



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA – MBT**

JOELMA DOS SANTOS FERNANDES

**SILENCIAMENTO DO GENE *SGE1* POR MEIO DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA E
RNA DE INTERFERÊNCIA EM *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense***

**MANAUS
2014**

JOELMA DOS SANTOS FERNANDES

**SILENCIAMENTO DO GENE *SGE1* POR MEIO DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA E
RNA DE INTERFERÊNCIA EM *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador(a): Prof. (a) Dra. Joselita Maria Mendes dos Santos

Co-orientador: Dr. Gilvan Ferreira da Silva

**MANAUS
2014**

Ficha Catalográfica

F362s Fernandes, Joelma dos Santos
Silenciamento do gene *SGE1* por meio de recombinação homóloga e RNA de interferência em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* / Joelma dos Santos Fernandes. -- Manaus : Universidade do Estado do Amazonas - UEA, 2015.
82 f. : il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação MBT – Mestrado de Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, 2015.

Orientadora: Prof^a Dr^a Joselita Maria Mendes dos Santos.

Co-orientador: Dr. Gilvan Ferreira da Silva.

1. Silenciamento gênico 2. *Fusarium oxysporum* 3. Fungo I. Título.

CDU:582.28

Dedicatória

*A vitória desta conquista dedico com todo amor,
a minha família em especial
aos meus pais, Maria de Fatima e João Benedito,
por estenderem suas mãos amigas em momentos
difíceis, e ao meu companheiro João Batista, por ter
permanecido ao meu lado, me incentivando
a percorrer este caminho.*

“Epígrafe”

“O homem não teria alcançado o possível, se inúmeras vezes não tivesse tentado atingir o impossível”.

(Max Weber)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS** primeiramente, pela vida e por ter me abençoado com a obtenção dos resultados deste trabalho “**Fruto da Fé**”, por propiciar tantas oportunidades de estudos e por colocar em meu caminho pessoas amigas e preciosas.

Ào **CNPq** pelo auxílio financeiro.

Ao **Programa de Pós-Graduação** em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA, pela atenção e apoio, que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

A **Embrapa Amazônia Ocidental** pelo apoio a pesquisa.

Aos **professores doutores** que aceitaram participar da banca examinadora na aula de qualificação e na defesa pública da dissertação, agradeço por toda contribuição que foram muito importantes. Ao Dr. Rogério Hanada (membro da banca na aula de qualificação), a Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza (membro da banca na aula de qualificação e na defesa pública da dissertação), e ao Dr. Spartaco Astolfi Filho (membro da banca na defesa pública da dissertação).

À **minha família**: A minha **Mãe** e ao meu **Pai**, pelo apoio nos momentos de angústia e pelo amor que me mostra a direção correta e me ensina a ter fé na vida. Ao meu **companheiro João Batista** pelo apoio, confiança, amor e motivação incondicional, que sempre me impulsiona em direção às vitórias dos meus desafios. Ao meu **sobrinho Bruno Fernandes**, pelo carinho tão puro e verdadeiro que me motivou nessa caminhada. E aos meus **Irmãos Kledison, Kleber e Adriely**.

Aos **meus orientadores**: A minha **orientadora Prof^a. Dr^a. Joselita Maria Mendes**, pela confiança, mesmo sem me conhecer direito abriu as portas e aceitou me orientar. Agradeço muito pelos ensinamentos, pela paciência e dedicação. Ao meu **co-orientador Dr. Gilvan Ferreira**, quem criou todo o projeto e buscou todos os recursos para realização deste, agradeço por acreditar que eu era capaz, pelos momentos de paciência, pelos puxões de orelha, compreensão e competência.

A **Dr^a. Nelcimar Reis**, pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental, pelos incentivos para ingressar no mestrado e pelos ensinamentos durante os meus primeiros passos na pesquisa, um exemplo como pessoa e pesquisadora.

A **Dr^a. Paula Angelo**, pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental, muito obrigada pela ajuda, ensinamentos e contribuições. Por me receber de portas abertas e sempre estar à disposição, respondendo minhas dúvidas e me incentivando a acreditar que tudo daria certo.

Aos **técnicos** do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental: Ao **Jeferson Cruz**, pela generosidade, profissionalismo e boa vontade em me auxiliar, em todos os momentos, sempre com uma solução simples para os meus problemas que pareciam ser gigantes. A **Karina Bichara**, mesmo chegando no lab. biomol. no final do meu mestrado, contribuiu imensamente com meu trabalho, pois o final do mestrado é sempre o momento que mais precisados de ajuda, muito obrigada.

Aos **amigos** do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, que compartilharam comigo esses momentos de aprendizado, a ajuda de todos vocês foi essencial para esse trabalho, em especial meu muito obrigado a **Gilvana Gualberto** que sempre me socorreu nos momentos que mais precisava de ajuda. Às **amigas** de longa data, **Ana Mara Oliveira e Elizangela da Silva**, que mesmo seguindo caminhos diversos, sempre se fizeram presentes com palavras de encorajamento.

Agradeço a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. **Serei eternamente grata a vocês.**

RESUMO

O *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) é um fungo filamentosso agente causal do mal-do-Panamá. As quatro raças patogênicas de bananeiras (R1, R2, TR4 e STR4) são capazes de gerar grandes prejuízos socioeconômicos ao setor da bananicultura nos países de clima Tropical e Subtropical. No Brasil e no exterior a bananicultura mostra crescimentos econômicos, e a disseminação da doença contribui para a redução considerável da produtividade da maioria das cultivares de bananeiras. Informações sobre quais genes ou componentes de rotas metabólicas que atuam efetivamente na patogenicidade contribuem para o desenvolvimento de várias estratégias de controle da doença, como melhoramento genético do hospedeiro visando à resistência, indução da resistência por meio de linhagens de fungos submetidas à silenciamento, ou silenciamento de gene-específico que atinja apenas o patógeno, sem prejuízo a outros micro-organismos benéficos a planta. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo obter transformantes por meio de recombinação homóloga (*knockout*) e RNA de interferência (*knockdown*), e analisá-los quanto ao *knockout* e/ou silenciamento do gene que codifica o fator de transcrição *Sge1* em *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. Para isso, foram utilizados cassetes com diferentes construções, para recombinação homóloga, um dos cassetes apresentava somente a marca de seleção referente ao gene *hph* e o outro apresentava o gene *hph* e o gene reporter *gfp*. Para o RNA de interferência foi utilizado um cassete com sequências senso e anti-senso do gene *SGE1*. A obtenção dos transformantes para análise foi possível nas duas metodologias “*knockout* e *knockdown*”. Porém na primeira parte do trabalho que foi a análise da ocorrência de *knockout* não foi identificada nenhuma linhagem com recombinação homóloga na região alvo (*SGE1*), pois todos os transformantes analisados apresentaram integração ectópica e os transformantes com integração do cassete *hph/gfp* emitiram perfeitamente a fluorescência verde. Levando em consideração as dificuldades para ocorrência de recombinação homóloga, são necessárias observações em alguns aspectos. Na segunda parte deste trabalho, foram isolados 120 transformantes com integração do cassete para silenciamento via RNA de interferência, no qual apenas 13 foram selecionados para análise, e apresentaram diferentes características morfológicas como, tamanho radial das colônias, pigmentação e capacidade de esporulação, além de diferentes níveis de expressão relativa verificados antes e depois do teste de estabilidade mitótica, dentre estes, três (T2-30%; T4-27% e T7-47%) apresentaram níveis significativos de redução da expressão relativa dos transcritos do gene *SGE1*, indicando o silenciamento do gene. Já na análise do silenciamento por meio do teste de patogenicidade os transformantes selecionados (T4 e T11), conseguiram atingir o rizoma e pseudocaule das bananeiras inoculadas, porém quando comparados à linhagem selvagem de *Fusarium oxysporum cubense* eles conseguiram induzir os sintomas da doença nas bananeiras mais lentamente. Diante destes resultados, pode-se concluir que o mecanismo de RNAi está presente e ativo em *F. oxysporum cubense*, demonstrando ser uma eficiente técnica, abrindo novos caminhos para o desenvolvimento de mecanismos que bloqueiem ou diminuam a ação do patógeno, bem como explorar funcionalmente dados genômico.

Palavras chave: Silenciamento gênico, *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, *SGE1*.

ABSTRACT

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* (*Foc*) is a filamentous fungus causal agent of Panama disease. The four pathogenic races of banana (R1, R2, TR4 and STR4) are capable of generating large socioeconomic losses to banana plantations sector in climates Tropical and Subtropical. In Brazil and abroad the banana crop shows economic growth and the spread of the disease contributes to the considerable reduction in the productivity of most banana cultivars. Information about which genes or components of metabolic pathways which act effectively in pathogenicity contribute to the development of various disease control strategies, such as breeding for resistance of the host, of inducing resistance to fungi by means of strains subjected to muting or silencing of gene-specific only reaches the pathogen, without prejudice to other beneficial microorganisms plant. Thus, this study aimed to obtain transformants through homologous recombination (*knockout*) and RNA interference (*knockdown*), and analyze them as the *knockout* and / or silencing of the gene encoding the transcription factor Sge1 in *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. For this purpose, cassettes of different constructions were used for homologous recombination, one of the tape only had a checkmark concerning the *hph* gene and the other had the *hph* gene and the reporter gene GFP. For RNA interference, we used a tape with sense and antisense sequences of the *SGE1* gene. Obtaining the transformants for analysis was possible in both methodologies "*knockout* and *knockdown*". But in the first part of the work was to analyze the occurrence of *knockout* did not identify any strain with homologous recombination in the target region (*SGE1*) because all transformants analyzed showed ectopic integration and transformants with cassette integration *hph/gfp* perfectly issued the green fluorescence. Taking into consideration the difficulties for the occurrence of homologous recombination, it is necessary observations in some ways. In the second part of this work we were isolated 120 transformants integration of the cassette for silencing via RNA interfência, in which only 13 were selected for analysis, and presented different morphological characteristics like radial size of the colonies, pigmentation and sporulation capacity, and Different relative expression levels observed before and after the mitotic stability test, of these, three (T2-30%; T4-27% e T7-47%) showed significant reduction in levels of relative expression of transcripts of the *SGE1* gene indicating gene silencing. In the analysis of silencing by the pathogenicity test the selected transformants (T4 and T11), have achieved the rhizome and pseudostem of banana plants inoculated, but when compared to the wild type *F. oxysporum cubense* they managed to induce the symptoms of the disease in banana more slowly. Given these results, we can conclude that the RNAi mechanism is present and active in *F. oxysporum cubense*, proving to be an effective technique, opening new avenues for the development of mechanisms that block or reduce the pathogen action as well as functionally explore genomic data.

Keywords: gene silencing, *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, *SGE1*.

1 LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Sequências de oligonucleotídeos utilizados neste estudo.....	64
---	----

2 LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1 - Esquema representando os cassetes utilizados para recombinação homóloga do gene *SGE1* em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.....42
- Figura 2 - Esquema para confirmação de transformantes com recombinação homóloga ou integração ectópica.....44
- Figura 3 - Imagem de alguns dos 173 transformantes e da linhagem selvagem (controle) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.....46
- Figura 4 - Imagem de micélios e esporos do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* selvagem e linhagem transformante com cassete *hph/gfp*.....47
- Figura 5 - Caracterização molecular dos transformantes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* para análise da ocorrência de recombinação homóloga ou integração ectópica utilizando *primers* 1 e 2 referentes a região interna do *SGE1* e da região do *hph*.....48

CAPÍTULO II

- Figura 1 - Esquema representando o cassete construído para o silenciamento dos transcritos gerados pelo gene *SGE1* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* via RNAi.....60
- Figura 2 - Esquema para caracterização molecular das linhagens selecionadas, utilizando a técnica de PCR quantitativo em Tempo Real – RT-qPCR.....64
- Figura 3 - Escala de descrição do índice dos sintomas nas folhas conforme Mak e colaboradores (2004).....65
- Figura 4 - Escala de descrição do índice de descoloração do rizoma segundo Mak e colaboradores (2004).....65
- Figura 5 - Imagem dos transformantes com integração do cassete para silenciamento do gene *SGE1* via dsRNA *harpin*.67
- Figura 6 - PCR com os 13 transformantes68

Figura 7 - Imagens da linhagem selvagem e dos 13 transformantes de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> contendo o cassete para silenciamento via RNAi.	68
Figura 8 - Influência do silenciamento na conidiogênese.....	69
Figura 9 - Quantificação de RNA e amplificação por RT-PCR com material de antes e depois do teste de estabilidade mitótica.....	69
Figura 10 - Diagrama do nível de expressão relativa de dsRNA e do silenciamento do gene <i>SGE1</i> antes e depois do teste de estabilidade mitótica.....	70
Figura 11 - Imagem das bananeiras após 20 dias de inoculação.	71
Figura 12 - Imagens das bananeiras com 25 dias de inoculação.....	72
Figura 13 - Bananeiras inoculadas com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> após 30 dias de inoculação.....	72
Figura 14 - Imagem dos sintomas no rizoma das bananeiras.....	73
Figura 15 - Amplificação por PCR dos genes <i>SGE1</i> e <i>hph</i> nos transformantes isolados das bananeiras.....	73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	16
2.1 Importância da bananicultura	16
2.2 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	16
2.3 Silenciamento Gênico.....	20
2.3.1 Silenciamento por meio de <i>Knockout</i> de gene.....	21
2.3.2 Silenciamento via RNA de interferência (<i>Knockdown</i>)	23
2.4 Gene <i>SGE1</i>	26
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4 REFERÊNCIAS	30
CAPITULO I.....	37
1 INTRODUÇÃO.....	38
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.1 Micro-organismos e Condições de Cultivo	41
2.2 Cassetes utilizados para <i>Knockout</i> do gene <i>SGE1</i> por recombinação homóloga	41
2.3 Transformação genética de <i>F. oxysporum cubense</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i> – ATMT42	41
2.4 Caracterização dos transformantes de <i>F. oxysporum cubense</i>	43
2.4.1 Isolamento de DNA e análise de transformantes via PCR	43
2.4.2 Detecção da proteína reporter GFP via Microscopia de fluorescência	45
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4 CONCLUSÃO.....	51
5 REFERÊNCIAS	52
CAPITULO II.....	56
1 INTRODUÇÃO.....	57
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1 Micro-organismos e Condições de Cultivo	59
2.2 Construção do vetor binário para silenciamento do gene <i>SGE1</i> de <i>F. oxysporum cubense</i> por RNA de interferência (<i>knockdown</i>).....	59
2.3 Transformação genética de <i>F. oxysporum cubense</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i> – ATMT60	59
2.4 Caracterização dos transformantes de <i>F. oxysporum cubense</i>	61
2.4.1 Extração de DNA.....	61

2.4.2 Confirmação dos transformantes	62
2.4.3 Teste de Estabilidade Mitótica dos Transformantes	62
2.4.4 Análise do crescimento vegetativo e esporulação	62
2.4.5 Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR) ..	63
2.4.6 Teste de Patogenicidade	65
2.4.7 Reisolamento e Caracterização dos transformantes pós-inoculação	66
3 RESULTADOS	67
3.1 Caracterização Fenotípica e Molecular dos Transformantes	67
3.2 Avaliação do Nível de Silenciamento do Gene <i>SGEI</i> em Linhagens Transformantes de <i>F. oxysporum cubense</i>	69
3.3 Análise do Silenciamento do Gene <i>SGEI</i> na Patogenicidade e/ou Virulência	71
4 DISCUSSÃO	74
5 CONCLUSÃO	78
6 REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO GERAL

O silenciamento gênico é considerado uma importante ferramenta para desvendar atividades funcionais de genes que possam estar envolvidos na reprodução, no desenvolvimento, na patogenicidade e/ou virulência em diversos organismos, principalmente em micro-organismos patogênicos. Alguns fungos fitopatogênicos no decorrer da história da agricultura vêm demonstrando uma ampla diversidade, e dentre eles está o fungo filamentoso *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder & Hansen (*Foc*), agente causal da doença mal-do-Panamá.

O *Foc* inviabiliza o plantio de bananeiras uma das culturas de maior importância para o Brasil e o mundo, acarretando enorme redução na bananicultura e prejuízos consideráveis à economia e a sociedade, principalmente por ser bastante destrutivo, sendo capaz de persistir no solo por longos períodos e ser de difícil controle químico, biológico, cultural ou mesmo genético (PLOETZ, 1993; PLOETZ & PEGG, 1997; TRINDADE *et al.*, 2004). A variabilidade patogênica dentro do *Foc* levou a sua subdivisão em quatro raças (R1, R2, R3, TR4 e STR4), as raças R1, R2, ST4 e TR4 são patogênicas a bananeiras, enquanto a raça 3 (R3) afeta *Heliconia* spp..

Os avanços nas técnicas de sequenciamento e a redução de preço para obtenção de genomas completos e transcriptomas, permitiu um aumento no número de sequências relacionadas a fungos fitopatogênicos disponíveis, auxiliando na identificação dos genes envolvidos na patogenicidade e/ou virulência e no desenvolvimento do fungo. No qual, as informações poderão ser aplicadas em futuras pesquisas com intuito de gerar dados sobre o modo de ação na patogenicidade, contribuindo como uma importante ferramenta para desenvolver formas de controle da doença (HARDY *et al.*, 2010).

Entre as mais diversas estratégias empregadas para estudo da função de genes, destacam-se o silenciamento por recombinação homóloga de genes alvos (*knockout*), que permite uma análise eficaz da função gênica, e a técnica de silenciamento por RNAi (RNA de interferência - *knockdown*) ferramenta importante quando o gene alvo está presente em multicópias e quando a ausência do gene é letal para o organismo (KÜCK & HOFF, 2010).

O *knockout* é uma estratégia que possibilita a excisão por meio da recombinação homóloga ou a interrupção de genes, e desse modo pode avaliar a ausência ou não da patogenicidade. Hoje diversos genes já tiveram suas atividades definidas por meio dessa estratégia. Um exemplo realizado em *F. oxysporum* é a pesquisa de Michielse *et al.* (2009b) em *F. oxysporum* f. sp. *lycopercisi* (*Fol*) que conseguiu identificar a função do gene chamado

SGE1, responsável pela mudança da fase não patogênica para patogênica, mostrando que esse gene tem importante função durante o desenvolvimento parasitário no interior da planta.

Já o *knockdown* é uma metodologia baseada no silenciamento dencadeado a partir de RNAs dupla fita (dsRNA) altamente específicos ao RNA mensageiro alvo, que promove a redução do nível de transcritos. Nos últimos anos vem sendo uma das estratégias mais empregadas, dada às vantagens em relação ao *knockout* (TIERNEY & LAMOUR, 2005).

Ambas as técnicas cada qual com suas vantagens e limitações, colaboram significativamente, com a determinação do papel funcional dos diversos genes que são fundamentais para o desenvolvimento da doença, permitindo então, traçar estratégias de controle voltadas para a inibição gene-específico sem uso de agrotóxico e sem prejudicar micro-organismos endofíticos benéficos à planta. Deste modo, este trabalho tem como principal objetivo determinar o papel funcional do gene *SGE1* em *F. oxysporum* f. sp. *cubense* por meio de *knockout* e *knockdown*.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Importância da bananicultura

No mundo todo cultivares de bananeiras são afetadas por problemas fitossanitários considerados de grande importância econômica, como a sigatoka-negra, broca da bananeira e nematóides, porém, o que constitui maior preocupação é o mal-do-Panamá causado pelo *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), devido a ameaça de destruição que representa para bananicultura (PLOETZ, 1993; MATOS *et al.*, 2012).

O *Foc* vem causando durante muitos anos graves impactos ao setor da bananicultura, prejudicando o setor da economia dos países que cultivam a banana (*Musa ssp.*) como produto de exportação e consumo no mercado interno. Além de gerar impactos, nutricional e social, afetando muitas pessoas que tem a banana inclusa na sua dieta, isso porque a banana possui importantes propriedades nutricionais, e também afeta a permanência dos trabalhadores no campo, os quais tiram da plantação de bananeiras a renda familiar (PLOETZ, 2005).

No Brasil e no exterior a bananicultura apresenta crescimentos econômicos, com um aumento na produtividade mundial de banana na média de 45% nos últimos anos, sendo que, o Brasil alcançou um aumento de área cultivada de 49% nos últimos 30 anos (NETO & GUIMARÃES, 2011). As variedades mais difundidas no país são as bananas do tipo Prata (AAB): Prata, Pacovan e Prata Anã; Maçã (AAB); Mysore (AAB); Terra (AAB): Terra e D'Angola; e as do tipo d'água ou Cavendish (AAA): Nanica, Nanicão e Grande Naine, preferidas pelo mercado internacional (TRINDADE *et al.*, 2004; DONATO *et al.*, 2006).

Economicamente, a bananicultura representa projeções de crescimento positivo na produção e exportação no Brasil, pois o ministério da agricultura constatou um aumento de 33% em 2011 na exportação de banana juntamente com outras duas frutas, e espera cerca de 0,4% de aumento ao ano na produção de banana, alcançando até 2021 um crescimento de 24,5% (PROJEÇÕES DO AGRONEGÓCIO BRASIL 2011/12 a 2021/22). Portanto, a falta de estratégias de controle de doenças, como a mal-do-Panamá e outras causadas por fitopatógenos, pode gerar enormes prejuízos com perdas na produção e exportação, devido à redução considerável da produtividade de culturas de bananeiras. Fazendo-se assim, essencial o controle dos patógenos e o conhecimento dos seus mecanismos de patogenicidade.

