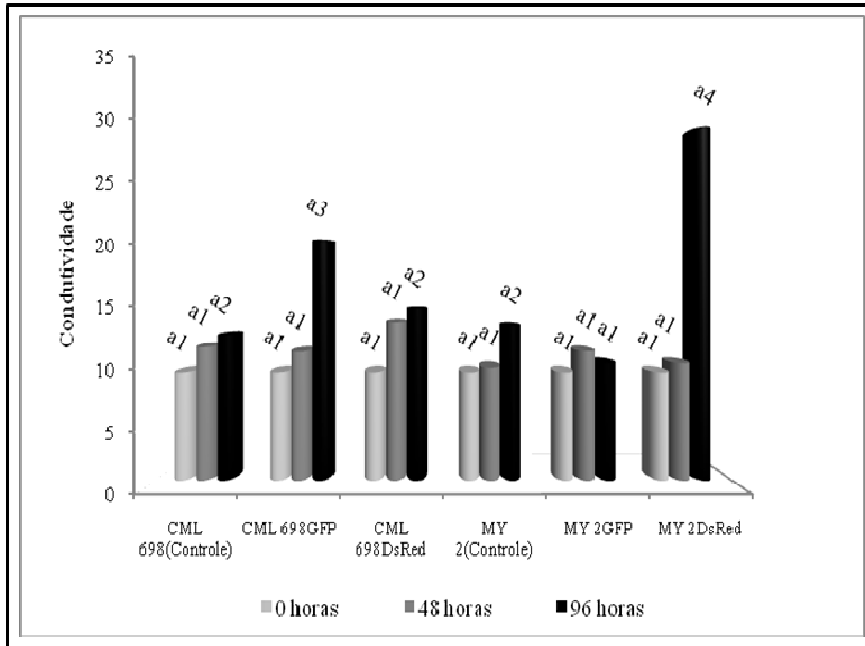


FIGURA 11 Condutividade elétrica de sementes de milho inoculadas, com *S. maydis* transformado com GFP e DsRed e não transformada, em diferentes tempos de exposição.

5 CONCLUSÕES

- Os ajustes realizados no protocolo de transformação utilizados neste estudo são considerados adequados para a transformação de isolados de *Stenocarpella maydis*.
- O emprego dos plasmídeos pSC001 e pSC002 é eficaz no processo de transformação genética de *Stenocarpella maydis* para a expressão dos genes marcadores GFP e DsRed.
- As características morfológicas dos isolados transformados, bem como sua patogenicidade, não são alteradas pela expressão dos genes GFP e DsRed.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUL-SOUD, M. A. M.; YUN, 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. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 158, n. 4, p. 1-8, Dec. 2003.
- ALMEIDA, A. P. M. M.; DIAS, E. S.; PEREIRA, R. T. G.; TOLEDO, R. C. C.; PFENNING, L. H. Obtenção de protoplastos do fungo filamentoso *Aspergillus ochraceus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1460-1462, set./out. 2008.
- 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 and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 2, p. 810, Feb. 2000.
- BALINT-KURTI, P. J.; MAY, G. D.; CHURCHILL, A. C. L. Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 195, n. 1, p. 9-15, Dec. 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: LNAHV/SNAD/MA, 1992. 360 p.
- CASA, R. T.; MOREIRA, E. N.; BOGO, A.; SANGOI, L. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e rendimento de grãos em híbridos de milho submetidos ao aumento na densidade de plantas. **Summa Phytopathologica**, Saint Paul, v. 33, n. 4, p. 353-357, abr. 2007.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Decomposição dos restos culturais do milho e sobrevivência saprofítica de *Stenocarpella macrospora* e *S. maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 355-361, jul./ago. 2003.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Dispersão vertical e horizontal de conídios de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 141-147, mar./abr. 2004.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 427-439, set./out. 2006.

CASA, R. T.; ZAMBOLIM, L.; REIS, E. M. Transmissão e controle de *Diplodia* em sementes de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 436-441, dez. 1998.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 2006. 14 p. (Circular técnica, 83).

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein a marker for gene expression. **Science**, New York, v. 263, n. 5148, p. 802-805, Feb. 1994.

CHEN, N.; HSIANG, T.; GOODWIN, P. H. Use of green fluorescent protein to quantify the growth of *Colletotrichum* during infection of tobacco. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 53, n. 1, p. 113-122, Jan. 2003.

CORMACK, B. Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 1, n. 4, p. 406-410, Aug. 1998.

CORMACK, B.; VALDÍVIA, R. H.; FALKOW, S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). **Gene**, Amsterdam, v. 173, n. 1, p. 33-38, July 1996.

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**, Amsterdam, v. 20, n. 11, p. 448-455, Nov. 1995.

DENTI, E. A.; REIS, E. M. Levantamento de fungos associados às podridões do colmo e quantificação de danos em lavouras de milho do Planalto Médio gaúcho e dos Campos Gerais do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 585-590, ago. 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 and 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 and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 4, p. 1769-1771, Apr. 1999.

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**, Salem, 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.

FIGUEIRA, A. R. O uso de *gfp* (Green Fluorescent Protein gene) como marcador da expressão gênica. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS: APLICAÇÕES NO MANEJO INTEGRADO DE FITODOENÇAS, 1., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2002. 1 CD-ROM.

