



TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens* DO FUNGO *Moniliophthora perniciosa*, CAUSADOR DA VASSOURA-DE-BRUXA DO CACAUEIRO

Minete-Cardozo, L.¹; Grassi, M., C., B.¹; Rincones, J.¹; Pereira, G., A., G.¹

¹: Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Universidade Estadual de Campinas

leominete@lge.ibi.unicamp.br

Palavras-chave: *Moniliophthora perniciosa*, fitopatógeno, Vassoura-de-bruxa, transformação genética, *Agrobacterium tumefaciens*



O FUNGO *Moniliophthora perniciosa*

E A DOENÇA VASSOURA-DE-BRUXA DO CACAUEIRO

O fungo basidiomiceto *M. perniciosa* é o agente causador da Vassoura-de-bruxa do cacauero (*Theobroma cacao*). Sua introdução na década de 90 no sul da Bahia, maior região produtora de cacau no Brasil, foi responsável por grandes prejuízos sócio-econômicos que perduram até os dias de hoje. Em consequência da doença, o Brasil passou de exportador para importador de cacau.



Figura 1. Cacau infectado por *M. perniciosa*

A IMPORTÂNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE TRANSFORMAÇÃO EFICIENTE PARA *M. perniciosa*

- Manipulação genética do fungo
- Estudo funcional de genes
- Compreensão da interação planta-patógeno
- Desenvolvimento de estratégias de combate à doença

SISTEMA DE TRANSFERÊNCIA GÊNICA

MEDIADO POR *Agrobacterium tumefaciens*

Atualmente, diversos sistemas têm sido utilizados na transformação de fungos filamentosos. Dentre eles, destaca-se a transformação mediada pela bactéria *A. tumefaciens*. Este organismo possui um sistema de transferência gênica horizontal inter-específica baseado no plasmídeo Ti. Este plasmídeo, modificado, foi utilizado como vetor para a transformação de *M. perniciosa*.