2.2 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

O fitopatógeno *Foc* é encontrado habitando solo das mais diversas regiões do mundo, especialmente em locais de climas tropical e subtropical, acredita-se que o primeiro relato da

doença tenha ocorrido por volta de 1874, na Austrália, prejudicando a cultivar Maçã considerada atualmente a mais suscetível. Somente em 1904 surgiram os primeiros prejuízos importantes relatados no Panamá, o que provavelmente justifica o nome da doença (CORDEIRO & MATOS, 2003; PLOETZ, 2005). A identificação da doença no Brasil ocorreu pela primeira vez em 1930, no município de Piracicaba, SP, também na cultivar Maçã, causando em pouco tempo a destruição da bananicultura daquele município, e posteriormente ocorreu à disseminação por todo o território nacional (CORDEIRO & MATOS, 2003).

A disseminação do mal-do-Panamá pode ocorrer por meio do contato das raízes de plantas sadias com esporos liberados por plantas doentes, pelo uso de material de plantio contaminado; esporos do fungo também podem ser transportados por água de irrigação, de drenagem, de inundação, assim como, pelo homem, por animais, pelo vento e equipamentos, o que demonstra uma alta facilidade de contaminação por esse fitopatógeno (TRINDADE *et al.*, 2004).

Segundo Summerell e Leslie (2003), não se conhece o estágio sexuado desse fitopatógeno. Os esporos assexuados do *Foc* podem ser encontrados nas duas principais formas estruturais de conídios apresentadas pelo gênero *Fusarium*, como macroconídios e microconídios. Os microconídios são unicelulares ovais, hialinos e uninucleados; os macroconídios mais comuns são fusiformes, falcados e multicelulares, mas cada célula tem somente um núcleo. Todos os núcleos de um macroconídio e microconídio são descendentes mitóticos de um mesmo núcleo progenitor e são, portanto, geneticamente idênticos (PUHALLA, 1981; MICHIELSE *et al.*, 2009b). E podem ser encontrados também na forma estrutural de resistência denominada clamidósporos (PUHALLA, 1981; MICHIELSE *et al.*, 2009b), estrutura que possibilita a sobrevivência em condições extremas por vários anos, cerca de 20 a 50 anos, por tanto, o solo fica impróprio para o cultivo de bananeiras por longos períodos (DALY, 2006; MARTINS & FURLANETO, 2008, MICHIELSE *et al.*, 2009b).

Esse fitopatógeno na ausência do hospedeiro suscetível sobrevive em restos culturais com seus diferentes tipos de conídios (MICHEREFF *et al.*, 2005). Outra hipótese de sobrevivência foi sugerida por Cordeiro e Matos (2003), baseada no fato de existirem no solo linhagens não patogênicas de *F. oxysporum*, as quais são saprófitas morfologicamente idênticas a *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, sendo provável a possibilidade de que linhagens não patogênicas sejam capazes de formarem heterocários com linhagens patogênicas. De maneira que, os núcleos da forma patogênica persistem no micélio de crescimento saprofítico, voltando a atuar quando na presença da planta hospedeira.

Na presença do hospedeiro, os exsudatos radiculares estimulam a germinação dos esporos, e o micélio fúngico cresce em direção à raiz seguindo o gradiente de exsudatos radiculares. Então, o fungo atinge a superfície da raiz causando o processo inicial da infecção, produzindo uma grande variedade de substâncias enzimáticas que auxiliam na penetração do fitopatógeno (MICHEREFF *et al.*, 2005; MICHELSE *et al.*, 2009b). A infecção pode ocorrer somente pela penetração do *Foc* nas raízes secundárias, progredindo pelo xilema até o rizoma e pseudocaule, podendo atingir o pecíolo, no entanto, não atinge os frutos (PLOETZ, 1997; MICHEREFF *et al.*, 2005; MATOS *et al.*, 2012).

Durante o processo de infecção, a presença do fitopatógeno no hospedeiro ativa a produção de lignina, substância do sistema de defesa da planta que visa fortalecer a membrana vegetal evitando sua instalação. E se mesmo assim o fitopatógeno conseguir se instalar, um segundo mecanismo é ativado, a fim de impedir a proliferação desse patógeno que também produz substâncias inibidoras, as quais tentam desarmar o sistema de defesa do hospedeiro. Caso ocorra uma eficiente e específica interação entre as moléculas desses organismos, a infecção será interrompida, caso contrário à infecção será estabelecida (CORSINO-SANTOS *et al.*, 2003). Nos genótipos de bananeiras resistentes, a infecção é paralisada pela formação de géis (lignina) e tiloses nos vasos do xilema, enquanto nas cultivares suscetíveis as colonizações do vaso continua estendendo-se aos tecidos parenquimatosos anexos. Em estádios mais avançados da doença, ocorre a colonização do tecido parenquimatoso adjacente, com a produção de elevada quantidade de conídios e clamidósporos (STOVER, 1972 apud de SILVA, 2009).

A instalação do fitopatógeno e conseqüentemente da doença, levam de duas a três semanas para progredir na planta (RODRIGUEZ *et al.*, 2011), causando a obstrução do sistema vascular limitando o transporte de nutrientes minerais e água absorvidos pelas raízes para a parte aérea da planta, gerando sintomas externos como o amarelecimento do limbo das folhas mais velhas, progredindo para as mais novas. Com o avanço, as folhas murcham, secam e quebram o pecíolo junto à inserção do pseudocaule e ficam pendentes, conferindo um aspecto de guarda-chuva fechado, enquanto as folhas mais novas permanecem eretas. Observam-se também rachaduras no pseudocaule próximo ao solo. E os cachos apresentam-se raquíticos e com maturação desuniforme e prematura (TRINDADE *et al.*, 2004; MATOS *et al.*, 2012).

E quanto aos sintomas internos encontrados por meio de cortes longitudinais e transversais destacam-se, a descoloração do câmbio do rizoma e a descoloração dos vasos em distribuição periférica no pseudocaule. (CORDEIRO e MATOS, 2003; TRINDADE *et al.*,

2004). De acordo com Michereff *et al.* (2005), os sintomas de murcha e podridão são mais severos em condições quentes e secas, embora o crescimento micelial e a penetração das raízes por esse fungo sejam favorecidos por condições úmidas.

Devido às peculiaridades dessa doença o controle por meio de fungicidas é inviável. Assim, com o intuito de minimizar os prejuízos, o uso de cultivares resistentes é uma alternativa ao método de controle químico, porém, sua eficiência depende do surgimento de novas raças do patógeno (TRINDADE *et al.*, 2004).

A variabilidade patogênica dentro do *Foc* levou a sua subdivisão em raças, no qual o termo raça é utilizado para descrever a patogenicidade de diferentes linhagens desse fitopatógeno a uma gama de cultivares de bananeiras específicas (GROENEWALD *et al.*, 2006).

As raças R1, R2 e R4 são patogênicas a bananeiras, enquanto a raça 3 (R3) afeta *Heliconia* spp., um parente próximo da bananeira (PLOETZ, 1993). A raça 1 (R1) é patogênica a cultivares de bananeiras do tipo Gros Michel (AAA), também ataca variedades Lady Finger (AAB) e Silk (AAB), já a raça 2 (R2) afeta variedades de Bluggoe (ABB) (DALLY, 2006). A raça 4 (R4) é a mais destrutiva capaz de atacar Cavendish (AAA) que é resistente a R1 e R2 (DITA *et al.*, 2010).

Na R4 foram reconhecidas linhagens tropicais (TR4) e subtropicais (STR4), sendo a linhagem TR4 a forma mais virulenta do patógeno, capaz de causar doenças em bananeiras crescendo em regiões tropicais e subtropicais, enquanto que, a STR4 geralmente só causa doença em plantas que crescem em condições de estresse abiótico (baixa temperatura, escassez da água e solos pobres) (DITA *et al.*, 2010; DALY, 2006).

O possível surgimento da R4 em regiões ainda não afetadas é de grande importância para as empresas exportadoras e para os pequenos produtores, visto que, as variedades de banana do subgrupo Cavendish são altamente suscetíveis à TR4, o que demonstra um alto risco de se repetir a epidemia histórica ocorrida entre 1940 e 1960, pois são estimados que mais de 80% das bananas cultivadas sejam suscetíveis à TR4, o que poderá gerar grande impacto negativo direto e indireto ao setor da bananicultura (MATOS *et al.*, 2012).

Um dos maiores obstáculos para a manutenção da resistência da bananeira consiste na capacidade do patógeno apresentar alto potencial evolutivo e persistência no solo, mostrando que pode ser apenas uma questão de tempo até que o agente fitopatogênico possa adaptar-se e ultrapassar a resistência recém-implantada, fazendo dele uma preocupação constante (MATOS *et al.*, 2012).

É importante conhecer as raças predominantes em um determinado local, sua epidemiologia e informações genéticas que venham a contribuir e facilitar a solução de tal problema (SILVA, 2009).

Em 2010 um estudo comparativo dos genomas de espécies de *Fusarium*, destacou a existência de linhagens com cromossomos específicos enriquecidos por elementos transponíveis e que codificam genes relacionados com a patogenicidade. Dentre as espécies analisadas está o *F. oxysporum* representado pelo *Fol*, patógeno de tomateiro, que possui 15 cromossomos, sendo que, o menor cromossomo '14' é o responsável pela patogenicidade do *Fol*, uma vez que, ele está ausente nas linhagens de *Fusarium* não patogênicas e, contém os genes de pequenas proteínas secretadas no xilema. A mobilidade do pequeno cromossomo entre linhagens de *F. oxysporum* correlacionadas pode explicar o surgimento de novos patógenos. Além disso, a presença de um cromossomo extra pode aumentar ainda mais a virulência (MA, *et al.*, 2010).

Na análise comparativa do transcriptoma foi identificado um conjunto único de ESTs para cada raça do *Foc* (689 para R1, 974 para R2, 296 para SR4 e 555 para TR4), indicando a existência de excelentes candidatos para o diagnóstico de análises futuras em estudos de interação planta-patógenos (DITA *et al.*, 2013). A análise comparativa dos genomas completos e transcriptoma de R1 e TR4 revelam que grande número de genes putativamente associados à virulência foram identificados em ambos os genomas de *Foc*, incluindo genes supostamente envolvidos na fixação a raiz, degradação celular, detoxificação, transportes, biossíntese de metabólitos secundários e transduções de sinal. Contudo, a grande diferença entre as raças R1 e TR4, é que na TR4 foi verificada a expansão de famílias de genes transportadores e fatores de transcrição relacionados ao transporte de toxinas e nutrientes, o que pode facilitar a capacidade de TR4 em adaptar-se a hospedeiros em diferentes ambientes e contribuir para a patogenicidade (GUO *et al.*, 2014)

Estas importantes informações sobre o genoma e transcriptoma contribuem ainda mais com a aplicação de estratégias de silenciamento gênico.

2.3 Silenciamento Gênico

As técnicas de silenciamento representam uma ferramenta poderosa que estabelece uma relação direta com a função de determinados genes de interesse (SHAFRAN *et al.*, 2008). Projetos de sequenciamento do genoma auxiliaram na identificação de um grande número de possíveis genes de diversos organismos, inclusive de fungos, os quais necessitam

ter seu papel funcional analisado e definido (BHADAURIA *et al.*, 2009). Para solucionar este problema uma série de técnicas tem sido desenvolvida ao longo dos últimos anos, com o objetivo de permitir a análise funcional de genes envolvidos na geração de metabólitos de interesse e, fatores de transcrição que atuam na patogenicidade ou virulência de fungos de importância para a agricultura (HARDY *et al.*, 2010).

O silenciamento de genes pode ser realizado por meio da interrupção (*gene disruption*) ou remoção/substituição de um gene alvo (*gene replacement*) estratégia conhecida como *knockout*, e por meio de RNA de interferência (RNAi) chamada também de *Knockdown* (TIERNEY & LAMOUR, 2005).

Atualmente a literatura vem mostrando um número crescente na aplicação das estratégias *Knockdown* e *Knockout* de genes em diversos fungos filamentosos fitopatogênicos. Liu *et al.* (2010) utilizou *Knockdown* para verificar a expressão da enzima quitosanase e o efeito sobre a patogenicidade do fitopatógeno *Fusarium solani*. Já Gronover *et al.* (2004) mostrou que houve uma drástica redução ou perda total da patogenicidade por meio de *knockout* dos genes relacionados à proteína G, MAPKinase e adenilato ciclase em *Botrytis cinera*. Gardiner *et al.* (2012), também utilizou o método de *knockout* na análise de genes adquiridos horizontalmente, que demonstraram afetar significativamente a virulência de *F. pseudograminearum* em cereais.

2.3.1 Silenciamento por meio de *Knockout* de gene

É uma estratégia eficaz na determinação da função gênica de fitopatógenos, pode ser realizada através dos processos de substituição e interrupção de genes, sendo então capaz de gerar mutantes por deleção devido à substituição gênica em loci específicos ou produzir mutantes por meio da inserção de uma sequência de interesse no gene alvo, resultando na interrupção e inativação gênica (BHADAURIA *et al.*, 2009).

A estratégia de recombinação homóloga foi realizada por Scherer e Davys (1979) primeiramente em levedura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), através do processo de interrupção de um gene específico por inserção de um marcador de seleção dentro da sua região codificadora, gerando um alelo nulo desse gene. E atualmente diversos trabalhos científicos estão fazendo uso do método de *Knockout* de genes. Michielse *et al.* (2009b), utilizou a recombinação homóloga para avaliar o envolvimento do gene *SGE1* na patogenicidade do *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Colot *et al.* (2006) aplicou na análise da função do fator de transcrição em *Neurospora reveals*. Brachmann e colaboradores

(2004) também geraram mutantes de substituição de genes em *Ustilago maydis*. Além de Michielse *et al.*, 2011 em *Botrytis cinerea* e Jonkers *et al.* (2012) em *Fusarium graminearum*.

A construção de cassetes contendo um gene de resistência a antibiótico, flanqueado por sequências homólogas ao gene alvo, são necessários em experimentos de *knockout* de genes por meio da recombinação homóloga. Estes cassetes podem ser obtidos pelos métodos de clonagem, mas, requerem vários passos de ligação/clonagem, sendo considerado um procedimento demorado e insuficiente (ABE *et al.*, 2005). A dependência de enzimas de restrição complica o processo de construção dos cassetes e já foi considerada uma etapa limitante aos trabalhos com silenciamento utilizando recombinação homóloga.

Alternativas para a construção de cassetes foram desenvolvidas nos últimos anos como a estratégia de construção de vetores independentes de sítios para enzimas de restrição em um único passo de clonagem, permitindo total liberdade na escolha dos locais de substituição no genoma (FRADSEN *et al.*, 2008). Já o sistema de clonagem *Gateway*, que explora precisão do sítio-específico de recombinação do sistema utilizado pelos bacteriófagos, permite que seja realizada a construção de vetores com cassetes para diversos fins, sem a utilização de enzimas de restrição (SHAFRAN *et al.*, 2008). Abe *et al.* (2005) utilizou a tecnologia *Gateway* no desenvolvimento de um vetor, empregado na interrupção de um gene em *Neurospora crassa*, demonstrando que esta tecnologia pode facilitar a construção de cassetes para o *Knockout* de genes em fungos. Shafran *et al.* (2008) também desenvolveu duas ferramentas para a genômica funcional (pTroja para o *knockdown* e Blast Gene para o *Knockout*) com base no sistema *Gateway* para serem empregadas em fungos filamentosos.

O desenvolvimento de bons cassetes pode dar mais vantagens para a ocorrência do *knockout* de genes, devido a sua propensão com uma região específica no genoma (SHAFRAN *et al.*, 2008; BHADOURIA *et al.*, 2009), porém, eventos de integração ectópica são comuns na maioria dos organismos, inclusive em fungos filamentosos (MIAO *et al.*, 1995). Um fator limitante importante na ocorrência de recombinação homóloga é a presença da proteína Ku, a qual forma um heterodímero entre as subunidades Ku70 e Ku80, atuando no processo de recombinação de sequências heterólogas de DNA, fazendo com que o DNA exógeno possa ser integrado em qualquer parte do genoma, mesmo transportando grandes sequências de homologia a uma determinada região alvo (NINOMIYA *et al.*, 2004; MALAVAZI, 2007; CARVALHO *et al.*, 2010).

Na ausência da proteína Ku70/80 a recombinação homóloga ocorre com uma frequência de até 100% em linhagens mutantes de *Neurospora crassa* e *Aspergillus niger* (NINOMIYA *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2010).

Outro fator importante para obtenção de uma recombinação homóloga satisfatória é o tamanho das sequências de recombinação, o qual varia entre as espécies de fungos, onde uma maior eficiência de recombinação homóloga pode ser obtida por meio do aumento do comprimento das sequências homólogas flanqueando a marca de seleção (BHADAURIA *et al.*, 2009).

2.3.2 Silenciamento via RNA de interferência (*Knockdown*)

A estratégia de interferência por RNA (RNAi), também conhecida por *Knockdown*, é um mecanismo responsável pelo silenciamento gênico pós-transcricional (*post transcription gene silencing* - PTGS) que atua sobre o RNA mensageiro (mRNA), diminuindo de forma drástica os transcritos-alvos (FRANÇA *et al.*, 2010). É uma ferramenta considerada poderosa para a área da pesquisa, devido a sua simplicidade, rapidez e precisão (RAPPEYE *et al.*, 2004; SHAFRAN *et al.*, 2008; FRANÇA *et al.*, 2010).

O silenciamento de genes por RNAi foi descrito, primeiramente, na planta petúnia (NAPOLI *et al.*, 1990), no fungo *Neurospora crassa* (ROMANO & MACINO, 1992) e posteriormente foi melhor elucidado no nematóide *Caenorhabditis elegans* por Fire e colaboradores (1998). Onde descobriram que a alta eficiência do silenciamento era devido a um RNA dupla fita (dsRNA - *double stranded RNA*) capaz de interromper a expressão de um determinado gene (FIRE *et al.*, 1998). Pois, a molécula de dsRNA que, ao ser incorporada a uma enzima e a um complexo protéico, se liga a uma sequência de nucleotídeos complementar localizada no mRNA-alvo, ocasionando assim, o silenciamento por inibição da tradução e/ou degradação do mRNA (MEISTER & TUSCHL, 2004; FRANÇA *et al.*, 2010). Diante das primeiras descrições, atualmente sabe-se que é possível silenciar qualquer gene por meio de RNA de interferência em diversos organismos eucariontes, assim como, em fungos onde o processo de RNAi é denominado *quelling* (COGONI & MARCINO, 1999; TIJSTERMAN *et al.*, 2002; BARBOSA & LIN, 2004).

Segundo Cogoni & Macino (1999), o RNAi também atua como silenciamento gênico transcricional (*transcription gene silencing* – TGS), pois dsRNAs estão também envolvidos com a manutenção da condensação de regiões da cromatina, e assim, suprimem a transcrição nas proximidades dessas regiões, fato também observado por Simmer *et al.* (2010). A diferença entre os dois mecanismos PTGS e TGS está na homologia das sequências, onde PTGS requer homologia entre sequências de genes codificadoras de proteínas (mRNA), enquanto que TGS requer homologia entre os promotores (COGONI & MACINO, 1999). Tais

mecanismos de silenciamento foram constatados em plantas e outros organismos, porém em fungos, o silenciamento revelou um cenário mais complexo que compreende diferentes mecanismos de silenciamento de genes (ROMANO & MACINO, 1992; COGONI & MACINO, 1999; COGONI, 2001).

A função natural dos RNAi está relacionada com a eliminação de RNAs mensageiros anômalos e na defesa do organismo contra transposons e vírus (KETTING *et al.*, 1999; BAULCOMBE, 2004). Durante o processo de silenciamento por interferência do RNA, o dsRNA é clivado em fragmentos com cerca de 21 a 23 nucleotídeos pela nuclease Dicer (ZAMORE *et al.*, 2000), gerando pequenos fragmentos de dsRNAs, conhecidos como *small interfering RNAs* (siRNAs), os quais correspondem às fitas senso e antisenso do RNA alvo, que se associam a proteínas celulares formando um complexo multimérico chamado RISC (*RNA Interference Specificity Complex*) (ELBASHIR *et al.*, 2000; NYKANEN *et al.*, 2001). Uma helicase presente no complexo abre a dupla-fita dos siRNAs, de forma que, a fita antisenso do duplex guia o complexo até o mRNA alvo (NYKANEN *et al.*, 2001). Uma endorribonuclease, também presente no complexo, cliva o referido mRNA degradando-o (ELBASHIR *et al.*, 2000; MARTINEZ *et al.*, 2002).

Segundo Meister & Tuschl (2004), os pequenos RNAs podem ser classificados de acordo com sua origem e função em pelo menos três categorias: miRNAs (*microRNAs*), siRNAs (*small interfering RNAs*) e rasiRNAs (*repeat-associated-siRNAs*). Os miRNAs representam pequenos dsRNAs endógenos, com aproximadamente 22 nucleotídeos, cuja principal função é atuar como silenciadores pós-transcricionais, e são hoje reconhecidos como reguladores fundamentais da expressão gênica em plantas e animais. Os siRNA com cerca de 19 a 30 pb são moléculas sintetizadas por longos dsRNA, que pareiam as sequências complementares ao RNA mensageiro alvo (MEISTER & TUSCHL, 2004). Já os rasiRNAs são de aproximadamente 23 a 26 nucleotídeos de comprimento, e atuam a nível transcricional (MALONE & HANNON, 2009).