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

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International rules for seed testing. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 4, n. 1, p. 1-180, 1976.

KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes**: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

LAGOPODI, A. L.; RAM, A. F. J.; LAMERS, G. E. M.; PUNT, P. J.; HONDEL, C. A. M. J. J. van den; 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**, Saint 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. **Modern Pathology**, Baltimore, v. 32, n. 3, p. 153-161, July 2002.

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, Jan. 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 and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 1987-1994, May 2001.

MACHADO, J. C.; CARVALHO, J. C. B.; VIEIRA, M. G. G. C.; GUIMARÃES, R. M. Methodology for infecting seeds by fungi using water restriction technic. In: INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS-SEED SYMPOSIUM, 26., 2001, Angers. **Proceedings...** Angers: ISTA, 2001. p. 62.

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, Nov. 2005.

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

MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; BROMMONSCHEKEL, S. H. Obtenção de protoplastos de *Botryosphaeria* sp. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 12, n. 4, p. 23-32, out./dez. 2006.

MARCHI, C. E.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; QUEIROZ, M. V. de; MIZUBUTI, E. S. G. Isolation and regeneration of *Magnaporthe grisea* protoplasts. **Summa Phytopathologica**, Saint Paul, v. 32, n. 3, p. 232-238, June 2005.

MARIO, J. L.; REIS, E. M. Método simples para diferenciar *Diplodia macrospora* de *D. maydis* em testes de patologia de sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 670-672, jun. 2001.

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1, p. 131-136, Jan. 1995.

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

NONOMURA, T.; TAJIMA, H.; KITAGAWA, Y.; SEKIYA, N.; SHITOMI, K.; TANAKA, M.; MAEDA, K.; MATSUDA, Y.; TOYODA, H. Distinguishable staining with neutral red for GFP-marked and GFP-nonmarked *Fusarium oxysporum* strains simultaneously colonizing root surfaces. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 69, n. 1, p. 45-48, Jan. 2003.

OREN, L.; EZRATI, S.; COHEN, D.; SHARON, A. Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 3, p. 1695-1701, Mar. 2003.

PEBERDY, J. F.; BUCKLEY, C. E.; DALTRY, D. C.; MOORE, P. M. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 67, n. 1, p. 23-26, 1976.

PINTO, N. F. J. A. **Grãos ardidos em milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 2005. 14 p. (Circular técnica, 66).

PLIEGO, C.; KANEMATSU, S.; RUANO-ROSA, D.; VICENTE, A. de; LÓPEZ-HERRERA, C.; CAZORLA, F. M.; RAMOS, C. GFP sheds light on the infection process of avocado roots by *Rosellinia necatrix*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, n. 2, p. 137-145, Feb. 2009.

PRASHER, D. C. Primary structure of *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. **Gene**, Amsterdam, v. 111, n. 2, p. 229-233, Feb. 1992.

RAJASEKARAN, K.; CARY, J. W.; COTTY, P. J.; CLEVELAND, T. E. Development of a GFP-Expressing *Aspergillus flavus* strain to study fungal invasion, colonization, and resistance in cottonseed. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 165, n. 2, p. 89-97, Feb. 2008.

REIS, E. M.; CASA, R. T. **Manual de identificação e controle de doenças de milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996. 80 p.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; BRESOLIN, A. C. R. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. 2. ed. Lages: Grapel, 2004. 144 p.

REIS, E. M.; MÁRIO, J. L. Quantificação do inóculo de *Diplodia macrospora* e de *D. maydis* em restos culturais, no ar, e sua relação com a infecção em grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 143-147, jan. 2003.

SAINT-JEAN, S.; TESTA, A.; KAMOUN, S.; MADDEN, L. V. Use of a green fluorescent protein marker for studying splash dispersal of sporangia of *Phytophthora infestans*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 112, n. 1, p. 391-394, Jan. 2005.

- SEH, M. L.; KENERLEY, C. M. Protoplasts isolation and regeneration and nuclear staining of mycoparasitic *Gliocladium* species. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 121-130, Sept. 1988.
- SILVA, A. P. de; BOLTON, M. D.; NELSON, B. D. Transformation of *Sclerotinia sclerotiorum* with the green fluorescent protein gene and fluorescence of hyphae in four inoculated hosts. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 58, n. 3, p. 487-496, June 2009.
- SPELLING, T.; BOTTIN, A.; KAHMANN, R. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. **Molecular General Genetics**, New York, v. 252, n. 5, p. 503-509, Nov. 1996.
- SUTTON, B. C. **The coelomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.
- SUTTON, B. C.; WATERSTON, J. M. *Diplodia maydis*: descriptions of pathogenic fungi and bacteria, 84. London: CMI, 1966. No page.
- TRENTO, S. M.; IRGANG, H.; REIS, E. M. Efeito de rotação de culturas, de monocultura e de densidade de plantas na incidência de grãos ardidos em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 3, p. 609-613, jul. 2002.
- TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. **Annual Review Biochemistry**, Oxford, v. 67, n. 4, p. 509-544, Aug. 1998.
- VALDIVIA, R.; HROMOCKYJ, A.; MONACK, D.; RAMAKRISHNAN, L.; FALKOW, S. Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. **Gene**, Amsterdam, v. 173, n. 1, p. 47-52, July 1996.