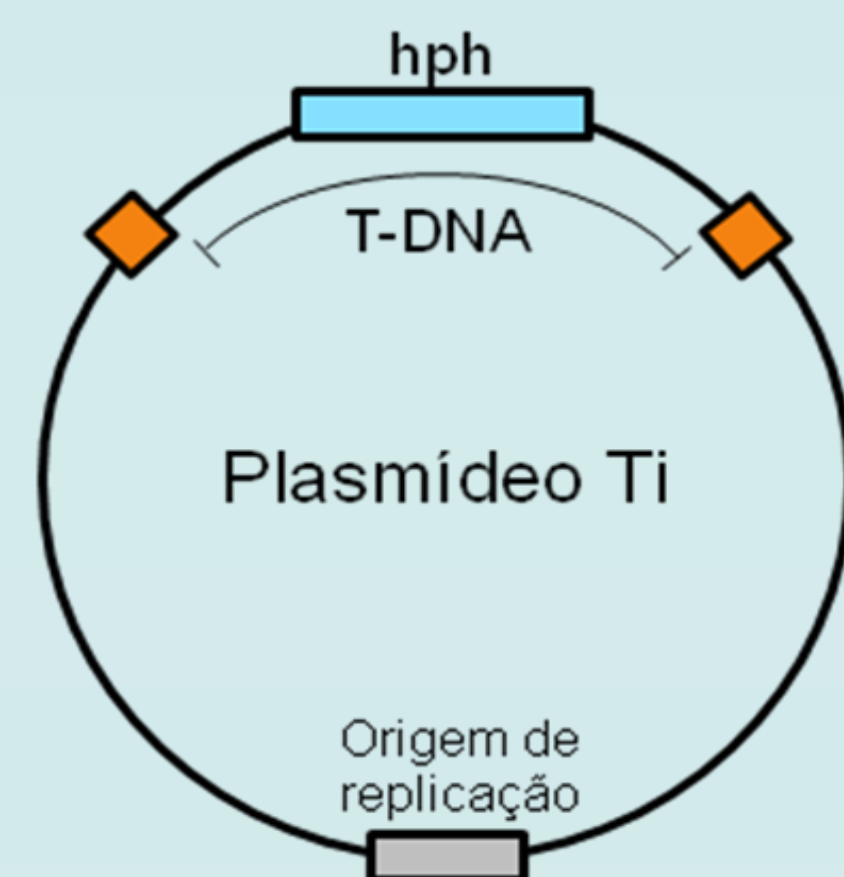


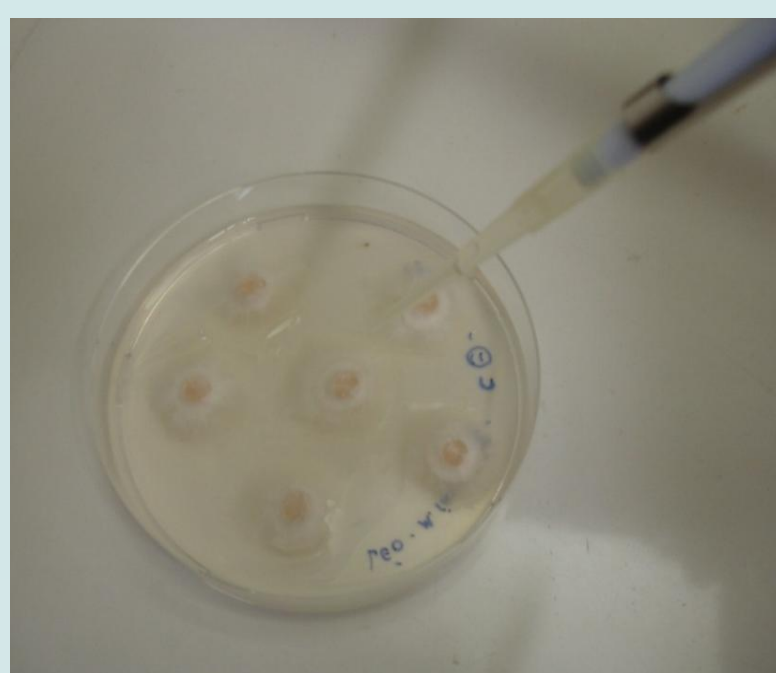
Figura 2. Esquema do plasmídeo Ti utilizado para a transformação de *M. perniciosa*, contendo o gene *hph*, que confere resistência ao antibiótico higromicina.

MÉTODO DESENVOLVIDO PARA TRANSFORMAÇÃO

DE *M. perniciosa*



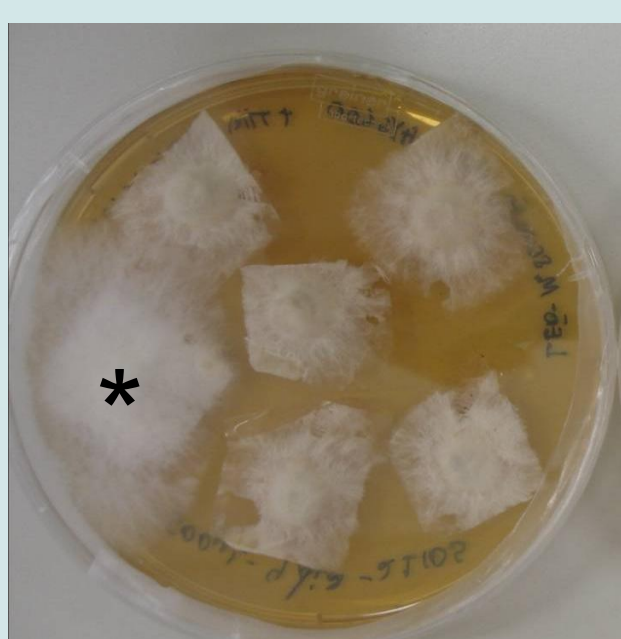
Inoculação do fungo sobre papel celofane (48h)



Co-cultivo em meio de indução



Seleção dos transformantes em meio com higromicina



Observação de transformantes após 10 dias



Cultivo de *A. tumefaciens* (48h) e posterior indução (6h)

Esquema 1. Protocolo de transformação de *M. perniciosa* mediada por *A. tumefaciens*. O asterisco na última figura indica uma provável colônia transformante.

CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO

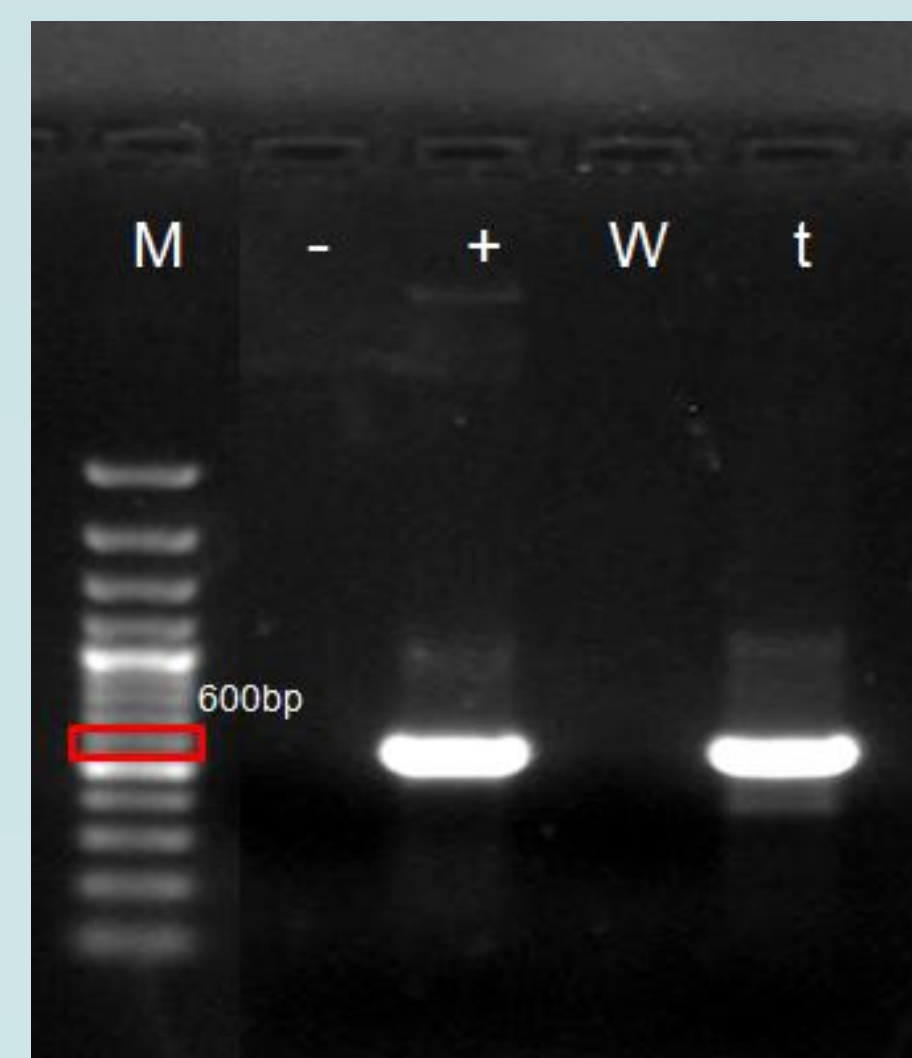


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose do amplicon *hph* (gene transferido). M: marcador molecular; -, +: controles negativo e positivo; W: fungo selvagem; t: transformante.