Diante das classificações e características dos dsRNAs são determinados também diferentes complexos efetores, onde os siRNA, miRNA e rasiRNA são associados a moléculas chamadas de ribonucleoproteínas (RNPs), como o RISC, miRNP e RITs. Os RNPs funcionais contêm apenas *single-stranded* de siRNAs e miRNAs. No qual, é atribuído ao complexo efector RISC a associação aos siRNA, e ao complexo efector miRNP são os miRNA. O complexo efector RITs associa-se a rasiRNA para atuar no processo de condensação da cromatina (MEISTER & TUSCHL, 2004). O RISC é um complexo responsável pelo processamento dos dsRNAs exógenos, e contém proteínas Argonautas com domínio PAZ e

PIWI (BARTEL, 2004), as quais parecem garantir a especificidade do RISC, e junto com outras proteínas e enzimas presentes no complexo, determinam a resposta a um siRNA particular (MEISTER & TUSCHL, 2004; BARROS, 2006).

Os shRNAs (*short hairpin RNAs*), construídos para apresentar uma estrutura semelhante aos miRNAs, podem ser sintetizados exogenamente e introduzidos prontos na célula ou transcritos dentro da própria célula, a partir de vetores que codificam o shRNA junto a um promotor da RNA polimerase III, resultando em silenciamento estável de longa duração na célula (PADDISON *et al.*, 2002).

Bhadoria *et al.* (2009) cita três diferentes vetores construídos para silenciamento gênico via RNAi: o primeiro contém um hpRNAi convencional, usando DNA espaçador. O segundo vetor contém uma região espaçadora formada por íntrons (ihpRNAi). E o terceiro é um vetor composto por dois promotores, resultando na expressão de sequências quiméricas de dsRNA. As construções de vetores expressando hpRNA ou ihpRNA são métodos prevalentes e mais eficientes para induzir RNAi em fungos, quando comparados ao vetor com expressão de sequências quiméricas (BHADARIA *et al.*, 2009).

Atualmente, a tecnologia de clonagem usando o sistema Gateway para promover a construção de cassetes para silenciamento gênico em grande escala tanto para leveduras, quanto para fungos filamentosos vem sendo utilizada em *knockdown* (SHAFRAN *et al.*, 2008; NAKAYASHIKI & NGUYEN, 2008). Recentemente foi desenvolvido por Shafran e colaboradores (2008) o vetor pTroya (vetor para RNAi), o qual estabelece um alto rendimento no silenciamento gênico, assim como, o vetor pFANTAi4 desenvolvido por Krajaejun e colaboradores (2007), que permite o co-silenciamento do gene repórter GFP, e tem sido utilizado com a vantagem de auxiliar na seleção prévia dos transformantes por meio de microscopia de fluorescência (KRAJAEJUN *et al.*, 2007).

O grande potencial do silenciamento via *knockdown* é devido às vantagens, como a possibilidade de investigar a função via supressão de um gene de determinado fenótipo, sem a necessidade de silenciá-lo completamente; o silenciamento de genes em núcleos dicarióticos e genes multicópia; entre outras vantagens, resultando em silenciamento gênico bem sucedido, de uma grande variedade de genes codificadores de proteínas, permitindo obter importantes informações sobre a função desses genes e respectivas proteínas (FRANÇA *et al.*, 2010).

2.4 Gene *SGE1*

A expressão de genes envolvidos na adaptação de um hospedeiro e síntese de produtos relacionados com a patogenicidade como, metabólitos secundários tóxicos, proteínas efetoras de patogenicidade e/ou enzimas extracelulares, estão sob forte regulação para assegurar uma infecção bem sucedida e a sobrevivência do fitopatógeno (JONKERS, *et al.*, 2012).

Os fungos *F. oxysporum* possuem a capacidade de modular a sua patogenicidade por meio de pequenas proteínas, que podem atuar tanto na virulência ou como fatores de avirulência (MICHIELSE *et al.*, 2009a; JONKERS, *et al.*, 2012). Recentemente, o gene *SGE1* (*SIX Gene Expression 1*) considerado essencial para a patogenicidade, foi identificado e analisado em *F. oxysporum* f. sp. *lycopercisi* (*Fol*) como um regulador transcricional, expressando uma proteína com o mesmo nome (*Sge1*) que apresenta função de fator de transcrição (MICHIELSE *et al.*, 2009b). Com uma ORF (*Open Reading Frame*) que não contém íntrons, a proteína *Sge1* contém 330 aminoácidos, resultando em uma proteína nuclear necessária para a expressão de genes que codificam pequenas proteínas de virulência, que são secretadas durante a infecção no hospedeiro (MICHIELSE *et al.*, 2009a; MICHIELSE *et al.*, 2009b).

O gene *SGE1* apresenta homologia com outros genes reguladores transcricionais como *WOR1* (*White Opaque Regulator 1*) em *Cândida albicans* e *RYPI* (*Required for Yeast phase Growth*) em *Histoplasma capsulatum*, no qual, seus transcritos são membros de uma família de proteínas reguladoras em fungos (HUANG *et al.*, 2006; NGUYEN & SIL, 2008; MICHIELSE *et al.*, 2009b). Por exemplo, a proteína *Gti1* em *Schizosaccharomyces pombe*, que atua na regulação da absorção de gluconato na ausência de glicose (CASPARI, 1997), assim como, as proteínas *Ryp1* e *Wor1*, ambas envolvidas na regulação do dimorfismo, uma transição correlacionada com a capacidade de causar doença (NGUYEN & SIL, 2008; HUANG *et al.*, 2006), e a *Sge1* envolvida na regulação da transcrição dos genes que codificam as proteínas *Six*, que atuam na patogenicidade e virulência (MICHIELSE *et al.*, 2009b).

As proteínas *Wor1*, *Ryp1*, *Gti1* e *Sge1* tiveram suas sequências analisadas e mostraram que possuem um sítio de fosforilação conservado que interage com uma proteína quinase A (*Pka*). No qual, esse sítio é considerado essencial para a proteína *Sge1* funcionar adequadamente (MICHIELSE *et al.*, 2009b), e ele está presente em todas as proteínas desta família, considerando que o domínio N-terminal destas proteínas é sempre mais conservado do que o C-terminal (NGUYEN & SIL, 2008; MICHIELSE *et al.*, 2009b).

Jonkers e colaboradores (2012) mostram que proteínas de algumas espécies do gênero *Fusarium* como, *Sge1* - *F. oxysporum*, *Fv 09150* - *F. verticillioides*, *Fgp1* - *F. graminearum*, e *Fs 81912* - *F. solani*, fazem parte da família da *Wor1*, e apresentam uma grande divergência entre si. Porém, a principal conservação limita-se ao domínio N-terminal com similaridade de 64 a 90,5%, apresentando também um sítio de fosforilação conservado, contrastando com o domínio C-terminal que possui apenas 5,6 a 13,6% de similaridade entre as sequências de aminoácidos.

Pesquisas realizadas por Michielse *et al.* (2009b), utilizando isolados selvagens e mutantes para o gene *SGE1* do *F. oxysporum lycopersici*, indicam que o *SGE1* é envolvido quantitativamente na conidiogênese, mas não é considerado essencial para adequação de conídios, morfologia das colônias, utilização de fonte de carbono ou nas primeiras funções relacionadas à patogenicidade, tais como, colonização e penetração da raiz. No entanto, é necessário para o crescimento extensivo no interior das células das plantas, principalmente, no xilema, pois a proteína nuclear codificada pelo *SGE1* é necessária para a expressão de pequenas proteínas secretadas no xilema chamadas de *Six* (*Secreted in xylem*).

A família das proteínas *Six* é composta por pequenas proteínas efetoras como, *Six1* a *Six10*, secretadas durante o processo de infecção do xilema do hospedeiro (MICHIELSE *et al.*, 2009b; MA *et al.*, 2010; MELDRUM *et al.*, 2012). *Six1* ou *Avr3* e *Six3* ou *Avr2* foram analisadas no *Fol*, desempenhando fortemente função durante a virulência (REP *et al.*, 2004; HOUTERMAN *et al.*, 2007; VAN DER DOES *et al.*, 2008; MICHIELSE *et al.*, 2009b; STERGIPOULOS & WIT, 2009; MA *et al.*, 2010). *Six3* (*Avr2*) e *Six4* (*Avr1*) desempenham um papel na virulência, atuando no reconhecimento de proteínas de resistência da planta (HOUTERMAN *et al.*, 2007; HOUTERMAN *et al.*, 2008; STERGIPOULOS & WIT, 2009).

Já *Six2* e *Six5* também analisadas em *Fol* recebem uma baixa influência do gene *SGE1*, quando cultivado em meio sintético (MICHIELSE *et al.*, 2009b). Porém, os genes *SIX1*, *SIX2*, *SIX3*, e *SIX5* analisados quanto à supressão pela proteína *Sge1*, foram identificados como dependentes de *Sge1* para a sua expressão em contato com a planta hospedeira, e durante o crescimento em meio sintético (MICHIELSE *et al.*, 2009b). Da mesma forma, os genes *SIX6* e *SIX7* também foram identificados no genoma do *Fol*, atuando na virulência (MA *et al.*, 2010). Assim como no *Fol*, pesquisas realizadas com *Fusarium oxysporum cubense* (*Foc*) também puderam detectar três genes de patogenicidade (*SIX1*, *SIX7* e *SIX8*), homólogos aos genes *SIX* encontrados no *Fol* (MELDRUM *et al.*, 2012).

Ma e colaboradores (2010) constataram que os genes codificadores da família das proteínas *Six* estão localizados no pequeno cromossomo 14, e alguns são genes conservados em *Fol*. Tais genes podem estar relacionados com as *formae speciales* e as raças, pois o *SIX4* pode ser utilizado para a identificação da raça 1, enquanto que, os polimorfismos encontrados em *SIX3* podem ser explorados para diferenciar as raças 2 e 3 do *Fol* (LIEVENS *et al.*, 2009). Já no *Foc*, o gene *SIX1* foi encontrado em todas as raças, enquanto que, o *SIX7* e *SIX8* foram detectados somente na raça 4 (MELDRUM *et al.*, 2012). No entanto, os genes *SIX6* e *SIX7* encontrados em algumas *formae speciales* do *F. oxysporum*, sugerem que podem desempenhar um papel mais geral na patogenicidade (LIEVENS *et al.*, 2009). E recentemente Guo *et al.* (2014) realizou a comparação do genoma do *Foc* R1 e R4, constatando que nas duas raças o *SIX1* possui três cópias no genoma e *SIX6* apenas uma cópia, além desses dois genes foi identificado os *SIX2* e *SIX8* ambos com apenas uma cópia e estão presentes apenas na R4. Ao contrário de Meldrum *et al.* (2012), não foi constatado a presença do *SIX7* em nenhuma das raças, porém é excluída a possibilidade de erros na identificação, devido estes genes com excessão do *SIX1*, que provavelmente possui sequências conservadas em ambas as raças, possuírem apenas uma cópia, e não são identificados com muita frequência no genoma do *Foc*.

Atualmente, ainda não se tem informações se o aumento da expressão do *SGE1* pode fazer com que ele conduza sozinho, a expressão de todos os genes *SIX*; Se a proteína *Sge1* influencia a expressão dos genes *SIX* direta ou indiretamente, por exemplo, na atuação com a participação de outros fatores de transcrição; E nem como a expressão do *SGE1* em si é regulada (MICHIELSE *et al.*, 2009b). No entanto, sabe-se que o gene *SGE1* desempenha um papel importante durante o crescimento parasitário, levando o hospedeiro a desenvolver os sintomas da infecção.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Obter transformantes e analisar o efeito do silenciamento do gene *SGE1* na patogenicidade e virulência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter transformantes com silenciamento do gene *SGE1* em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* por meio de recombinação homóloga (*Knockout*) e RNA de interferência (*Knockdown*).
- Analisar os transformantes obtidos por recombinação homóloga quanto ao tipo de integração (homóloga ou ectópica) e analisar a redução dos transcritos dos transformantes obtidos via RNAi.
- Analisar os transformantes quanto à patogenicidade e/ou virulência.

4 REFERÊNCIAS

1. ABE, A.; ELEGADO, E. B.; SONE, T. Construction of pDEST_R, a GATEWAY Vector for Gene Disruption in Filamentous Fungi. Laboratory of Applied Microbiology, Division of Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Kita-9, Nishi-9, Sapporo 060-8589, Japan. 2005.
2. BARBOSA, A. S.; LIN, C. J. Silenciamento de Genes Com RNA Interferência: Um Novo Instrumento para Investigação da Fisiologia e Fisiopatologia do Córtex Adrenal. **Arq. Bras. Endocrinol Metab.** v.48 (5), 2004.
3. BARROS, B. A. Construção de cassetes de expressão para silenciamento gênico de fatores antinutricionais da soja, via interferência por RNA. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento. Universidade Federal Viçosa. Viçosa-MG, 2006.
4. BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Review Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell, Review.** v.116, p.281–297, 2004.
5. BAULCOMBE, D. RNA silencing in plants. **Nature: insight review.** v.431, 2004.
6. BHADOURIA, V.; BANNIZA, S.; WEI Y. D.; PENG, Y. L. Reverse Genetics for Functional Genomics of Phytopathogenic Fungi and Oomycetes. **Comp. Funct. Genom.** Review Article. p. 380-719, 2009.
7. BRACHMANN, A.; KONIG, J.; JULIUS, C. M.; FELDBRUGGE. M. A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. **Mol Gen Genomics.** v.272, p.216–226. DOI 10.1007/s00438-004-1047, 2004.
8. CARVALHO, N. D. S. P.; ARENTSHORST, M.; KWON, M. J.; MEYER, V.; RAM, A. F. J. Expanding the ku70 tool box for filamentous fungi: establishment of complementation vectors and recipient strains for advanced gene analyses. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 87(4), p.1463–1473, 2010.
9. CASPARI, T. Onset of gluconate-H⁺ symport in *Schizosaccharomyces pombe* is regulated by the kinases Wis1 and Pka1, and requires the gti1⁺ gene product. **Journal of Cell Science.** v.110, p.599-608, 1997.
10. COGONI, C.; MACINO, G. Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme. **Current Opinion in Microbiology.** v.2, p.657–662, 1999.
11. COGONI, C. Homology-dependent gene silencing mechanisms in fungi. **Annu. Rev. Microbiol.** v.55, p.381–406, 2001.
12. COLOT, H. V.; PARK, G.; TURNER, G. E.; RINGELBERG, C.; CREW, C. M.; LITVINKOVA, L.; WEISS, R. L.; BORKOVICH, K. A. e DUNLAP, J. C. A high-throughput gene *knockout* procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.103(27), p.10352–10357, 2006.

13. CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. Mal do Panamá Fim do bananal. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, Editorial. Cultivar HF. p. 27-29, 2003.
14. CORSINO-SANTOS, J. R.; DELFINA, T. P. A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Os segredos das plantas e de seus patógenos na era molecular. **SBG. Ribeirão Preto**. p. 45, 2003.
15. DALY, A. Diagnostic Services and G. Walduck, Crops, Forestry and Horticulture, Darwin. *Fusarium Wilt of Bananas (Panama Disease) (Fusarium oxysporum f. sp. cubense)*. ISSN 0157-8243. 2006. Disponível:<[http:// www.nt.gov.au/dpifm/](http://www.nt.gov.au/dpifm/)>. Acesso em: agosto/2012.
16. DITA, M. A.; HERAI, R.; WAALWIJK, C.; YAMAGISHI, M.; GIACHETTO, P.; FERREIRA, G.; SOUZA, M. and KEMA, G.H.J. Comparative Transcriptome Analysis and Genome Assembly of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Short oral presentations. Pesquisa ainda não publicada, 2012. Disponível em:<[http:// www.ainfo.cnptia.embrapa.br/](http://www.ainfo.cnptia.embrapa.br/)>. Acesso em: outubro/2013.
17. DITA, M. A.; WAALWIJK, B, C.; BUDDENHAGEN, I. W.; SOUZA JR, M. T.; KEMA, G. H. J. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana *fusarium* wilt pathogen. **Plant Pathology**. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02221, 2010.
18. DONATO, S. L. R.; SILVA, S. de O.; LUCCA, O. A. F.; LIMA, M. B.; DOMUNGUES, H.; ALVES, J. da S. Comportamento de variedades e híbridos de bananeira (*Musa* ssp.) em dois ciclos de produção no sudeste da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP. v. 28, n.1, p. 139-144, 2006.
19. ELBASHIR, S. M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21 and 22 nucleotide RNAs. **Genes & Development**. v.15, p.188–200, 2000.
20. FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS S. A.; DRIVER S. E.; MELLO C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**. v.391 (6669), p.806-11, 1998.
21. FRADSEN, R. J. N.; ANDERSSON, J. A.; KRISTENSEN, M. B.; GIESE, H. Efficient four fragment cloning for the construction of vectors for targeted gene replacement in filamentous fungi. **BMC Molecular Biology**. v. 9 (70), 2008.
22. FRANÇA, N. R.; MESQUITA JÚNIOR, D.; LIMA, A. B.; PUCCI, F. V. C.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA N. P. Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Rev. Bras. Reumatologia** v.50(6), p.695-709, 2010.
23. GARDINER, D. M.; DONALD M.C.; COVARELLI L.; SOLOMON P. S.; RUSU A. G. *et al.* Comparative Pathogenomics Reveals Horizontally Acquired Novel Virulence Genes in Fungi Infecting Cereal Hosts. **PLoS Pathog.** v.8(9): e1002952. doi:10.1371/journal.ppat.1002952, 2012.
24. GUO, L.; HAN, L.; YANG, L.; ZENG, H.; FAN, D. *et al.* Genome and Transcriptome Analysis of the Fungal Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Causing Banana Vascular Wilt Disease. **PLoS ONE**. v. 9(4): e95543. doi:10.1371/journal.pone.0095543, 2014.

25. GROENEWALD, S.; VAN DEN BERG, N.; MARASAS, W.F.O.; VILJOEN, A. Biological, physiological and pathogenic variation in a genetically homogenous population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, p. 401-409, 2006.
26. GRONOVER, C.S.; SCHORN, C.; TUDZYNSKI, B. Identification of *Botrytis cinera* genes up-regulated during infection and controlled by the Gαmsubunit BCG1 using suppression subtractive hybridization (SSH). **Mol. Plant-Microbe Interactions**. v.17, p.537-546, 2004.
27. GUO L.; HAN L.; YANG L.; ZENG H.; FAN D. *et al.* Genome and Transcriptome Analysis of the Fungal Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Causing Banana Vascular Wilt Disease. **PLoS ONE**. v. 9 (4): e95543. doi:10.1371/journal.pone.0095543, 2014.
28. HARDY, S.; LEGAGNEUX, V.; AUDIC, Y.; PAILLARD, L. Reverse genetics in eukaryotes. **Biology cellular**. v. 102(10), p. 561-580, 2010.
29. HOUTERMAN, P. M.; SPEIJER, D.; DEKKER, H. L.; KOSTER, C. G. The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum* infected tomato plants. **Molecular Plant Pathology**. v.8(2), p. 215-221, 2007.
30. HOUTERMAN P.; CORNELISSEN B. J. C.; REP, M. Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. **PLoS Pathogens**. v. 4, n.2, p. 1-6, 2008.
31. HUANG, G.; WANG, H.; CHOU, S.; NIE, X.; CHEN, J.; LIU, H. Bistable expression of WOR1, a master regulator of white–opaque switching in *Candida albicans*. **PNAS**. v. 103(34), p.12813–12818, 2006.
32. JONKERS, W.; DONG, Y.; BROZ, K.; KISTLER, H. C. The Wor1-like Protein Fgp1 Regulates Pathogenicity, Toxin Synthesis and Reproduction in the Phytopathogenic Fungus *Fusarium graminearum*. **PLoS Pathog.** v.8(5), e1002724. doi:10.1371/journal.ppat.1002724, 2012.
33. KETTING, R. F.; HAVERKAMP, T. H.; VAN LUENEN, H. G.; PLASTERK, R. H. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNase. **Cell**. v. 99(2), p.133-141, 1999.
34. KRAJAEJUN T.; GAUTHIER G. M.; RAPPLEYE C. A.; SULLIVAN T. D.; KLEIN B. S. Development and Application of a Green Fluorescent Protein Sentinel System for Identification of RNA Interference in *Blastomyces dermatitidis* Illuminates the Role of Septin in Morphogenesis and Sporulation. **Eukaryot Cell**. v. 6(8), p 1299–1309, 2007.
35. KÜCK, U.; HOFF, B. New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. **Appl Microbiol Biotechnol**. Mini-Review. v. 86, p. 51–62, DOI 10.1007/s00253-009-2416-7. 2010.

36. LIEVENS, B.; HOUTERMAN, P. M. and REP, M. Ejector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other formae specialis. **Microbiology Letter**. v.300, p.201-215, 2009.
37. LIU H.; ZHANG B.; LI, C.; BAO, X. Knock down of chitosanase expression in phytopathogenic fungus *Fusarium solani* and its effect on pathogenicity. **Current Genetics**. v. 56(3), p.275-8, 2010.
38. MA, LI-JUN *et al.* Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. **Nature**. v.464 (7287), p.367-373, 2010.
39. MALAVAZI, I. Caracterização funcional de diferentes componentes das vias metabólicas de respostas ao dano ao DNA no fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. Tese (Doutorado em Biociências aplicadas a farmácia) - Programa de Pós-Graduação em Biociências aplicadas a farmácia. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2007.
40. MALONE, C. D.; HANNON, G. J. Small RNAs as Guardians of the Genome. **Cell**. v.136, p.656–668, 2009.
41. MARTINEZ, J.; PATKANIOWSKA, A.; URLAUB, H.; LÜHRMANN, R.; TUSCHL T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. **Cell**. v. 110(5), p.563-74, 2002.
42. MARTINS, A. N.; FURLANETO, F. P. B. Bananicultura: pesquisas voltadas para a agricultura familiar. Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária. 2008. Disponível em: <<http://www.apta.sp.gov.br/>>. Acesso em: setembro/2012.
43. MATOS, A. P.; CORDEIRO, Z. J. M.; HADDAD, F. Fusariose em frutíferas. XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura. Bento Gonçalves-RS. 2012. Disponível em:<<http://www.congressofruticultura2012.com.br/>>. Acesso em: julho/2012.
44. MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**: insight review articles. v.431 (16), 2004.
45. MELDRUM, A.; FRASER-SMITH, S.; TRAN-NGUYEN, L. T. T.; DALY, A. M.; AITKEN, E. A. B. Presence of putative pathogenicity genes in isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* from Australia. **Australasian Plant Pathol**. v.41, p.551–557, 2012.
46. MIAO, V. P. W.; ROUNTREE M. R.; SELKER, E. U. Ectopic Integration of Transforming DNA is Rare Among *Neurospora* Transformants Selected for Gene Replacement. **Genetics**. v.139, p.1533-1544, 1995.
47. MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, p. 398, 2005.
48. MICHELSE C. B.; BECKER M.; HELLER J.; MORAGA J.; COLLADO I. G.; TUDZYNSKI P. The Botrytis cinerea Reg1 Protein, a Putative Transcriptional Regulator, Is Required for Pathogenicity, Conidiogenesis, and the Production of Secondary

- Metabolites. **The American Phytopathological Society**. v. 24(9), p. 1074–1085, doi:10.1094/MPMI-01-11-0007, 2011.
49. MICHIELSE, C. B.; VAN WIJK, R.; REIJNEN, L.; CORNELISSEN, B. J. C.; REP, M. Insight into the molecular requirements for pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through large-scale insertional mutagenesis. **Genome Biology**. v. 10, p. 4, doi:10.1186, 2009(a).
 50. MICHIELSE C. B.; VAN WIJK R.; REIJNEN L.; MANDERS E. M. M.; BOAS S. *et al.* The Nuclear protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* is required for parasitic growth. **PLoS Pathog**. v.5(10), e1000637, 2009(b).
 51. MORAES, W. da S. Relatório técnico: Ponderações técnicas sobre a importação de bananas do Equador. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. 2012. Disponível em: www.registro.unesp.br/>. Acesso em: julho/2012
 52. NAKAYASHIKI, H.; NGUYEN Q. B. RNA interference: roles in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology**. v.11, p. 494–502, 2008.
 53. NAPOLI C.; LEMIEUX C.; JORGENSEN R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. **Plant Cell**. v. 2(4), p. 279-289, 1990.
 54. NETO, S. P.; GUIMARÃES, T.G. Evolução da cultura da banana no Brasil e no mundo. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/287/>>. Acesso em: julho/2012.
 55. NGUYEN, V. Q.; SIL, A. Temperature-induced switch to the pathogenic yeast form of *Histoplasma capsulatum* requires Ryp1, a conserved transcriptional regulator. **PNAS**. v. 105(12), p. 4880–4885, 2008.
 56. NINOMIYA, Y.; SUZUKI, K.; ISHI I.; CHIZU, I.; INOUE, H. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. **PNAS**. v. 101(33), p. 12248–12253, 2004.
 57. NYKÄNEN, A.; HALEY, B.; ZAMORE, P. D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. **Cell**. v. 107(3), p.309-21, 2001.
 58. PADDISON, P. J.; CAUDY, A. A.; BERNSTEIN, E.; HANNON G. J.; CONKLIN, D. S. Hairpin RNAs curtos (shRNAs) induzir específica da sequência silenciamento em células de mamíferos. **Genes Dev**. v.16 (8), p.948-58, 2002.
 59. PLOETZ, R. C. *Fusarium* wilt (Panama disease). In: Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests. CIRAD/FLHOR. Montpellier, France. Ganry, J. (ed.). p. 149-158, 393 pp, 1993.
 60. PLOETZ R.; PEGG K. *Fusarium* wilt of banana and Wallace’s line: was the disease originally restricted to his Indo-Malayan region? **Australasian Plant Pathology**. v. 26, 239–249, 1997.

61. PLOETZ, R. C. Panama disease, an old nemesis rears its ugly head: Part 1, the beginnings of the banana export trades. Online. **Plant Health Progress** Doi:10.1094/PHP-2005-1221-01-RV, 2005.
62. PROJEÇÕES DO AGRONEGÓCIO BRASIL 2011/12 a 2021/22. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - Assessoria de Gestão Estratégica. Brasília, 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: junho/2012.
63. PUHALLA, J. E. Genetic considerations of the genus *Fusarium*. In: Nelson, P.E.; Toussoun, T.A.; Cook, R.J. (Ed) *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*. Pennsylvania State University, p. 291-305, 1981.
64. RAPPLEYE, C. A.; ENGLE, J. T.; GOLDMAN, W. E. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for α -(1,3)-glucan in virulence. **Molecular Microbiology**. v. 53(1), p.153–165, 2004.
65. REP, M.; VAN DER DOES, H. C.; MEIJER, M.; VAN WIJK, R.; HOUTERMAN, P. M.; DEKKER, H. L.; DE KOSTER, C. G.; CORNELISSEN, B. J. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. **Molecular Microbiology**. v. 53(5), p.1373-1383, 2004.
66. RODRIGUEZ, M. A. D.; RIBEIRO, L.; AMORIM, P. E.; CORDEIRO, Z. J. M.; SILVA, S. O. Metodologia para a caracterização de genótipos de bananeiras quanto à resistência ao mal-do-Panamá em casa de vegetação. Comunicado técnico. ISSN 1809-502X. Cruz das Almas, BA. 2011.
67. ROMANO, N.; MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. **Mol. Microbiol.** v.6, p. 3343-353, 1992.
68. SCHERER, S.; DAVIS, R. W. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. **PNAS**. v. 76(10), p. 4951-4955, 1979.
69. SHAFRAN, H.; MIYARA, I.; ESHED, R.; PRUSKY, D.; SHERMAN, A. Development of new tools for studying gene function in fungi based on the Gateway system. **Fungal Genetics and Biology**. v.45, p.1147–1154, 2008.
70. SILVA, C. M. Análise da diversidade genética por marcadores RAPD e SSR em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* no Estado de Santa Catarina. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, 2009.
71. SIMMER, F.; BUSCAINO, A.; KOS-BRAUN, I. C.; KAGANSKY, A.; BOUKABA, A.; URANO, T.; KERR, A. R. W.; ALLSHIRE, R. C. Hairpin RNA induces secondary small interfering RNA synthesis and silencing in trans in fission yeast. **EMBO reports**. v.11, p.112–118. doi:10.1038/embor.2009.273, 2010.

72. STERGIOPOULOS, I.; WIT, P. J. G. M. Fungal Effector Proteins. **The Annual Review of Phytopathology**. v.47, p.233–63, 2009.
73. STOVER, R. H. Banana Plantain and Abaca Diseases. Common welth Mycological Institute, p. 316, 1972.
74. SUMMERELL, B. A.; LESLIE, J. F. A Utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease*, v. 87, p. 117-128, 2003.
75. TIERNEY, M. B.; LAMOUR, K. H. An Introduction to Reverse Genetic Tools for Investigating Gene Function. **The Plant Health Instructor**. DOI: 10.1094/PHI-A-2005-1025-01, 2005.
76. TIJSTERMAN, M.; KETTING R. F.; PLASTERK R. H. The genetics of RNA silencing. **Annual Review of Genetics**. v.36, p.489-519, 2002.
77. TRINDADE *et al.* Doenças e Métodos de controle. In: O cultivo da bananeira. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 279, cap. IX, 1 ed., 2004.
78. VAN DER DOES, H. C.; DUYVESTEIJN, R. G. E.; GOLTSTEIN, P. M.; VAN SCHIE, C. C. N.; MANDERS, E. M. M.; CORNELISSEN, B. J. C.; REP, M. Expression of effector gene SIX1 of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells. **Fungal Genetics and Biology**. v.45, p.1257–1264, 2008
79. ZAMORE, P. D.; TUSCHL, T.; SHARP, P. A.; BARTEL, D. P. RNAi: Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals. **Cell**. v.101, p.25–33, 2000.
80. ZWIERS, L. H.; DE WAARD, M. A. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*- mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Current Genetic**. v. 39, p. 388-393, 2001.

CAPITULO I

**Inativação do gene *SGE1* por recombinação homóloga em
Fusarium oxysporum f. sp. *cubense***

1 INTRODUÇÃO

Atualmente uma grande quantidade de genomas completos de fungos filamentosos é continuamente produzida, principalmente, após a revolução nas técnicas de sequenciamento que reduziu o custo e o tempo na obtenção dos dados. A disponibilidade de seqüências beneficia estudos funcionais em larga escala (JIANG *et al.*, 2013). Com isso, uma grande variedade de espécies de fungos, principalmente, os de interesse agrônômico e da área da saúde tornaram-se alvos de análises, visando à determinação de genes putativos. Espécies do gênero *Fusarium* que infectam animais, humanos e plantas, apresentam grande importância do ponto de vista econômico (LESLIE & SUMMERELL, 2006; NUCCI & ANAÏSSIE, 2007; GLENN, 2007; ESNAKULA *et al.*, 2013). Na área agrônômica, várias espécies de *Fusarium* causam perdas expressivas em diversas culturas, dentre elas estão também o *F. graminearum* patógeno do trigo, *F. virguliforme* da soja, *F. verticillioides* do milho, e *F. oxysporum* capaz de infectar plantas mono e dicotiledôneas (MA *et al.*, 2010; SRIVASTAVA *et al.*, 2014).

A espécie *F. oxysporum* é composta por linhagens não patogênicas e patogênicas divididas em grupos especializados em infectar plantas hospedeiras específicas, conhecidos como *formae speciales* (f. sp) Snyder & Hansen (1940). E em alguns casos subdivididas em raças (capazes de atacar de acordo com a susceptibilidade dos genótipos das cultivares hospedeiras) (GORDON & MARTYN, 1997; SUTHERLAND *et al.*, 2013). *F. oxysporum* teve seu genoma sequenciado, disponibilizado em 2007 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/MultiHome.html) e comparado a outras espécies do mesmo gênero e a outros fungos patogênicos a humanos e animais. Portanto, diversos genes que codificam fatores transcricionais, enzimas líticas e outros genes da via de produção de metabólitos secundários importantes para a sobrevivência e para patogenicidade, puderam ser analisados e identificados (MA *et al.*, 2010; JONKERS *et al.*, 2012; SUTHERLAND *et al.*, 2013). Dentre as *formae speciales* do *F. oxysporum* está o *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), agente causal do mal-do-Panamá, patógeno da bananeira e de helicônias, (PLOETZ, 1993; PLOETZ & PEGG, 1997).

O *Foc* é subdividido em quatro raças (R1, R2, R3 e R4), onde três delas R1, R2 e a R4 composta pelas linhagens TR4 e STR4, são patogênicas a bananeiras (PLOETZ & PEGG, 1997), e geram grandes prejuízos a bananicultura mundial há vários anos (TRINDADE *et al.*, 2004). A linhagem TR4 considerada a mais agressiva é capaz de causar doença até mesmo nas cultivares até então resistentes às demais raças, teve seu genoma completo e transcriptoma comparado com a raças 1, os resultados revelam diferenças importantes na

expansão de famílias gênicas de transportadores e fatores de transcrição para transporte de toxinas e nutrientes, onde TR4 possui sempre um número maior desses genes que codificam proteínas envolvidas na patogenicidade e/ou virulência (GUO *et al.*, 2014).

Na tentativa de conhecer os mecanismos relacionados à patogenicidade ou virulência no *Foc*, diversos trabalhos foram realizados. Um deles foi realizado por SUTHERLAND *et al.* (2013), que conseguiu identificar a presença de vários genes relacionados a patogenicidade em TR4 e STR4, que foram menos expressos ou ausentes em linhagens não patogênicas, os quais já tiveram suas funções determinadas em outras *formae speciales* de *F. oxysporum* e em outras espécies de *Fusarium*, porém identificados pela primeira vez em *Foc*. Entre estes estão os genes da *chsV* (*putative chitinase class V*), *rho1* (*GTPase activating protein*), os quais foram bem associados a patogenicidade no *F. oxysporum* f. sp. *licopersici* - *Fol*. Além de vários outros também identificados por GUO *et al.* (2014) na análise comparativa do genoma e transcriptoma das raças R1 e R4.

A função de diversos genes vem sendo investigada por meio de várias estratégias moleculares, uma delas é o método de *knockout* gênico, gerado pela recombinação de sequências homólogas de um gene alvo (substituição), ou pela interrupção do gene. Os mutantes produzidos pelo método de *Knockout* possibilitam analisar a função do gene na ausência da proteína por ele codificada.

JONKERS *et al.*, (2012), utilizou o método de *knockout* para avaliar a função do gene *FGP1* de *F. graminearum*. Este gene é ortólogo ao *WOR1* de *Candida albicans* e *RYP1* de *Histoplasma capsulatum*, reguladores transcricionais envolvidos no dimorfismo (HUANG *et al.*, 2006; NGUYEN & SIL, 2008). Os mutantes de *F. graminearum* para o gene *FGP1* não apresentaram capacidade de causar doença, quando comparados à linhagem selvagem, e não produzem níveis detectáveis de toxinas importantes no processo de infecção. Em *Botrytis cinérea*, cujo ortólogo é denominado de *BcReg1*, foi observado que mutantes apresentando a deleção do gene *REG1* não são patogênicos e apresentaram bloqueio na conidiogênese e na produção de metabólitos secundários (MICHELSE *et al.*, 2011).

Em 2009, a atividade funcional do fator transcricional *SGE1* de *Fol* (ortólogo ao *WOR1*, *RYP1*, *FGP1* e *REG1*) também foi analisada por meio da estratégia de *Knockout* gênico (MICHELSE *et al.*, 2009).

O *SGE1* é um gene que expressa uma proteína nuclear de mesmo nome (*Sge1*), capaz de ativar a transcrição de genes efetores como os genes da família das proteínas *Six* (*Secreted in xylem*). Este gene demonstrou ser muito importante para a expressão das proteínas efetoras *Six*, e conseqüentemente, para a patogenicidade. As proteínas efetoras *Six* são sintetizadas

pelo fungo quando em contato com a planta hospedeira atuando no processo de patogenicidade. Foram relatadas até agora a presença de *Six1* a *Six10* em *Fol* (REP *et al.*, 2004; LIEVENS *et al.*, 2009; MELDRUM *et al.*, 2012). Recentemente foram detectados em isolados de *Foc* três genes homólogos aos genes SIX identificados em *Fol* (*SIX1*, *SIX7* e *SIX8*) (MELDRUM *et al.*, 2012).

Os mutantes gerados para o gene *SGE1* não foram capazes de causar doença em tomateiros, além disso, a conidiogênese foi afetada, porém sem alterar a viabilidade dos esporos gerados (MICHELSE *et al.*, 2009).

Deste modo, devido à importância do gene *SGE1* para patogenicidade em diferentes espécies de fungo, o presente trabalho teve como objetivo obter e analisar linhagens *knockout* para *SGE1* por meio de recombinação homóloga.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos e Condições de Cultivo

Isolados de *Foc* R1(VCG não definido) e R2 (VCG 0124) cedidos pelo Dr. Miguel Angel Dita (Embapa Mandioca e Fruticultura, BA) e *Agrobacterium tumefaciens* linhagem AGL1, foram utilizados nos experimentos de transformação genética. O *Foc* R1 e R2 foram rotineiramente cultivados em meio PDA (10 g/L⁻¹ de dextrose, 16 g/L⁻¹ de ágar e 250 g/L⁻¹ de discos de batata) mantidos em incubadora a 25° C. Para obtenção de esporos, cubos com ± 0,5 mm² de micélios retirados de placas de Petri com PDA, foram colocados em frascos contendo 50 ml de PDB ¼, e mantidos sob agitação de 150 rpm por 48 h. Células de *Agrobacterium tumefaciens* linhagem AGL1 com vetor binário carregando as construções para recombinação homóloga foram obtidas por meio de eletroporação. Cultivadas em meio de cultura LB-manitol (10 g/L⁻¹ triptona, 5 g/L⁻¹ extrato de levedura, 2,5 g/L⁻¹ NaCl, 10 g/L⁻¹ de manitol) suplementado com antibióticos (200 µg/mL⁻¹ de espectinomicina, 75 µg/mL⁻¹ de carbenicilina) para seleção das estirpes que carregam os vetores binários, e incubadas a 28°C por 24-48 h.

2.2 Cassetes utilizados para *Knockout* do gene *SGE1* por recombinação homóloga

Duas diferentes construções foram utilizadas na transformação do *Foc* por meio da estratégia de *knockout*. Cassete 1) contém como marca de seleção o gene *hph* (hygromycin-B phosphotransferase) que confere resistência a higromicina-B controlado pelo promotor PtrpC de *Aspergillus nidulans*; sequências homólogas as regiões que flanqueiam o gene alvo com 1304 pb na região 5' e 1402 pb na região 3'. Cassete 2) apresenta além de resistência a higromicina B, contém também o gene repórter *gfp* (*green fluorescent protein*) flanqueados pelas sequências da região 5' com 1304 pb e 3' com 1402 pb, o *hph* e *gfp* estão sob o controle dos promotores PtrpC de *A. nidulans* e PtoxA-5'UTR de *Pyrenophora tritici-repentis*, respectivamente (Fig. 1). Em ambas as construções o vetor binário pPm43GW foi utilizado como vetor destino e a clonagem foi realizada utilizando o sistema gateway (Invitrogen).

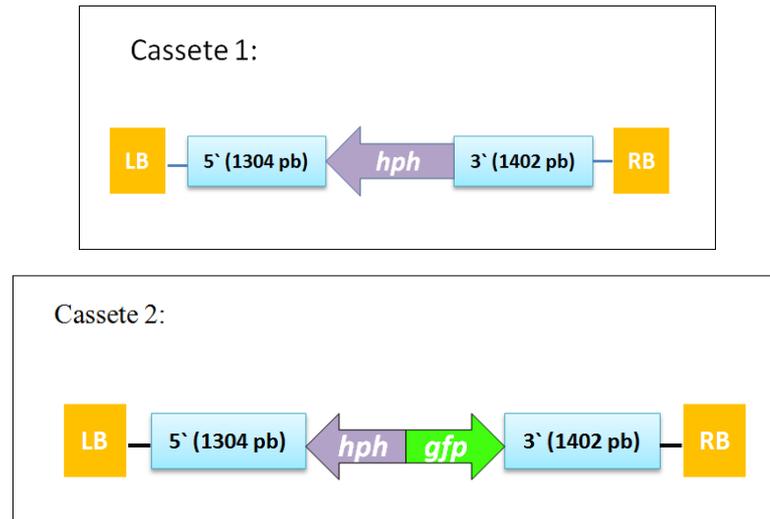


Figura 1: Esquema representando os cassetes utilizados para recombinação homóloga do gene *SGE1* em *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Cassete 1: Em Lilás o gene que confere resistência a higromicina (*hph*), sob o controle do promotor PtrpC de *A. nidulans* flanqueado pelas regiões para recombinação homóloga com 1304 pb na região 5' e 1402 pb na região 3'. Cassete 2: Os genes *hph* controlado pelo promotor PtrpC de *A. nidulans* e *gfp* (*green fluorescent protein*) sob o controle de PtoxA-5'UTR de *P. tritici-repentis*, em azul sequências flanqueadoras para recombinação homóloga. Em laranja, borda direita-LB e borda esquerda-RB.

2.3 Transformação genética de *F. oxysporum cubense* mediada por *A. tumefaciens* – ATMT

A transformação de *Foc* foi realizada adotando o procedimento de ATMT, de acordo com o protocolo descrito por Zwiers *et al.* (2001), com algumas modificações, empregando esporos e protoplasto de *Foc*. Para obtenção de esporos foram colocados cubos de micélios em meio PDB^{1/4} e mantido sob agitação de 150 rpm, a 25°C por 48 horas. A cultura de fungos foi filtrada com gaze estéril, lavada por duas vezes com H₂O ultrapura autoclavada. Usando lâmina de Neubauer e microscópio óptico, os esporos foram contados e diluídos para concentração de 10⁶ esporos/mL.