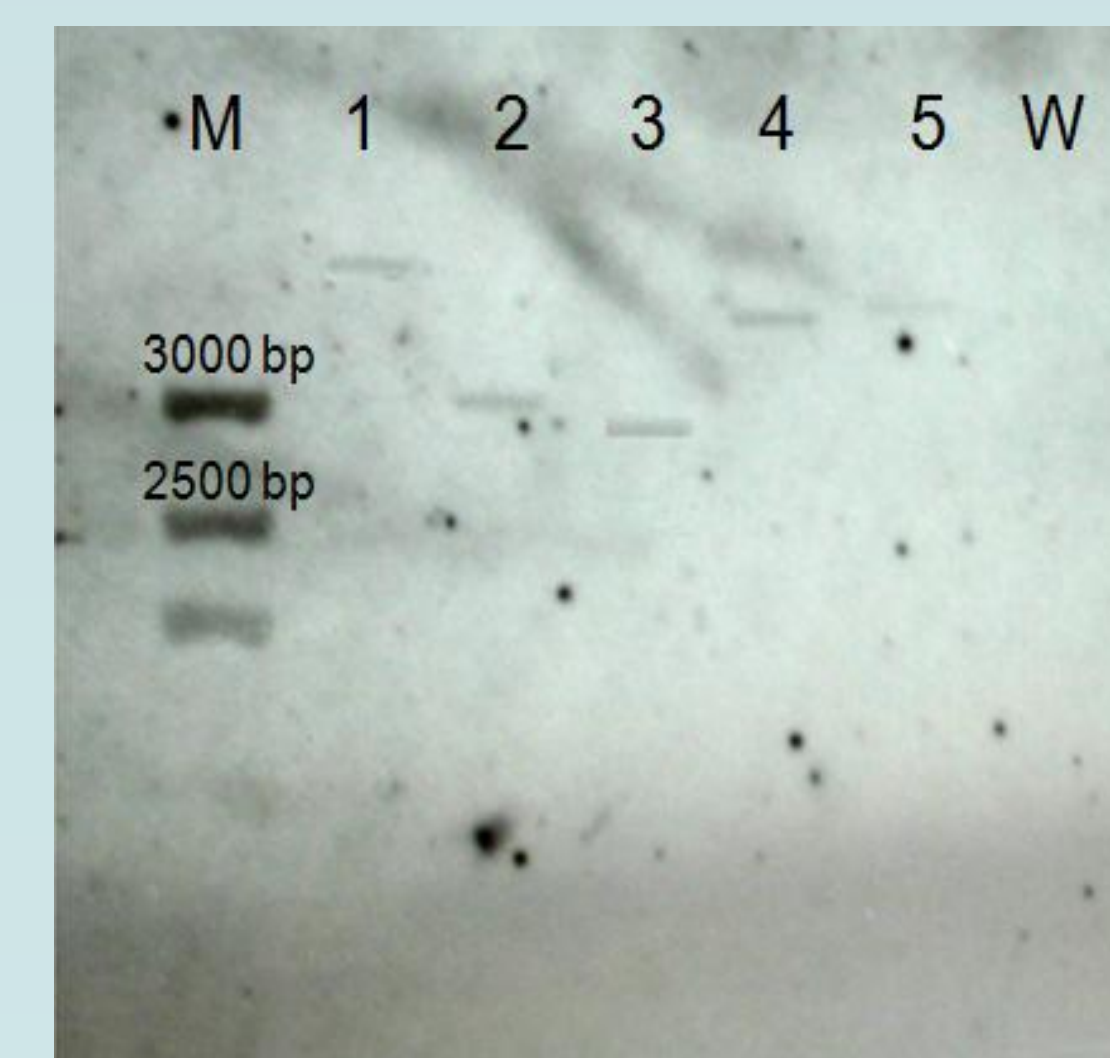
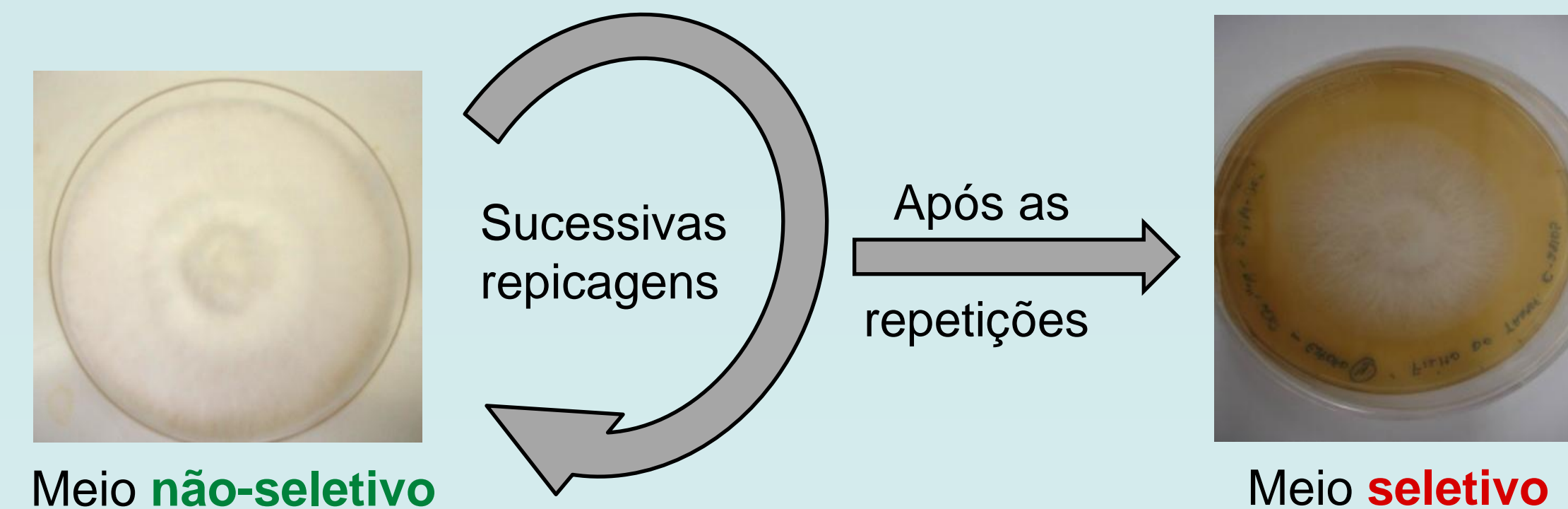


Figura 4. Southern blot, indicando integração de uma única cópia do gene transferido por transformante. Sonda: fragmento do gene *hph*. M: marcador molecular; 1-5: transformantes; W: fungo selvagem.