Para obtenção de protoplastos o procedimento foi realizado, de acordo com o protocolo de Visser *et al.* (2004), com algumas modificações. Inicialmente, o micélio aéreo do *Foc* cultivado em meio PDA durante 9-10 dias foi raspado e inoculado em PDB por 18 h a 25°C sob agitação de 150 rpm. A cultura crescida em *overnight* foi filtrada em funil de papel estéril e lavada com 100 mL de solução de 0,6 M MgSO₄.7 H₂O. O micélio seco foi pesado para ser retirado 1g e ser ressuscitado em 10 mL de meio osmótico (OM pH 5,8) (0,98M MgSO₄, 8,4 mM Na₂HPO₄, 1,6 mM NaH₂PO₄) mantido em gelo. Em seguida foram adicionados 2 mL/g de micélio da solução de *lysing enzyme* (Sigma-Aldrich) (100 mg/mL diluída em OM), misturados gentilmente e incubada por 5 min. no gelo. Após a adição da solução de *lysing enzyme*, foi adicionado 0,75 mL/g micélio da solução de *Bovine Serum*

Albumin (BSA, Sigma-Aldrich) (12 mg/mL de BSA diluída em OM). O processo de protoplastização foi realizado a 30°C, sob agitação constante de 80 rpm durante 4 horas. O procedimento seguiu daqui em diante, inteiramente, de acordo com a metodologia descrita em Visser *et al.* (2004).

Linhagens de *A. tumefaciens* AGL-1 contendo vetor binário pPm43GW-*hph* e pPm43GW-*hph-gfp* foram cultivadas em meio LB-manitol líquido suplementado com 200 µg/mL⁻¹ de espectinomicina, 75 µg/mL⁻¹ de carbenicilina, incubadas sob agitação de 200 rpm, a 28°C por 24 h. A cultura de bactérias foi centrifugada e descartado o sobrenadante para em seguida adicionar o meio mínimo – MM (K-buffer pH 6,8, CaCl₂ 1%, FeSO₄ 0,1%, NH₄NO₃ 20%, M-N, Elemento de esporos, Glicerol 50%) e novamente incubada em 200 rpm, a 28°C por mais 18 h. Posteriormente a cultura de bactérias foi centrifugada e ressuspendida em meio de indução - IM (K-buffer pH 6,8, CaCl₂ 1%, FeSO₄ 0,1%, NH₄NO₃ 20%, M-N, Elemento de esporos, Glicerol 50%, MES 1M pH 4,8, Glicerol 20%, acetoseringona (AS) 200 µM) e mensurada a densidade óptica (OD_{600nm}) para a realização das diluições de 0,15 e 0,5. Aguardou-se cerca de ± 3 a 4 h para que a cultura de bactérias com OD 0,15 alcançasse OD de 0,18 e a OD de 0,5 alcançasse OD 0,6-0,8.

Conídios e protoplastos do fungo e a *Agrobacterium* foram co-cultivados na proporção de 1:1 (3 mL de esporos ou protoplastos do *Foc* e 3 mL de cultura de *Agrobacterium*), e incubados a 22°C em estufa tipo B.O.D. (*body oxygen demand*), durante 48h e 96h. Um total de 100 µL de co-cultivo foi espalhado em placas de petri contendo meio PDA suplementado com antibióticos (130 µg/mL⁻¹ higromicin-B e 400 µg/mL⁻¹ cefotaxina) para seleção de linhagens transformantes, em seguida mantidos a 25°C em B.O.D com foto período de 12 h até a possível visualização de micélios dos transformantes. O restante do co-cultivo foi centrifugado, descartado o IM e adicionado o mesmo volume (6 mL) de meio PDB, suplementado com 130 µg/mL⁻¹ higromicina-B e 400 µg/mL⁻¹ cefotaxina, dividindo em 3 alíquotas de 2 mL cada, mantidos em *shaker* (150 rpm) a 25°C até a possível visualização de crescimento de micélios. Para os transformantes obtidos por meio do cultivo em meio PDB, foi realizado processo de isolamento por cultura monospórica.

2.4 Caracterização dos transformantes de *Foc*

2.4.1 Isolamento de DNA e análise de transformantes via PCR

Os isolados selvagem e os tranformantes obtidos foram crescidos em meio PDB sob agitação de 200 rpm por sete dias para obtenção de massa micelial. A extração de DNA total

foi realizada de acordo com o método de CTAB (Doyle & Doyle, 1990). Em seguida, foi tratado com RNase (Invitrogen) e submetido a quantificação em NANODROP e gel de agarose a 0,8%. A confirmação dos possíveis transformantes foi realizada pela detecção do gene de resistência a higromicina (*hph*) presente em ambas as construções utilizadas neste trabalho. A presença do gene de resistência *hph* no genoma dos possíveis transformantes foi determinada por análise via PCR, empregando o par de oligonucleotídeos *hph* - *primer forward* - TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT e *primer reverse* - CGCGTCTGCTGCTCCATAACAAG. Depois de confirmado os transformantes foi realizada a análise para verificar a ocorrência de integração ectópica ou a deleção do gene alvo “*SGEI*” por meio da PCR (*SGEI* - *primer forward* - ATCTGGTCGGTTCCTACTCGTC e *SGEI* - *primer reverse* - ACCACGCCTGACCATAAGAC), conforme esquemas representados na Fig. 2. A reação de amplificação ocorreu com a adição de cerca de 50 ng de DNA total dos transformantes e do fungo controle (selvagem). O mix consiste de um volume final de 15 μ L, contendo 1 μ L de *primers forward* e *reverse* (0,3 μ M) específico para o gene de interesse, 1,5 μ L tampão 10X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% Triton X-100), 1,2 μ L MgCl₂ (1,5 mM), 1,6 μ L dNTP (0,8 mM), 1U Taq polimerase (Phonetría) e água destilada. As condições de PCR foram as seguintes: 94°C por 3 min. para desnaturação inicial, seguindo de 30 ciclos a 94°C por 30 seg., 66°C (*hph*) e 60°C (*SGEI*) por 30 seg. para anelamento dos *primers*, 72°C por 1 min. para síntese e extensão final de 72°C por 10 min. A visualização dos produtos amplificados foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

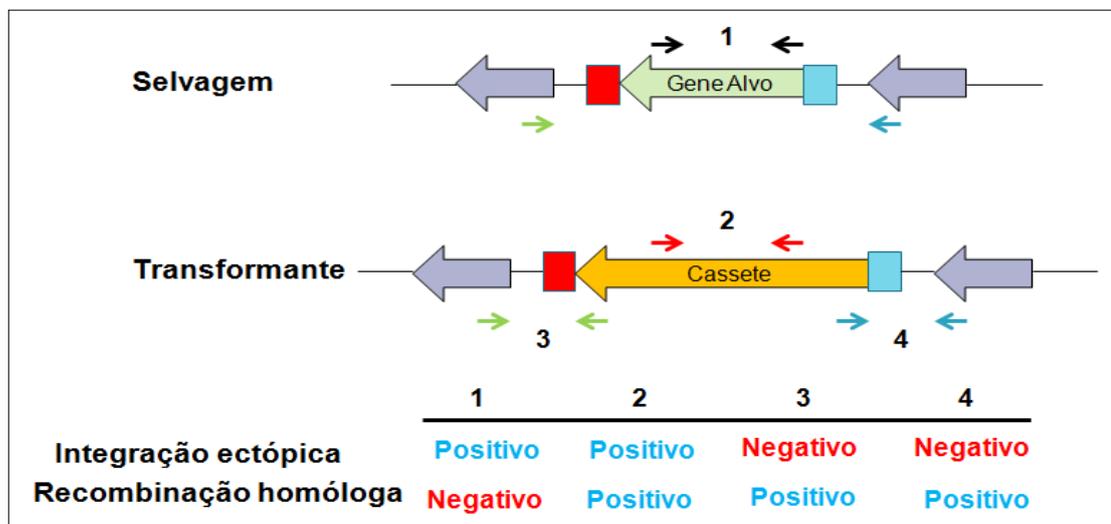


Figura 2: Esquema para confirmação de transformantes com recombinação homóloga ou integração ectópica. (1) indica os *primers* para amplificação do gene alvo (*SGEI*) confirmando a integração ectópica, caso ocorra amplificação; (2) *primer* para análise de integração do cassete com a marca de seleção (*hph*), no genoma do fungo; (3) *primer* para amplificação da região 5', para confirmar a ocorrência de recombinação homóloga; e (4) *primer* para amplificação da região 3' também para confirmar a presença de recombinação homóloga, respectivamente.

2.4.2 Detecção da proteína repórter GFP via Microscopia de fluorescência

Para detectar a expressão da proteína repórter GFP em linhagens transformadas com o cassete 2, contendo a marca de seleção de resistência a *hph* e o gene repórter *gfp*, foram preparadas lâminas contendo esporos (macro e microconídio) e micélios de linhagens transformantes e do isolado *Foc* R2 selvagem utilizado como controle. Em seguida foram visualizadas e fotografadas, utilizando microscópio de fluorescência Axio Imager M2 (Zeiss).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No processo de agrotransformação dos isolados de *Foc* R1 e R2 empregando a linhagem de *Agrobacterium* AGL1, foram obtidos transformantes apenas com o *Foc* R2. E quando analisado o tempo de co-cultivo de 48 e 96 h foi verificada a presença de transformantes tanto a partir de protoplastos quanto com esporos.

Foram obtidos 173 transformantes com as duas construções, sendo 115 obtidos com cassete contendo apenas a marca de seleção do gene de resistência *hph* e 58 transformantes com cassete contendo *hph-gfp*. Ressalta-se que, nenhum dos transformantes apresentou alteração fenotípica no desenvolvimento, quando comparados com o controle (selvagem) (Fig. 3). Na seleção dos transformantes em meio sólido (PDA suplementado com higromicina), uma baixa taxa de transformantes foi obtida (3 transformantes para cada cassete), a maioria dos transformantes (167) foram obtidos da seleção em meio líquido (alíquotas dos co-cultivos mantidos em PDB sob agitação). Meyer (2008) conseguiu uma taxa de 19 transformantes/placas utilizando também o *Foc* e a linhagem AGL1, onde a menor taxa de seu experimento foi obtida com a linhagem de *Agrobacterium* GV3101 com 9 transformantes/placas. Apesar da seleção em meio líquido apresentar uma maior eficiência na obtenção de transformantes, este processo de seleção pode levar a multiplicação dos mesmos eventos de transformação.

Dos 173 possíveis transformantes analisados, todos foram confirmados quanto à presença do T-DNA por meio da detecção do gene da higromicina, indicando que não houve escape a partir da dose letal utilizada.



Figura 3: Imagem de alguns dos 173 transformantes e da linhagem selvagem (controle) de *F. oxysporum cubense*. Nas cinco primeiras colunas (da esquerda para a direita), estão as linhagens transformantes crescendo em meio PDA suplementado com 130 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de higromicina; E na 6ª coluna, está a linhagem selvagem crescendo em meio PDA sem antibiótico.

Os transformantes contendo o cassete com *hph/gfp* foram primeiramente analisados por meio da microscopia de fluorescência para detecção da proteína verde fluorescente. O gene repórter *gfp* foi detectado nos diferentes estágios de desenvolvimento do fungo, como esporos (microconídios e macroconídios) e micélios. Foram obtidos transformantes de *Foc* tanto a partir de esporos, como de protoplastos, porém obtidos apenas com tempo de co-cultivo de 96 h (Fig. 4). Na transformação utilizando cassete contendo apenas *hph* foi possível obter transformantes a partir de esporos e protoplastos com 48h e 96h de co-cultivo. Contudo, um maior número de repetições deste experimento seria necessário para afirmar que estas diferenças estariam relacionadas ao tamanho do T-DNA ou ao mero acaso.

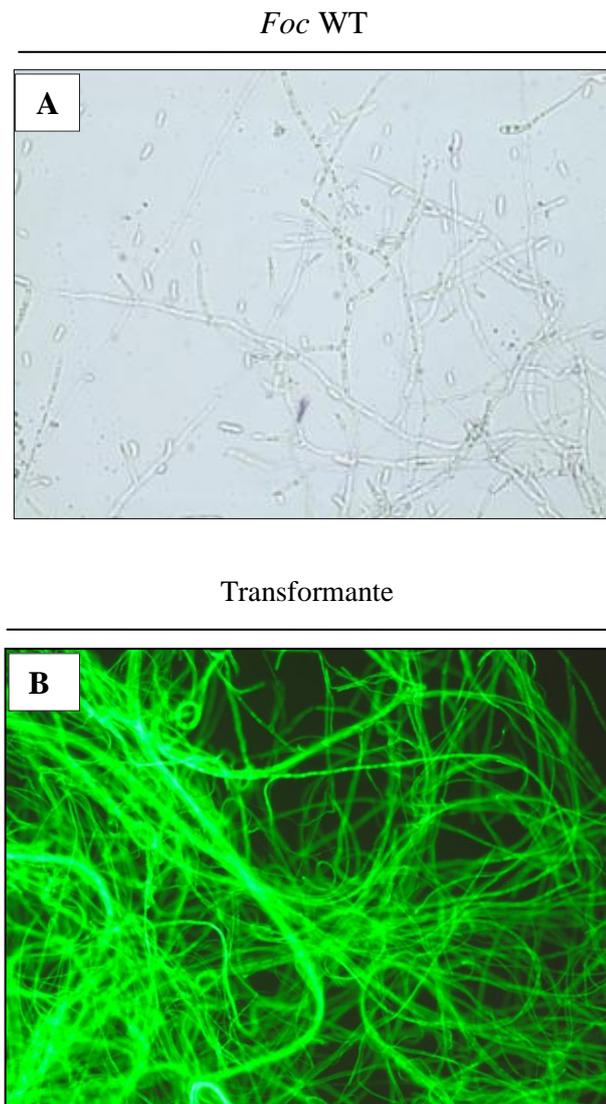


Figura 4: Imagem de micélios e esporos do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* linhagem selvagem e linhagem transformante com cassete *hph/gfp*. Em A: Massa micelial e esporos do *Foc* selvagem; Em B: transformantes expressando a proteína verde fluorescente na massa micelial.

A análise da deleção do gene *SGE1* por recombinação homóloga foi realizada por PCR conforme esquema representado na Fig. 2. Como o gene *SGE1* é cópia única, a identificação dos *knockout* pode ser facilmente realizada e a confirmação da integração homóloga ou ectópica é realizada tanto na região 5' do gene quanto na região 3', por meio da amplificação entre a marca de seleção e uma região fora da sequência utilizada para recombinação homóloga.

Dos transformantes obtidos (173), nenhum apresentou recombinação homóloga (RH), como é mostrado na Fig. 5. Este resultado pode ter ocorrido devido a diversos fatores, e devido às dificuldades de obtenção de RH em fungo filamentososo (KÜCK & HOFF, 2010).

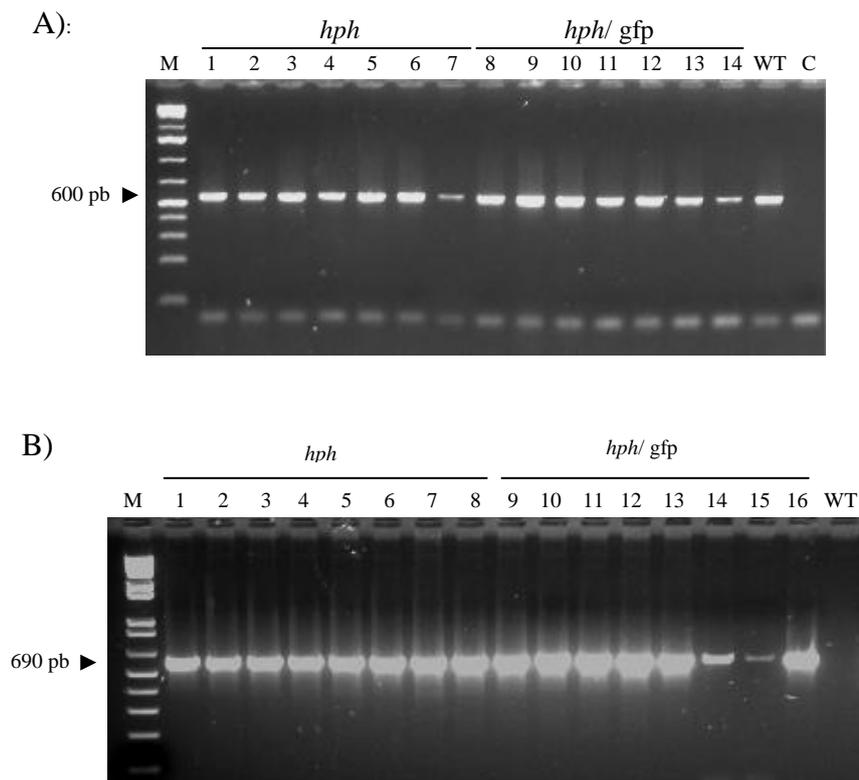


Figura 5: Caracterização molecular dos transformantes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* para análise da ocorrência de recombinação homóloga ou integração ectópica utilizando os *primers* 1 e 2 referentes a região interna do *SGE1* e da região do *hph*. **Fig. A:** Amplificação do gene alvo (*SGE1*) por PCR; M – marcador 1 Kb plus (Invitrogen); Os números 1-7 representam os transformantes contendo o gene que confere resistência a higromicina (*hph*); 8-14 transformantes obtidos contendo o gene *hph* e *gfp*; WT – representa linhagem selvagem; C - controle negativo. **Fig. B:** Amplificação do gene da *hph* com os mesmos transformantes da fig. 5A; M – marcador 1 Kb plus (Invitrogen); 1-8, transformantes obtidos com gene *hph*; 9-16, transformantes com cassete *hph* e *gfp*; WT - *Foc* selvagem.

Muitos fungos filamentosos tem maior possibilidade de ocorrência de integração ectópica (MEYER *et al.*, 2007; FENG *et al.*, 2014), isso pode ser atribuído a alguns fatores, como tamanho das sequências flanqueadoras e ao sistema de reparo de DNA que pode induzir a integração ectópica (NHEJ - Non-homologous end joining).

Vários trabalhos já demonstraram a dificuldade de obtenção de *Knockout* em função do tamanho das sequências flanqueadoras. Wilson *et al.* (2002) obtiveram 23 linhagens transformantes do fungo filamentosso *Leptosphaeria maculans*, dentre elas, duas possuíam ocorrência de *knockout*, utilizando sequências flanqueadoras 5' de 3,7 kb e 3' de 3,2 kb. Porém, quando utilizou sequências flanqueadoras com tamanho similar ao empregado neste estudo, 1,4 kb na região 5' e 1,5 kb na 3', não conseguiu nenhum transformante com RH dentre os 89 transformantes analisados. São sugeridas para *L. maculans*, sequências flanqueadoras superiores a 7 kb, para uma eficiente ocorrência de recombinação homóloga (WILSON *et al.*, 2002; FENG *et al.*, 2014). Outro caso que também necessitou de sequências flanqueadoras maiores foi relatado por Casqueiro *et al.* (1999), onde no experimento utilizando sequências curtas não conseguiu nenhum evento de RH ao gene *lys2*, obtendo somente quando utilizou sequências maiores de 4,3 kb e 3,0 kb.

A presença do complexo-multimérico de proteínas envolvidas no reparo do DNA na célula, também influencia na redução da ocorrência de RH. Estas proteínas foram conservadas ao longo do processo evolutivo, estando presente em todas as células eucarióticas (CRITCHLOW & JACKSON, 1998; HEFFERIN & TOMKINSON, 2005). Os complexos *Ku70* ou *Hdf1/ Ku80* ou *Hdf2* com função de ativar a ligase, *Rad50/Mre11/Xrs2* com atividade catalítica dependente de ATP e *Lig4p/lif1* capaz de ligar-se as extremidades do DNA, juntos promovem uma frequência de integração ectópica significativa em fungos filamentosos (CRITCHLOW & JACKSON, 1998; HEFFERIN & TOMKINSON, 2005). Alguns trabalhos já comprovaram que em linhagens mutantes com ausência de alguma dessas proteínas pode aumentar a ocorrência de RH de 50% a 100%, contrastando com o resultado encontrado em linhagens selvagens, cuja frequência é de 10 a 30%, e em muitos casos ocorre somente de 1% a 2% (KÜCK & HOFF, 2010).

Krappmann (2007), conseguiu alcançar uma eficiência de *knockout* de 90%, utilizando regiões flanqueadoras com 500 pb, comprovando que o tamanho destas regiões não influenciam no processo, quando se utiliza linhagens mutantes para as proteínas do complexo-multimérico. Outro caso foi a comparação da linhagem *Trichoderma virens* com deficiência da proteína *Ku70* com o isolado selvagem realizado por Catalato *et al.* (2011), que resultou no aumento de 88% da ocorrência de *knockout* no gene alvo contra 15% das linhagens selvagens. Takahashi *et al.* (2009), utilizando mutantes de *Aspergillus oryzae* para as proteínas *ku70* e *lig4p* conseguiu também aumentar a eficiência do processo de deleção de genes. Já em *Fusarium verticillioides* apresentando deficiência para a proteína *Ku70* foi alcançado uma eficiência de 85% de mutantes com RH, sendo comprovado também que a ausência dessa

proteína não afeta o fungo fenotipicamente, nem o seu desenvolvimento, o metabolismo secundário e a virulência (Choi & Shim, 2008), indicando que a ausência dessas proteínas aumenta a possibilidade de RH, beneficiando estudos de *knockout* gênico em larga-escala em diversos fungos filamentosos.

4 CONCLUSÃO

Levando em consideração as dificuldades para a ocorrência de recombinação homóloga, foi possível concluir que para obtenção de sucesso no *knockout* de genes em *Foc*, é necessário o desenvolvimento e avaliação de alguns processos, como: 1- o desenvolvimento de um protocolo de transformação eficiente; 2- a avaliação do tamanho da região para RH; e 3 - a obtenção de linhagens com deleção dos genes *ku 70* e *ku 80*, para que posteriormente, as linhagens obtidas sejam utilizadas no processo de transformação em estudos de função gênica, e possivelmente apresentem maior eficiência de *knockout*.

5 REFERÊNCIAS

1. CASQUEIRO, J.; GUTIERREZ, S.; BANUELOS, O.; HIJARRUBIA, M. J.; MARTIN, J. F. Gene targeting in *Penicillium chrysogenum*: disruption of the *lys2* gene leads to penicillin overproduction. **J Bacteriol.** v.181, p.1181–1188, 1999.
2. CATALANO, V.; SEIBOTH, B.; SARROCCO, S.; VANNACCI, G.; KUBICEK, C. P.; SEIDL-SEIBOTH, V. Use of a non-homologous end-joining-deficient strain (delta-Ku70) of the biocontrol fungus *Trichoderma virens* to investigate the function of the laccase gene *lcc1* in sclerotia degradation. **Curr Genet.** v. 57(1), p.13–23, doi: 10.1007/s00294-010-0322-2, 2011.
3. CHOI, Y-E.; SHIM, W-B. Enhanced Homologous Recombination in *Fusarium verticillioides* by Disruption of FvKU70, a Gene Required for a Non-homologous End Joining Mechanism. **Plant Pathol. J.** v. 24(1), p. 1-7, 2008.
4. CRITCHLOW, S. E.; JACKSON, S. P. DNA end-joining: from yeast to man. **Cell press.** v. 23 (10), p. 394–398. [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01284-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01284-5). 1998.
5. DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolamento of plant DNA from fresh tissue. **Focus.** v. 12, p. 13-14, 1990.
6. GLENN, A. E. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. **Animal Feed Science and Technology.** v. 137, p. 213–240, 2007.
7. GORDON, T. R.; MARTYN, R. D. The Evolutionary Biology of *Fusarium Oxysporum*. **Annu. Rev. Phytopathol.** v.35 (28), p.111, 1997.
8. GUO, L.; HAN, L.; YANG, L.; ZENG, H.; FAN, D. *et al.* Genome and Transcriptome Analysis of the Fungal Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Causing Banana Vascular Wilt Disease. **PLoS ONE.** v. 9 (4): e95543. doi:10.1371/journal.pone.0095543, 2014.
9. ESNAKULA, A. K.; SUMMERS, I.; NAAB, T. J. Fatal Disseminated *Fusarium* Infection in a Human Immunodeficiency Virus Positive Patient. **Case Reports in Infectious Diseases.** v. 2013, p. 1-5, 2013.

10. FENG, J.; ZHANG, H.; STRELKOV, S. E.; HWANG SHEAU-F. The LmSNF1 Gene Is Required for Pathogenicity in the *Canola Blackleg* Pathogen *Leptosphaeria maculans*. **PLoS ONE**. v.9 (3). DOI: 10.1371/journal.pone.0092503, 2014.
11. HEFFERIN, M. L.; TOMKINSON, A. E. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. **DNA Repair**. Mini review. v. 4, p. 639-648, 2005.
12. HUANG, G.; WANG, H.; CHOU, S.; NIE, X.; CHEN, J.; LIU, H. Bistable expression of WOR1, a master regulator of white–opaque switching in *Candida albicans*. **PNAS**. v. 103(34), p.12813–12818, 2006.
13. JIANG, D.; ZHU, W.; WANG, Y.; SUN, C.; ZHANG, K.Q.; YANG, J. Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: recent advances and new strategies. **Biotechnol Adv**. v. 31(8), p.1562-74, 2013.
14. JONKERS, W.; DONG, Y.; BROZ, K.; KISTLER, H. C. The Wor1-like Protein *Fgp1* Regulates Pathogenicity, Toxin Synthesis and Reproduction in the Phytopathogenic Fungus *Fusarium graminearum*. **PLoS Pathog**. v.8(5). e1002724. doi:10.1371/journal.ppat.1002724, 2012.
15. KRAPPMANN S. Gene targeting in filamentous fungi: the benefits of impaired repair. **Fungal Biol Rev**. v. 21, p. 25–29, 2007.
16. KÜCK, U. & HOFF, B. New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. **Appl Microbiol Biotechnol**. Mini-Review. v. 86, p. 51–62. DOI 10.1007/s00253-009-2416-7, 2010.
17. LESLIE & SUMMERELL. The *Fusarium* Laboratory Manual. **Blackwell Publishing**. Primeira edição. 2006.
18. LIEVENS, B.; HOUTERMAN, P. M.; REP, M. Ejector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other formae specialis. **Microbiology Letter**. v.300, p.201-215, 2009.
19. MA, L. J.; VAN DER DOES, H. C.; BORKOVICH, K. A.; COLEMAN, J. J.; DABOUSSI, M. J. *et al.* Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. **Nature**. v. 464, p. 367–373, 2010.

20. MELDRUM, A.; FRASER-SMITH, S.; TRAN-NGUYEN, L. T. T.; DALY, A. M.; AITKEN, E. A. B. Presence of putative pathogenicity genes in isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from Australia. **Australasian Plant Pathol.** v.41, p.551–557, 2012.
21. MEYER, T. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* for pathogenicity gene analysis. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Programa de Pos-graduação em Microbiologia. University of Pretoria. Pretória. 2008.
22. MEYER, V.; ARENTSHORST, M.; EL-GHEZAL, A.; DREWS, A. C.; KOOISTRA, R, *et al.*; Highly efficient gene targeting in the *Aspergillus niger* kusA mutant. **J Biotechnol.** v. 128, p. 770–775, 2007.
23. MICHIELSE, C. B.; VAN WIJK, R.; REIJNEN, L.; MANDERS, E. M. M.; BOAS, S., *et al.* The Nuclear protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* is required for parasitic growth. **PLoS Pathog.** v.5(10), e1000637, 2009.
24. MICHIELSE, C. B.; BECKER, M.; HELLER, J.; MORAGA, J.; COLLADO, I. G.; TUDZYNSKI, P. The *Botrytis cinerea* *Reg1* Protein, a Putative Transcriptional Regulator, Is Required for Pathogenicity, Conidiogenesis, and the Production of Secondary Metabolites. **The American Phytopathological Society.** v. 24 (9), p. 1074–1085. doi:10.1094/ MPMI -01-11-0007, 2011.
25. NGUYEN, V. Q.; SIL, A. Temperature-induced switch to the pathogenic yeast form of *Histoplasma capsulatum* requires Ryp1, a conserved transcriptional regulator. **PNAS.** v.105(12), p.4880–4885, 2008.
26. NUCCI, M.; ANAISSIE, E. *Fusarium* Infections in Immunocompromised Patients. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 20(4), p. 695, 2007.
27. PLOETZ, R.C. *Fusarium* wilt (Panama disease). In: Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests. CIRAD/FLHOR. Montpellier, France. Ganry, J. (ed.). p. 149-158, 393 pp, 1993.
28. PLOETZ, R.; PEGG, K. *Fusarium* wilt of banana and Wallace's line: was the disease originally restricted to his Indo-Malayan region? **Australasian Plant Pathology.** v. 26, 239–49, 1997.

29. REP, M.; VAN DER DOES, H. C.; MEIJER, M.; VAN WIJK, R.; HOUTERMAN, P. M.; DEKKER, H. L.; DE KOSTER, C. G.; CORNELISSEN, B. J. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. **Molecular Microbiology**. v.53(5), p.1373-83, 2004.
30. SNYDER, W. C.; HANSEN, H. N. The species concept in *Fusarium*. **Am. J. Bot.** v.27, p. 64–67, 1940.
31. SRIVASTAVA, S. K.; HUANG, X.; BRAR, H. K.; FAKHOURY, A. M.; BLUHM, B. H. *et al.* The Genome Sequence of the Fungal Pathogen *Fusarium virguliforme* That Causes Sudden Death Syndrome in Soybean. **PLoS ONE**. v. 9(1): e81832. doi:10.1371/journal.pone.0081832, 2014.
32. SUTHERLAND, R.; VILJOEN, A.; MYBURG, A. A.; VAN DEN BERG, N. Pathogenicity associated genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. **South African Journal of Science**. v. 109 (5/6), 2013.
33. TAKAHASHI, T.; JIN, F. J.; KOYAMA, Y. Nonhomologous end-joining deficiency allows large chromosomal deletions to be produced by replacement-type recombination in *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genet Biol**. v. 46, p. 815–824, 2009.
34. TRINDADE *et al.* Doenças e Métodos de controle. In: O cultivo da bananeira. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 279, cap. IX, 1 ed., 2004.
35. VISSER, M.; GORDON, T.; WINGFIELD, B.; WINGFIELD, M.; VILJOEN, A. Transformation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, causal agent of *Fusarium* wilt of banana, with the green fluorescent protein (GFP) gene. **Australasian Plant Pathology**. v. 33, p. 69-75, 2004.
36. WILSON, L. M.; IDNURM, A.; HOWLETT, B. J. Characterization of a gene (*sp1*) encoding a secreted protein from *Leptosphaeria maculans*, the blackleg pathogen of *Brassica napus*. **Mol Plant Pathol**. v. 3, p. 487–493. 2002.
37. ZWIERS, L. H.; DE WAARD, M. A. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*- mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Current Genetic**. v. 39, p. 388-393, 2001.

CAPITULO II

Silenciamento pós-transcricional do gene *SGE1* induzido por dsRNA *hairpin* em *Fusarium oxysporum cubense*, agente causal do mal-do-Panamá

1 INTRODUÇÃO

O fungo filamentoso *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder & Hansen (*Foc*) é o agente causal do mal-do-Panamá em bananeira. A doença provoca grandes prejuízos a áreas produtoras de banana, seja na Ásia, África, Austrália, e nas Américas tropicais (PLOETZ, 1993; PLOETZ & PEGG, 1997). Este fungo apresenta algumas características importantes como, capacidade de atingir o sistema vascular de plantas (bananeiras e helicônias) no mundo todo, reprodução assexuada, e produção de diferentes formas de esporos (macroconídios, microconídio e clamidósporos), (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

O processo de infecção gerado pelo *Foc* se divide em várias etapas, iniciando pela fase de reconhecimento das raízes, devido à liberação de exsudato pela planta, atacando a superfície das raízes, penetrando e proliferando as hifas progredindo até o rizoma e pseudocaule pelo sistema vascular da planta (xilema) (MICHIELSE & REP, 2009; XIAO *et al.*, 2013).

A *formae speciales* (f. sp.) *cubense* está classificada em quatro raças (R1, R2, R3 e R4 subdividida em TR4 e ST4) patogênicas a bananeiras, com diferentes níveis de virulência, exceto R3 que é patogênica a *Heliconia spp.* (PLOETZ, 1990). O uso de cultivares resistentes é a principal estratégia de controle da doença, sendo considerada uma forma econômica e ambientalmente mais viável. Contudo, o aumento da variabilidade genética nesse fitopatógeno ocasiona a quebra da resistência, prejudicando o uso de cultivares por longos períodos, havendo a constante necessidade de obter novas cultivares resistentes ou estabelecer novas estratégias de controle da doença.

Duas possíveis hipóteses têm sido propostas para justificar o aumento da variabilidade em *Fusarium oxysporum licopersici* (*Fol*) (organismo modelo da espécie *oxysporum*): 1) a atuação de elementos transponíveis, presentes em alta quantidade no genoma do *Fol* quando comparado a outras espécies de *Fusarium* (RONCERO *et al.*, 2003; MA *et al.*, 2010) e, 2) a presença do ciclo parassexual, que resulta da formação de heterocáριο por meio da anastomose de hifas com crossing-over mitótico, podendo haver troca de material genético entre isolados não patogênico e patogênico (TEUNISSEN *et al.*, 2002; MA *et al.*, 2010).

Os avanços nas técnicas da biologia molecular têm contribuído bastante para a identificação e investigação da função de genes presentes em fitopatógenos de grande importância agrônômica, dentre elas vem se destacando a metodologia de RNAi, que tem

demonstrado ser eficiente na determinação da função gênica, sendo auxiliada seja pela agrotransformação, protoplastização, transformação por CaCl_2 , dentre outras estratégias .

O silenciamento por meio de RNAi (*Knockdown*) é uma metodologia considerada vantajosa, pois evita problemas que são encontrados normalmente em metodologias como *knockout*, onde é necessário a interrupção ou deleção de genes por recombinação homóloga, além disso, é altamente específica ao mRNA alvo, e sua eficiência não é afetada, quando na presença de núcleos dicarióticos e genes multicópias (FIRE *et al.*, 1998; NAKAYASHIKI *et al.*, 2005; FRANÇA *et al.*, 2010). Foram desenvolvidos até o momento algumas estratégias para promover o silenciamento via RNAi, dentre elas está o uso de vetores contendo cassetes para produção de dsRNA *hairpin*, que possibilitam um silenciamento permanente do mRNA alvo, diferenciando dos dsRNAs e siRNA sintéticos que produzem um silenciamento transiente.

Atualmente, com essa constante confirmação da eficiência da maquinaria de RNAi no silenciamento pós-transcricional e presença nos mais diversos organismos, incluindo o *Foc*, esta metodologia pode ser utilizada como uma ferramenta para analisar se a redução no nível de expressão de genes envolvidos na patogenicidade e/ou virulência, poderá influenciar no processo de infecção na planta hospedeira, e assim compreender os mecanismos moleculares de interação fitopatógeno - hospedeiro, desde o contato inicial até o estabelecimento da doença.

O gene *SGE1* (*SIX Gene Expression 1*) identificado no *F. oxysporum* f. sp. *licopersici* - *Fol* por MICHIELSE e colaboradores (2009), codifica uma proteína de mesmo nome com função de fator transcricional, capaz de ativar a transcrição de genes efetores que codificam uma família de proteínas chamada *Six* (*Secreted in xylem*), envolvidas diretamente no processo de infecção na planta hospedeira (MICHIELSE *et al.*, 2009), e algumas delas já foram detectadas também no *Foc* (MELDRUM *et al.*, 2012).

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar se o gene *SGE1* possui a mesma atividade na *formae speciales cubense* e avaliar as mudanças morfofisiológicas e a patogenicidade a partir de transformantes com diferentes níveis de silenciamento de *SGE1*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos e Condições de Cultivo

Isolados de *Foc* R1(VCG não definido) e R2 (VCG 0124) cedidos pelo Dr. Miguel Angel Dita (Embapa Mandioca e Fruticultura, BA) e linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 e LBA1100, foram utilizados nos experimentos de transformação genética. O *Foc* R1 e R2 foram rotineiramente cultivados em meio PDA (10 g/L⁻¹ de dextrose, 16 g/L⁻¹ de ágar e 250 g/L⁻¹ de discos de batata) mantidos em estufa a 25° C. Para obtenção de esporos, cubos com ± 0,5 mm² de micélios retirados de placas de petri com PDA foram colocados em frascos contendo 50ml de PDB ¼, e mantidos sob agitação de 150 rpm por 48 horas. Linhagens AGL1 e LBA1100 de *Agrobacterium tumefaciens* foram transformadas com vetor binário carregando a construção para silenciamento do gene *SGE1* por meio de RNAi (Fig. 1), e foram cultivadas em meio de cultura LB-manitol sólido e líquido (10 g/L⁻¹ triptona, 5 g/L⁻¹ extrato de levedura, 2,5 g/L⁻¹ NaCl, 16 g/L⁻¹ de ágar, 10 g/L⁻¹ de manitol) suplementado com antibióticos (75 µg/mL⁻¹ de carbenicilina e 50 µg/mL⁻¹ canamicina para linhagem AGL1 e 250 µg/mL⁻¹ de espectinomicina e 50 µg/mL⁻¹ de canamicina para linhagem LBA1100), incubadas a 28°C por 24-48 h.

2.2 Construção do vetor binário para silenciamento do gene *SGE1* de *F. oxysporum cubense* por RNA de interferência (*knockdown*)

O silenciamento via RNAi (*knockdown*) foi realizado por meio da estratégia de dsRNA *harpin* específico para silenciar transcritos produzidos pelo gene alvo (*SGE1*) de *Foc*, utilizando o vetor pFANTAi4 (gentilmente cedido pelo Dr. Thomas D. Sullivan da Wisconsin University). Um fragmento de 564 pares de bases do gene *SGE1* foi clonado no vetor pFANTAi4, no sentido senso e anti-senso. Estão presentes também neste cassete, sequências senso e anti-senso do gene repórter *gfp*, uma região espaçadora, e uma região terminadora todos sob o controle do promotor constitutivo da histona 2AB (H2AB) de *H. capsulatum*, e o gene que confere resistência a higromicina (*hph*) (Fig. 1).

sob agitação constante de 80 rpm durante 4 horas. O procedimento seguiu daqui em diante, inteiramente, de acordo com a metodologia descrita em Visser *et al.* (2004).

Linhagens de *A. tumefaciens* AGL1 e LBA1100 contendo o vetor pFANTAi4 foram cultivadas em meio LB-manitol líquido suplementado com antibióticos (75 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de carbenicilina e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de espectinomicina para AGL1; 250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de espectinomicina e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ canamicina para LBA1100), incubadas em shaker (200 rpm), a 28°C por 24 h. A cultura de bactérias foi centrifugada e descartado o sobrenadante para em seguida adicionar o meio mínimo – MM (K-buffer pH 6,8, CaCl_2 1%, FeSO_4 0,1%, NH_4NO_3 20%, M-N, Elemento de esporos, Glicerol 50%) e novamente incubada em 200 rpm, a 28°C por mais 18 h. Posteriormente a cultura de bactérias foi centrifugada e ressuspensa em meio de indução - IM (K-buffer pH 6,8, CaCl_2 1%, FeSO_4 0,1%, NH_4NO_3 20%, M-N, Elemento de esporos, Glicerol 50%, MES 1M pH 4,8, Glicerol 20%, acetoseringona (AS) 200 μM) e mensurada a densidade óptica ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) para a realização das diluições de 0,15 e 0,5. Aguardou-se cerca de ± 3 a 4 h para que a cultura de bactérias com OD 0,15 alcançasse OD de 0,18 e a OD de 0,5 alcançasse OD 0,6-0,8.

Conídios e protoplasto do fungo e *Agrobacterium* foram co-cultivados na proporção de 1:1 (3 mL de protoplastos ou esporos de *Foc* e 3 mL de cultura de *Agrobacterium*), e incubados a 22°C, durante 48h e 96h. Um total de 100 μL de co-cultivo foi espalhado em placas de petri contendo meio PDA suplementado com antibióticos (130 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ higromicina-B e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ cefotaxina) para seleção de linhagens transformantes, em seguida mantidos a 25°C em incubadora até a possível visualização de micélios dos transformantes. O restante do co-cultivo foi centrifugado, descartado o IM e adicionado o mesmo volume de 6 mL de meio PDB, suplementado com 130 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ higromicina-B e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ cefotaxina, dividindo em 3 alíquotas de 2 mL cada, mantidos em *shaker* (150 rpm) a 25°C até a possível visualização de crescimento de micélios. Para os transformantes obtidos por meio do cultivo em meio PDB, foi realizado procedimento de cultura monospórica.

2.4 Caracterização dos transformantes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

2.4.1 Extração de DNA

Os isolados selvagem e os transformantes obtidos foram crescidos em meio PDB sob agitação de 150 rpm por sete dias para obtenção de massa micelial. A extração de DNA total foi realizada de acordo com o método de CTAB (Doyle & Doyle, 1990). Em seguida, foi

tratado com RNase (Invitrogen) e submetido a quantificação em NANODROP e gel de agarose a 0,8%.

2.4.2 Confirmação dos transformantes

A presença do T-DNA no genoma dos possíveis transformantes foi confirmada pela detecção do gene de resistência a higromicina (*hph*) por meio da amplificação com os *primers* (*hph* F – TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT e *hph* R – CGCGTCTGCTGCTCCATAAAG). A reação de amplificação ocorreu com a adição de cerca de 50 ng de DNA total dos transformantes e do fungo não transformado (selvagem). A reação de PCR foi realizada no volume final de 15 μ L, contendo 0,3 μ M de *primers hph* F e R, 1,5 μ L de tampão 1X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,4; 1% Triton X-100), 1,2 μ L MgCl₂ (1,5 mM), 1,6 μ L dNTP a 0,8 mM, 1U Taq polimerase (Phonetría) e água destilada. As condições de PCR foram as seguintes: 94°C por 3 min. para desnaturação inicial, seguindo 30 ciclos a 94°C por 30 seg., 66°C por 30 seg. para anelamento dos *primers*, 72°C por 1 min. para síntese da fita de DNA e extensão final de 72°C por 10 min. A visualização dos produtos amplificados foi realizada por meio de eletrofore em gel de agarose a 1,5%.

2.4.3 Teste de Estabilidade Mitótica dos Transformantes

Transformantes isolados por cultura monospórica foram mantidos por 20 dias crescendo em meio seletivo (PDA suplementado com 130 μ g/mL⁻¹ higromicina), posteriormente, 13 transformantes obtidos de quatro experimentos diferentes foram selecionados para os testes de estabilidade e expressão. Em seguida, fragmentos das extremidades das colônias dos transformantes foram transferidos para placas de Petri com PDA ausente de antibiótico, durante cinco sucessivas repicagens em intervalos de quatro dias. Após esse procedimento, fragmentos de micélios provenientes da última repicagem, foram novamente transferidos para placas contendo PDA suplementado com 130 μ g/mL⁻¹ higromicina B, incubados em B.O.D. a 25 °C.