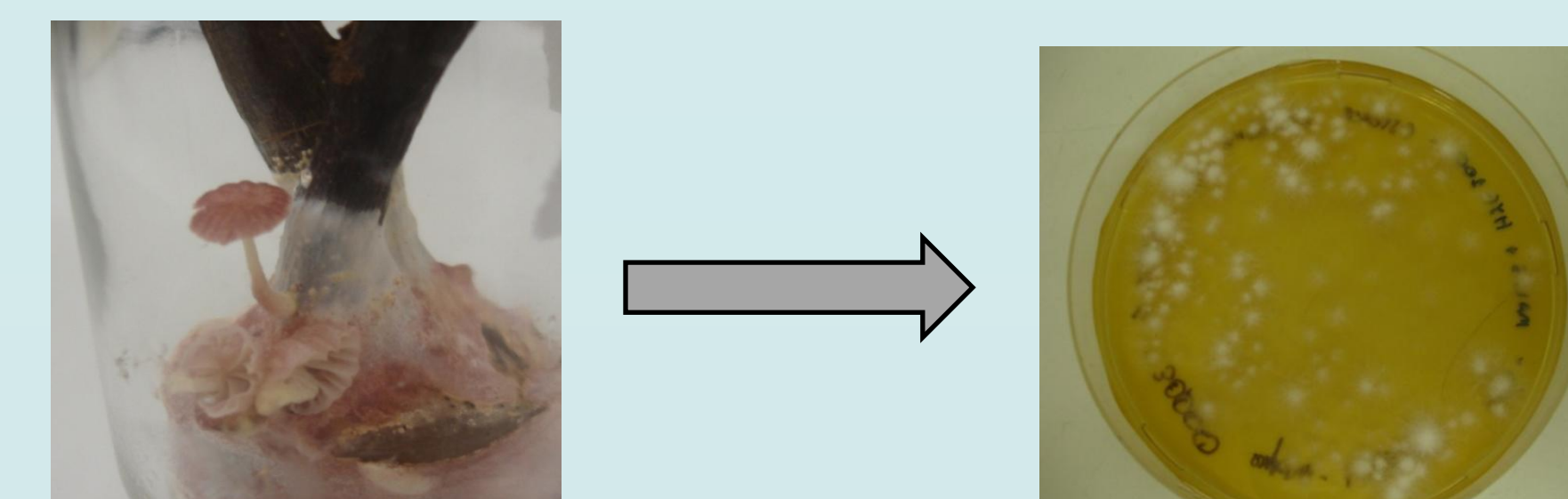
ESTABILIDADE MITÓTICA

Os transformantes mantêm o DNA transferido no decorrer das mitoses na ausência de pressão seletiva?



ESPORULAÇÃO DO TRANSFORMANTE

Os transformantes mantêm o DNA transferido com o passar de gerações (após a meiose)?



Formação de basidioma in vitro a partir de micélio transformante



Esporos obtidos plaqueados em meio seletivo

VARIAÇÃO DE PARÂMETROS – BUSCA POR EFICIÊNCIA

É possível aumentar a eficiência do protocolo de transformação?

Algum parâmetro é preponderante?

- Parâmetros avaliados:
- tempo de cocultivo
 - temperatura de cocultivo
 - linhagem de *M. perniciosa*
 - linhagem de *A. tumefaciens*
 - volume de suspensão de *A. tumefaciens*

* Em negrito, os parâmetros que exercem grande influência

		Linhagens de <i>A. tumefaciens</i>		
		LBA4404	EHA105	AGL-1
Linhagens de <i>M. perniciosa</i>	FA553	x	x	x
	BP10	x	x	transformantes obtidos - 5 a 40% de eficiência

Tabela 1. Influência das linhagens de *M. perniciosa* e de *A. tumefaciens* na eficiência da transformação

CONCLUSÕES

- O protocolo desenvolvido mostrou-se eficiente e altamente reprodutível.
- Os transformantes obtidos são mitoticamente estáveis.
- O trabalho desenvolvido representa a base para estudos envolvendo a manipulação genética do fungo *M. perniciosa*, a exemplo de:
 - silenciamento de genes específicos
 - superexpressão de genes

APOIO