2.4.4 Análise do crescimento vegetativo e esporulação

Para observar a influência do processo de silenciamento do *SGE1* no desenvolvimento dos transformantes, foi realizada uma comparação do tamanho radial das colônias de 13 transformantes selecionados com o tamanho radial da colônia do fungo não transformado

(*Foc* selvagem). As análises foram realizadas colocando pequenos discos de micélios (todos com mesmo tamanho) em placas de Petri com PDA suplementado com $130 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ higromicina B, obtidos após teste de estabilidade mitótica, e foram mantidos em incubadora a 25°C . Após 7 dias de cultivo, o crescimento vegetativo dos transformantes foi comparado ao selvagem.

No processo de avaliação da esporulação, pequenos discos de micélios dos transformantes e do *Foc* selvagem utilizado como controle, foram colocados em frascos contendo 50 mL de PDB^{1/4} suplementado com higromicina, e mantidos a 25°C sob agitação a 150 rpm, durante 3-7 dias. As soluções com micélio e esporos foram filtradas com gaze estéril para que fosse obtida uma suspensão de esporos, os quais foram contados e visualizados no microscópio óptico utilizando câmara de Neubauer. Os procedimentos foram realizados em triplicata.

2.4.5 Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)

A análise da expressão gênica das 13 linhagens transformantes selecionadas foi mensurada utilizando micélio coletado antes e depois do teste de estabilidade mitótica. O RNA total da massa micelial dos transformantes foi extraído utilizando o RNeasy Mini Kit (QIAGEN), conforme especificações do fabricante. A quantificação foi realizada por espectrofotometria (Nanodrop - Thermo) e a qualidade confirmada em gel de agarose. Adicionalmente, $4\mu\text{g}$ de RNA total foi tratado com DNase (Invitrogen) e checado em gel de agarose 1,2% após digestão.

O cDNA foi sintetizado utilizando o Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. A confirmação da ausência de DNA genômico foi realizada por PCR com a amplificação do gene *tef*, que apresenta um amplicon de 469 pb a partir do DNA genômico e de aproximadamente 200 pb com cDNA.

A padronização e análise via qRT-PCR foi realizada com Fast SYBR Green Master Mix utilizando o equipamento 7500 Real time PCR System (Applied Biosystems). Foram testadas concentrações de *primers* de 0,25 nM a 0,7 nM de quatro *primers* normalizadores (*tef*, β -*tubulina*, *g6pd* e *gapdh*) e dois *primers* internos (*SGE1ds* e *SGE1silence*), além de diferentes concentrações de cDNA 25ng, 50ng, 100ng e diluição de 1:10 (v/v). O cDNA usado na reação foi o diluído na proporção de 1:10 (v/v), sendo que $2\mu\text{L}$ dessa diluição foram utilizados na reação de qRT-PCR, juntamente com 0,25 nM de *primers* internos referentes as

regiões que amplificam os transcritos dos dsRNAs e do *SGE1*, e três dos quatro normalizadores foram selecionados (*tef*, *g6pd* e *gapdh*), devido a *β -tubulina* ter apresentado maior coeficiente de variação de expressão, todos os primers são mostrados na Tabela 1. As reações foram realizadas em triplicatas.

Tabela 1: Sequências de oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

<i>Primers</i>	Número de acesso no NCBI	Identificação do gene	<i>Primer forward</i> 5' - 3'	<i>Primer reverse</i> 5' - 3'	Tamanho do produto
<i>SGE1</i>	-	<i>SGE1knockout</i>	ATCTGGTCGGTTC ACTCGTC	ACCACGCCTGAC CATAAGAC	600 pb
<i>hph</i>	-	Higromicina-B	TTCGATGTAGGAG GGCGTGGAT	CGCGTCTGCTGC TCCATACAAG	690 pb
SGEds	-	dsRNA – <i>SGE1</i>	TCTGTCCCTTTCCA AACAGG	CGTACGAGTCGA CGAGTGAA	100 pb
SGEsilence	-	Gene <i>SGE1</i>	TTGCTAGTCCTGT GGATGA	TGTGTGTGGGAA AGCCAATA	175 pb
<i>tef</i>	AF008486.1	Elongation factor	ACAAGCGAACCAT CGAGAAG	GATGAAATCAC GGTGACCG	243 pb
<i>β-Tubulina</i>	AF008529.1	β -tubulin gene	CCCCGAGGACTTA CGATGTC	CGCTTGAAGAGC TCCTGGAT	68 pb
<i>g6pd</i>	XM_381455.1	Gibberella zeae PH-1 glucose- 6-phosphate 1- dehydrogenase	ACATTCCCCGAAA CGAGCTT	ATGCTGAGACCA GGCAGCTT	88 pb
<i>gapdh</i>	XM_386433.1	Gibberella zeae PH-1 glyceraldehyde 3- phosphate	CCAGATCAAGAAG GTCATCAAG	GTTGGTGTGGCC GTTGAGAT	106 pb

Os *primers* internos chamados de *SGE1*ds *F* e *R*, foram desenhados para amplificação da região utilizada na produção de dsRNA, produzindo um fragmento de 100 pb presente na sequência de 564 pb. Os *primers* para quantificação do silenciamento do gene *SGE1* foram chamados de *SGE1*silence *F* e *R*, capazes de produzir um fragmento com 175 pb fora da região que foi produzido o dsRNA, uma vez que, o gene é composto por 993 pb (Fig. 2). Os 13 isolados selecionados foram analisados quanto a expressão relativa do dsRNA e silenciamento antes e depois do teste de estabilidade mitótica. Para a análise dos resultados foi empregado o método de expressão relativa calculada pelo $2^{-\Delta\Delta CT}$.

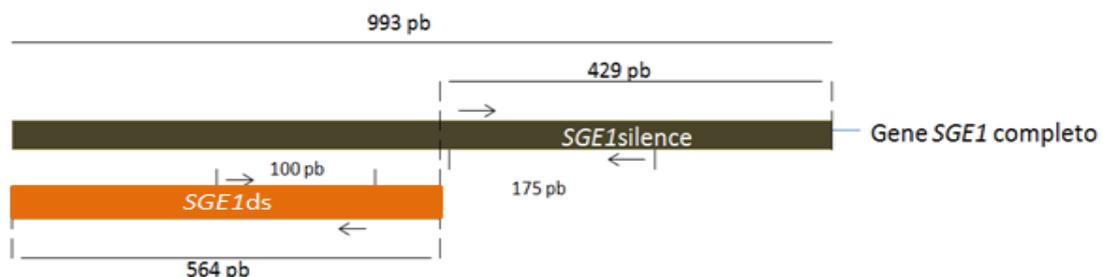


Figura 2: Esquema para caracterização molecular das linhagens selecionadas, utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo Tempo Real – RT-qPCR. Estratégia adotada para analisar os níveis de silenciamento das 13 linhagens selecionadas obtidas da transformação com o vetor pFANTAi4.

2.4.6 Teste de Patogenicidade

Na avaliação da patogenicidade foram utilizadas suspensões de esporos de dois transformantes, T4 e T11 (obtidos do processo de agrotransformação a partir de esporos e protoplastos), e da linhagem de *Foc* selvagem. As suspensões de conídios foram preparadas com o cultivo dos fungos em meio PDB^{1/4} durante 7 dias, em seguida filtrada em gaze estéril e ajustada a concentração para 10^6 esporos/mL⁻¹, e como controle negativo foi utilizado água ultrapura estéril. A inoculação foi realizada utilizando cultivares de bananeiras Maçã com cerca de 20 cm de comprimento, com as raízes lavadas e cortadas nas extremidades para facilitar a penetração do fungo, em seguida foram colocadas em *beckers* contendo 150 mL de suspensão de esporos na concentração de 10^6 esporos/mL⁻¹. As bananeiras utilizadas como controle foram colocadas em *beckers* contendo água ultrapura autoclavada. As plantas permaneceram na solução por 2 h e posteriormente, foram plantadas em copos de poliestireno contendo areia estéril, sendo mantidas nas condições de 25°C dia/ 22°C noite com foto período de 12 horas, e a cada 15 dias foram fertilizadas com solução de nutrientes Hoagland. O teste foi realizado em triplicata e após 45 dias de inoculação os sintomas foram avaliados, de acordo com o método de Mak *et al.*, (2004), seguindo uma escala de 1-5 para os sintomas externos e de 1-8 para os sintomas internos, descritos nas Fig. 3 e 4.

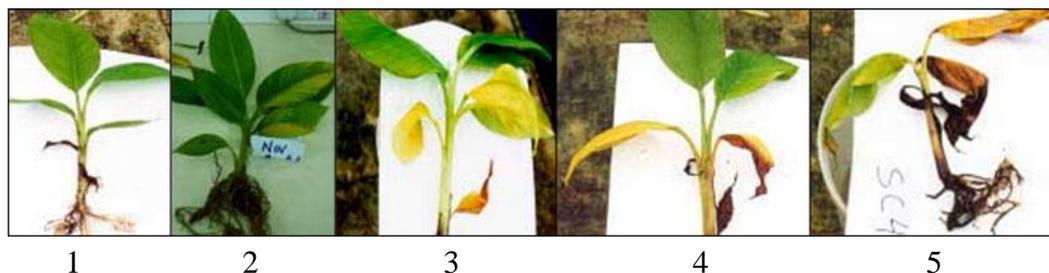


Figura 3: Escala de descrição do índice dos sintomas nas folhas conforme Mak e colaboradores (2004). 1. Planta saudável, sem listras de amarelecimento nas folhas; 2. Ligeiras listras e/ou amarelecimento nas folhas inferiores; 3. Listras e/ou amarelecimento nas folhas mais baixas; 4. Extensiva formação de estrias e / ou amarelecimento sobre a maior parte ou todas as folhas; 5. Planta morta

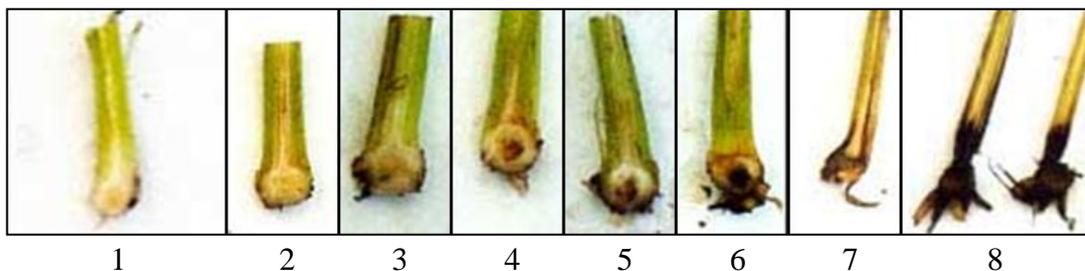


Figura 4: Escala de descrição do índice de descoloração do rizoma segundo Mak e colaboradores (2004). 1. Nenhuma descoloração do tecido da central do rizoma ou tecido circundante; 2. Não descoloração da região central do rizoma, descoloração na junção da raiz e do rizoma. 3. Descoloração da região central em 5%; 4. Descoloração da região central de 6-20%; 5. Descoloração da região central de 21-50%; 6. Mais de 50% da região central descolorida; 7. Descoloração de todo o rizoma; 8. Planta morta.

2.4.7 Reisolamento e Caracterização dos transformantes pós-inoculação

O reisolamento dos transformantes inoculado na bananeira, foi realizado a partir de fragmentos das raízes, do rizoma e do pseudocaule colocados em placas de Petri com meio agar-água, mantendo-os incubados a 25°C por 2 dias. Em seguida, foram transferidos para placas com PDA suplementados com higromicina, e incubados por 3 dias em BOD a 25°C. Os fungos que conseguiram crescer em meio seletivo foram submetidos ao processo de cultura monospórica e após 7 dias de crescimento em PDA realizou-se a extração de DNA total, para confirmação dos transformantes por meio da reação de PCR, utilizando os *primers* da higromicina (*hph*) e do gene *SGE1* (tabela 1).

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização Fenotípica e Molecular dos Transformantes

A fim de estudar o silenciamento do gene *SGE1* via RNAi e seu papel na patogenicidade e/ou virulência do *Foc*, foram testadas linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1 e LBA1100), a OD_{600nm} e o tempo durante o co-cultivo para obtenção dos transformantes. A transformação genética foi realizada a partir de esporos e protoplastos por meio da técnica de ATMT (*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation). Os transformantes foram obtidos apenas dos experimentos com a linhagem AGL1 em 96 h de co-cultivo e com OD 0,6, tanto para protoplastos quanto para esporos. A partir dos diferentes experimentos de transformação 120 transformantes monospóricos foram mantidos em meio seletivo com 130 µg/mL⁻¹ higromicina (Fig. 5), dos quais foram selecionados apenas 13 diferentes eventos, essa quantidade foi escolhida dada a impossibilidade de trabalhar com todos os transformantes nas análises quanto à estabilidade mitótica, morfofisiologia, nível de silenciamento e patogenicidade.



Figura 5: Imagem dos transformantes com integração do cassete para silenciamento do gene *SGE1* via dsRNA *hairpin*. Observa-se alguns dos transformantes obtidos, crescendo em meio seletivo, apresentando diferentes tamanhos radiais das colônias e pigmentação.

A avaliação por PCR em todos os transformantes selecionados confirmou a presença dos fragmentos com cerca de 690 pb referentes à amplificação do gene *hph*, indicando a presença do cassete com as sequências senso e anti-senso do gene *SGE1* para formação do dsRNA *hairpin* (Fig. 6). Além disso, todos os isolados analisados no teste de estabilidade mitótica do T-DNA inserido no genoma mantiveram a capacidade de crescer na presença de higromicina, demonstrando serem geneticamente estáveis, porém apresentaram variações no crescimento radial das colônias, com exceção dos transformantes T4 e T7 que apresentaram tamanho radial muito similar ao obtido na linhagem *Foc* selvagem crescendo em placas com PDA sem e com higromicina durante 7 dias. Os demais transformantes, tanto da

transformação com esporos, quanto protoplastos tiveram crescimento radial da colônia mais reduzido que o selvagem (Fig. 7).

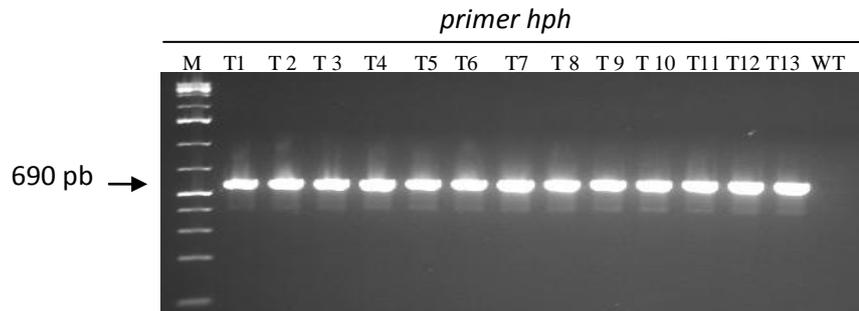


Figura 6: PCR com os 13 transformantes. coluna 1 – Marcador Kb plus; coluna 2-14 os transformantes selecionados para análise; e coluna 15 a linhagem selvagem, utilizada como controle negativo na amplificação por PCR.

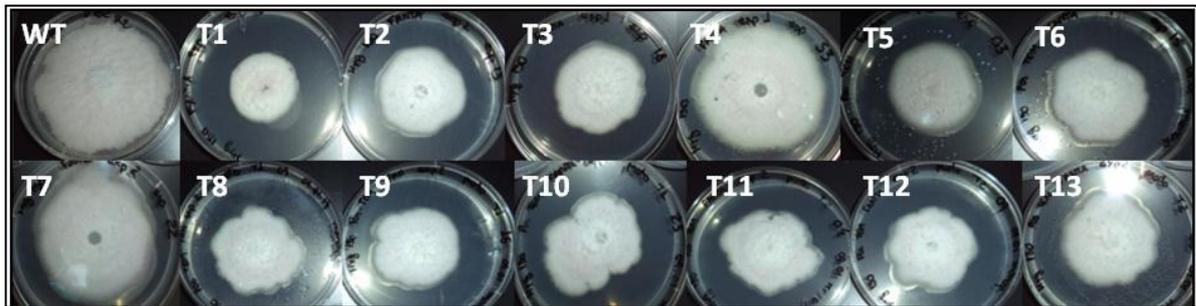
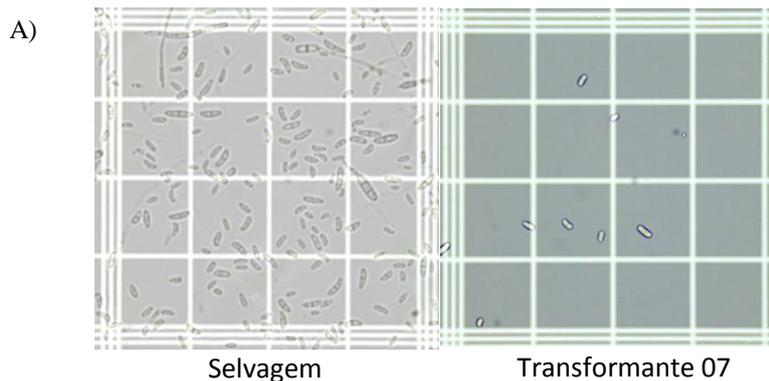


Figura 7: Imagens da linhagem selvagem e dos 13 transformantes de *F. oxysporum cubense* contendo o cassete para silenciamento via RNAi. O selvagem (WT) foi utilizado como controle para avaliação do desenvolvimento dos transformantes na presença de higromicina ($130 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) obtidos da transformação com esporos (T1 – T7) e protoplastos (T8 –T13).

Na esporulação também houve uma significativa redução na produção de esporos em todas as linhagens transformantes comparadas com o selvagem. Em 3 dias de cultivo em meio líquido a linhagem selvagem conseguiu alcançar a concentração de esporos acima de 10^6 esporos/ mL^{-1} , o que não foi possível obter com os transformantes nesse mesmo período, e com 5 dias alcançaram a concentração de 10^5 esporos/ mL^{-1} , alcançando a concentração que o selvagem conseguiu em 3 dia (10^6 esporos/ mL^{-1}) somente no sétimo dia de cultivo (Fig. 8).



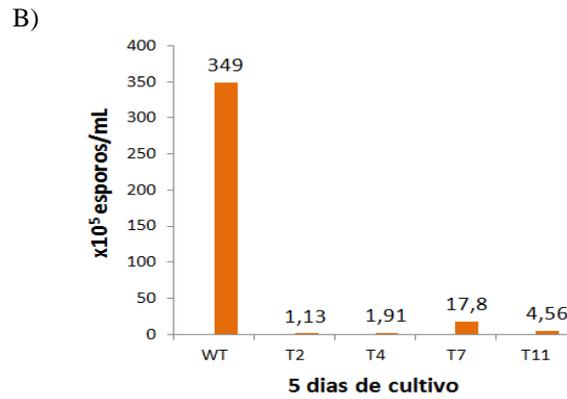


Figura 8: Influência do silenciamento na conidiogênese. Em A: Contagem de esporos da linhagem selvagem e transformante T7 com câmara de Neubauer em microscópio óptico com objetiva de 40x. Em B: Produção de microconídios das linhagens transformantes e selvagem durante 5 dias de cultivo em meio PDB^{1/4} com concentração 10⁵ esporos/mL.

3.2 Avaliação do Nível de Silenciamento do Gene *SGE1* em Linhagens Transformantes de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*

O silenciamento pós-transcricional do gene *SGE1* foi avaliado por meio da técnica de PCR quantitativo em Tempo Real – RT-qPCR. Visando evitar que uma possível contaminação com DNA genômico pudesse mascarar os resultados, antes da realização do RT-qPCR, o cDNA de todos os transformantes foram avaliados por meio de RT-PCR com o gene *tef*, cujo o amplicom é flanqueado por dois íntrons gerando um fragmento de 469 pb a partir do DNA genômico e de ~200pb do cDNA. Nas amostras onde foi identificada contaminação, novo tratamento com DNase e nova síntese foram realizados garantindo confiabilidade dos dados da expressão (Fig. 9). Já a padronização da concentração de *primers* e de cDNA permitiu escolher a melhor concentração que foi 0,25 nM para os *primers* e 2 µL da diluição 1: 10 (v/v) para os cDNAs.

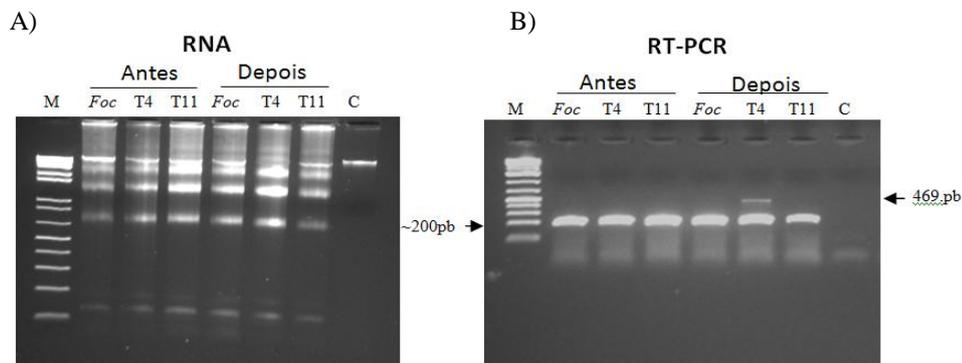


Figura 9: Quantificação de RNA e amplificação por RT-PCR com material de antes e depois do teste de estabilidade mitótica. Em A: Os RNAs extraídos representam o fungo selvagem, T4 e T11 antes e depois do teste de estabilidade mitótica; C – controle com DNA genômico. Em B: Amplificação do RT-PCR com *primer tef* em *Foc*, T4 e T11, com o RT-PCR do T4 depois do teste de estabilidade mitótica apresentando contaminação por DNA genômico; C - controle negativo.

Os níveis de expressão relativa das 13 linhagens selecionadas e do selvagem (WT) foram quantificados antes e depois do teste de estabilidade mitótica, com o objetivo de verificar a influência do processo de estabilidade no silenciamento do gene *SGE1*. A maioria dos transformantes analisados antes do teste de estabilidade mitótica ainda não apresentavam aumento significativo de expressão relativa da região utilizada para formação de dsRNAs, e não foi verificado silenciamento do gene *SGE1*, demonstrando que nesse período (aproximadamente 30 dias após a transformação) as expressões de dsRNA *hairpin* eram insuficientes para reduzir os níveis de mRNA do gene *SGE1* naquele momento.

Ao contrário destes resultados, foi possível observar aumentos consideráveis nos níveis de expressão da região utilizada para formação de dsRNA *hairpin* (*SGE1ds*) depois do teste de estabilidade em 9 transformantes (T1, T2, T3, T4, T6, T7, T9, T10 e T11). Porém nem todos os transformantes apresentaram redução significativa no nível de expressão relativa do gene *SGE1*, como o T1, T3, T9, T10 e T11. Nas linhagens T6 e T12, houve aumento do nível de expressão relativa do *SGE1ds*, mas também houve aumento no nível do *SGE1*silence. Já as linhagens que apresentaram concomitantemente os maiores níveis de silenciamento dos transcritos do mRNA alvo, verificado com a utilização dos *primers SGE1*silence, foram às linhagens T2, T4 e T7, todas obtidas da transformação com esporos. O silenciamento ficou em 30% para a linhagem T2, 27% para a T4 e 47% para a linhagem T7. Esses valores foram avaliados por meio dos cálculos de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e da média dos valores da quantificação relativa.

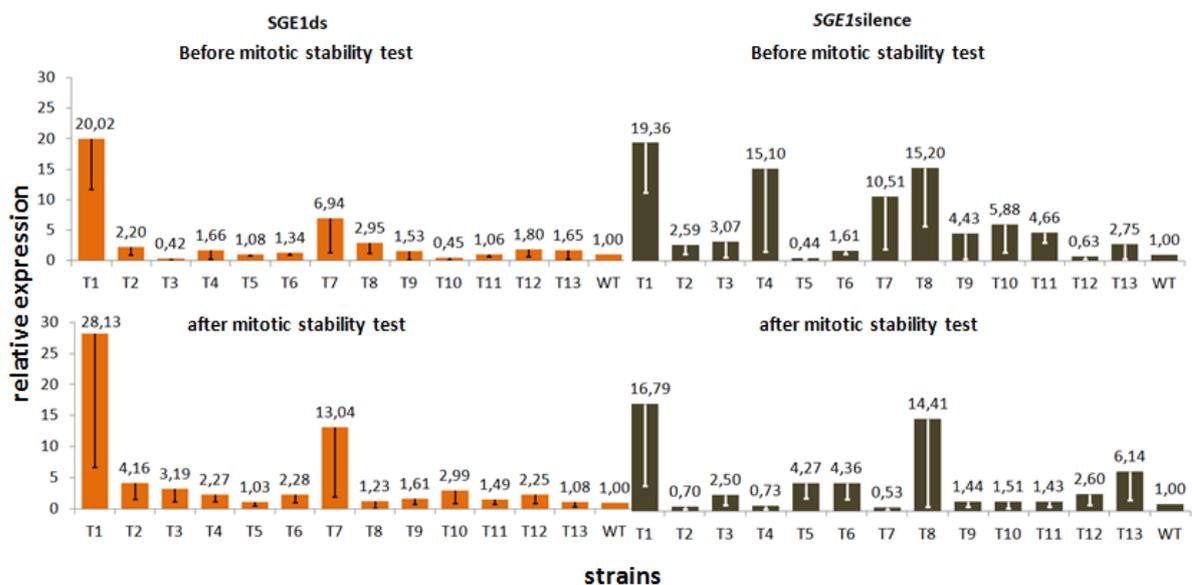


Figura 10: Diagrama do nível de expressão relativa de dsRNA e do silenciamento do gene *SGE1* antes e depois do teste de estabilidade mitótica. Em laranja, os níveis de expressão dos dsRNA antes (diagrama superior) e depois do teste de estabilidade (diagrama inferior) das linhagens T1 - T13 e a linhagem selvagem (WT); Em marrom, os níveis de expressão dos mRNA alvo antes (diagrama superior) e depois do teste de estabilidade (diagrama inferior) das linhagens T1 - T13 e a linhagem selvagem (WT).

3.3 Análise do Silenciamento do Gene *SGE1* na Patogenicidade e/ou Virulência

As linhagens selecionadas para inoculação na bananeira foram T4 e T11, apresentaram níveis baixo de transcritos relacionados à região utilizada para formação de dsRNA nos primeiros dias de isolamento antes do teste de estabilidade mitótica, e após o teste de estabilidade houve aumento nos níveis de expressão relativa no T4, o qual apresentou crescimento radial da colônias semelhante ao selvagem, durante o período de crescimento realizado após teste de estabilidade mitótica. Porém, sua capacidade de esporulação foi afetada quantitativamente como observada no teste de esporulação, mas os esporos produzidos foram perfeitamente viáveis, capazes de germinar e produzir hifas. O transformante 11, possivelmente, por não ter apresentado nível de expressão de *SGE1* abaixo do WT, apresenta melhor capacidade de esporular quando comparado ao transformante 4. No entanto, esporulou muito menos que o *Foc* selvagem, e apresentou menor desenvolvimento radial da colônia, comparado ao T4 e ao selvagem, indicando que, possivelmente o cassete foi inserido em alguma região do genoma que pode ter afetado o crescimento micelial.

Na análise do teste de patogenicidade, após 10 dias de inoculação, as bananeiras com a linhagem selvagem começaram a apresentar os primeiros sintomas externos da doença que foi o amarelecimento da folha mais velha e posteriormente progrediu para as mais novas, sintoma típico da doença mal-do-Panamá. Nas bananeiras inoculadas com os transformantes, os sintomas começaram a surgir 20 dias após a inoculação, demonstrando que o silenciamento de 27% no transformante 4 foi capaz de retardar os sintomas (Fig. 11).



Figura 11: Imagem das bananeiras após 20 dias de inoculação. Na primeira coluna da esquerda para direita estão às bananeiras inoculadas em triplicata com os esporos do *Fusarium oxysporum cubense* selvagem; na segunda coluna estão às bananeiras inoculadas com T11; e na terceira coluna as bananeiras inoculadas com T4.

Depois de 25 dias de inoculação as bananeiras com o fungo selvagem apresentavam índices avançados dos sintomas externos da doença. De acordo com a escala de índice de

sintomas, o fungo selvagem induziu sintomas de índice de 4 a 5, com quase todas as folhas comprometidas, desde o amarelecimento a completamente secas. As plantas também apresentaram rachaduras no pseudocaule (Fig. 12A e B). Já as plantas com as linhagens T4 e T11 e as controle apresentavam índice entre 2 e 3.



Figura 12: Imagens das bananeiras com 25 dias de inoculação. Em A: Bananeira, 1- controle; 2- selvagem; 3- inoculada com T11; 4- inoculada com T4. Em B: Bananeira 2 inoculada com o selvagem, apresentando rachaduras no pseudocaule.

Com 30 dias após a inoculação, as bananeiras inoculadas com o fungo selvagem já apresentavam total comprometimento das suas folhas com os sintomas, ficando com o aspecto comum da doença que é de guarda-chuva fechado, incluída na escala 5 da doença, enquanto que as bananeiras com as linhagens transformantes ainda estavam apresentando a fase inicial da doença, com poucas folhas sintomáticas (Fig.13).

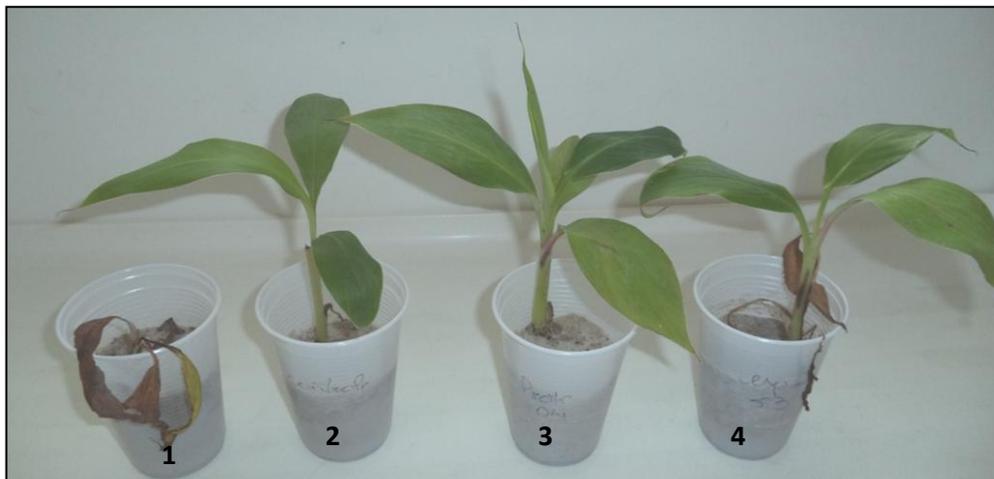


Figura 13: Bananeiras inoculadas com *Fusarium oxysporum cubense* após 30 dias de inoculação. Bananeira, 1- inoculada com selvagem; 2- controle; 3- inoculada com T11; e 4- inoculada com T4.

A infecção também era visível no pseudocaule e no rizoma das bananeiras infectadas com a linhagem selvagem, apresentando diferença na coloração, quando comparadas com as bananeiras inoculadas com os transformantes após 45 dias de inoculação. As linhagens transformantes seguiram quase o mesmo padrão da bananeira controle, com pouca

descoloração do pseudocaule, apresentando o nível 3 da escala de descoloração do rizoma, enquanto que, a bananeira com selvagem estava com rizoma incluído no nível 7 a 8 da escala dos sintomas internos, isso com 4 a 5 semanas de inoculação (Fig. 14).



Figura 14: Imagem dos sintomas no rizoma das bananeiras. Pseudocaule, 1- bananeira controle; 2- bananeira com selvagem; 3- bananeira com T11; e 4- bananeira com T4.

A habilidade de penetração e colonização do tecido hospedeiro pelos transformantes foi avaliada por meio de reisolamento e análise dos transformantes inoculados. Para isto, foi realizado reisolamento a partir do pseudocaule, rizoma e raiz. Os resultados confirmaram a presença dos transformantes, tanto no rizoma quanto no pseudocaule. Porém, não foi possível reisolamento a linhagem selvagem ou os transformantes a partir das raízes. Os transformantes transferidos para placas de meio de cultura com antibiótico mantiveram as mesmas características fenotípicas das linhagens utilizadas na inoculação, como por exemplo, a pigmentação, desenvolvimento radial da colônia, produção de micélio aéreo, podendo chegar a uma confirmação antes mesmo da caracterização molecular (Fig. 15A e B).

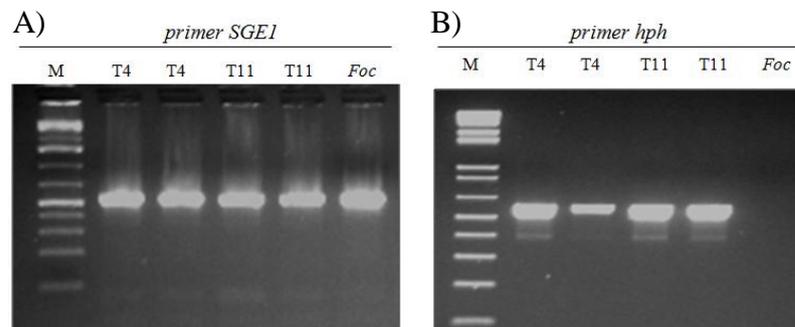


Figura 15: Amplificação por PCR dos genes *SGE1* e *hph* nos transformantes isolados das bananeiras. Em A: Amplificação com o *primer SGE1* e em B- amplificação com o *primer hph*; coluna 1, M- marcador kb plus (Invitrogen); coluna 2- T4 antes da inoculação na bananeira; coluna 3- T4 isolado da bananeira; coluna 4- T11 antes da inoculação na bananeira; coluna 5- T11 isolado da bananeira; e coluna 6- selvagem.

4 DISCUSSÃO

A maquinaria de RNAi é geralmente envolvida na proteção do genoma de plantas, animais e micro-organismos eucarióticos (CARRERAS-VILLASEÑOR *et al.*, 2013). Em fungos filamentosos este processo é denominado Quelling (ROMANO & MACINO, 1992; COGONI & MACINO, 1999). O mecanismo é conservado ao longo do processo evolutivo e pode atuar também em processos reguladores, como no desenvolvimento, na transcrição e tradução (MEYER, 2008; DANG *et al.*, 2011; CARRERAS-VILLASEÑOR *et al.*, 2013).

O silenciamento pós-transcricional por meio de RNAi baseia-se na produção de moléculas de RNA dupla fita (dsRNA), as quais são clivadas pelas enzimas Dicer-like (Dcl) em pequenos RNA de interferência (siRNA) com 20-25 nt, sendo então incorporados a proteínas Argonautas (Ago), localizadas no complexo RISC (*RNA Interference Specificity Complex*). As moléculas senso e anti-senso de siRNA são separadas e apenas a molécula anti-senso permanece no complexo guiando-o até a sequência complementar de mRNA, ocasionando a degradação do mRNA alvo (SCHUMANN *et al.*, 2013).

No genoma de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* foi detectado, por meio de buscas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), a presença de sequências homólogas aos genes QDE-1, 2 e 3 (codifica uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRP)) e Dcl-1 e 2 (codifica as proteínas Dicer-like) proteínas envolvidas no mecanismo de RNAi presentes no fungo modelo *Neurospora crassa* (ROMANO & MACINO, 1992). Contudo, mesmo com a oportunidade de utilizar esse mecanismo presente no *Foc* para caracterizar a função de genes, principalmente, aqueles envolvidos no processo de infecção na planta hospedeira, poucos trabalhos até o momento fizeram uso do mecanismo de RNAi nesse fitopatógeno para investigar a função de genes envolvidos na patogenicidade e/ou virulência.

Atualmente, diferentes estratégias vêm sendo utilizadas no silenciamento por RNAi, como a utilização de vários tipos de vetores para transformação, assim como, o uso direto de dsRNAs e siRNAs sintetizados *in vitro*. Um dos poucos trabalhos publicados, utilizando o mecanismo de RNAi em *Foc*, empregou moléculas de dsRNA sintéticas para avaliar os efeitos sobre a germinação de esporos e o estabelecimento das colônias, conseguindo obter 79,8% a 93% de inibição entre os 14 genes avaliados. Os dsRNAs da adenilato ciclase, da subunidade alfa e delta da DNA polimerase, apresentaram os maiores níveis de inibição da germinação de esporos (MUMBANZA *et al.*, 2013). A obtenção de níveis de silenciamento considerados muito elevados consolida ainda mais o potencial da metodologia, porém o uso

de dsRNAs sintéticos apesar de ser rápido e ter vários kits disponíveis no mercado, representa custo alto e um silenciamento transiente.

Dada à necessidade da análise que permite avaliar o nível de silenciamento por um período de tempo maior como as análises fenotípicas, neste trabalho foi utilizado a estratégia de transformação com cassete que induz a formação de dsRNA *hairpin*, que tem como vantagem a garantia de uma constante produção de siRNA pela maquinaria celular e consequentemente o silenciamento permanente do gene alvo, isso quando a inserção do cassete no genoma do fungo é estável.

As linhagens transformantes obtidas neste estudo permaneceram com a integração do cassete estável no genoma após teste de estabilidade mitótica, mas apresentaram variações no desenvolvimento radial das colônias (Fig. 7). Essas variações não são características relacionadas ao silenciamento do *SGEI*, segundo as pesquisas realizadas por Michielse *et al.* (2009), os mutantes gerados com deleção do gene *SGEI* apresentaram crescimento vegetativo indistinguível ao apresentado por *Fol* selvagem. Resultado semelhante ao obtido com transformante T4, e diferente ao adquirido com o T11 que apresenta crescimento radial da colônia bem inferior ao T4 e ao WT. Como o cassete não possui uma região alvo para sua integração no genoma, este resultado pode está relacionado com a inserção que pode ter interrompido ou alterado a expressão de algum gene importante para o seu crescimento.

Inúmeros trabalhos com fungos filamentosos, incluindo o *F. oxysporum* (MARTÍN-UDÍROZ *et al.*, 2004), *F. graminearum* (CONNOLLY *et al.*, 2013), *Leptosphaeria maculans* (FENG *et al.*, 2014), comprovaram que a interrupção de genes que codificam enzimas e proteínas importantes para o metabolismo, pode resultar em uma redução da capacidade das espécies crescerem em certas fontes de carbono, podendo também apresentar alterações na pigmentação, além disso, componentes da patogenicidade de fungos também podem ser prejudicados, como a esporulação, germinação de esporos, e outros fatores que consequentemente, reduzem a virulência na planta hospedeira (FENG *et al.*, 2014).

Michielse *et al.* (2009), observam que apesar do *SGEI* não ser necessário para o crescimento vegetativo, utilização de diferentes fontes de carbono e morfologia (tamanho dos esporos e da colônia), esse gene é envolvido quantitativamente na conidiogênese, porém os esporos gerados são perfeitamente viáveis. Essas observações também puderam ser constatadas nos mutantes obtidos neste trabalho na análise comparativa entre a linhagem selvagem que apresenta concentração de esporos acima de 10^6 esporos/mL⁻¹ em 3 dias de cultivo em meio PDB¼ líquido, enquanto que os transformantes necessitam de pelo menos 5

dias de cultivo para atingir a produção de 10^5 esporos/mL⁻¹, e de 7 dias de cultivo para obtenção de valores alcançados pelo WT em 3 dias.

Quanto aos esporos, além dos transformantes T4 e T11 utilizados nas análises de patogenicidade os demais transformantes analisados apresentaram características similares na produção de esporos, mas além da redução em números, não foi observada nenhuma alteração morfológica no tamanho dos conídios, apenas nas quantidades produzidas. Contudo, dada a complexidade e o grande número de genes envolvidos neste processo, os dados aqui obtidos podem indicar que transformantes que não apresentaram silenciamento do gene *SGEI*, mas mostram uma redução da quantidade de conídios, pode ser devido a outros fatores que precisam ser investigados como, a região de inserção do T-DNA nos diferentes mutantes. Em *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, identificaram 42 genes que são significativamente, envolvidos na conidiogênese, dentre eles, está o *FVSI* que codifica uma proteína (SAM), a qual funciona em interações proteína-proteína que estão envolvidas na regulação transcricional ou pós-transcricional e transdução de sinal, onde os mutantes para este gene apresentaram também alterações na conidiogênese e na virulência (IIDA *et al.*, 2013).

Os transformantes T4 e T11 apresentaram não somente diferenças no desenvolvimento radial das colônias, mas também mostraram por meio das análises de RT-qPCR diferentes níveis de expressão relativa, sendo observado também nos demais transformantes analisados. Esses resultados foram em sua maioria de difícil interpretação, no entanto, dentre todos os transformantes analisados, os que apresentaram níveis consideráveis de redução dos transcritos alvo foram, o T4 que apresentou um silenciamento de 27% do gene alvo comparado ao WT, o T2 apresentou 30% e o T7 chegou a 47%, resultados similares ou próximos foram obtidos em outros trabalhos com fungos filamentosos, como 15% a 96% em *Phanerochaete cryosporium* (MATITYAHU *et al.*, 2008) e 18,4% a 97% *Trichoderma atroviride* (CARRERAS-VILLASEÑOR *et al.*, 2013). Os resultados do nível de expressão do transformante T11 indicam que não houve silenciamento dos transcritos do gene alvo quando comparado à linhagem WT (Fig. 10). Este fato pode está relacionado à baixa produção de dsRNA, devido a fatores epigenéticos.

Na comparação com os resultados de antes e depois do teste de estabilidade mitótica, diferentes níveis de expressão de dsRNA e transcritos do gene alvo foram detectados por RT-qPCR (Fig. 10). Uma das prováveis explicações para isso seria o envolvimento do processo de estabilidade mitótica nos resultados, uma segunda hipótese seria o tempo de 20-30 dias após a integração do cassete no genoma, não ter sido suficiente para expressão dos dsRNA. Em *Moniliophthora perniciosa*, o silenciamento do gene *gfp* foi inicialmente detectado após

28 dias seguintes da transformação com dsRNA expresso constitutivamente (CARIBÉ *et al.*, 2009). Também pode ser justificada pela perda de cópias inseridas no genoma. Porém, GOLDONI *et al.* (2004) concluí que mesmo com nível de expressão baixo de dsRNA *hairpin* a repressão dos transcritos pode ocorrer de forma eficiente.

Independentemente do grau de silenciamento, foi possível observar uma visível redução da virulência durante o teste de patogenicidade, mesmo com a linhagem T11 não apresentando nível alto de expressão do cassete de transformação. As hipóteses levantadas para explicar tal fato foram, a possibilidade que, a inserção do cassete esteja silenciando uma região importante para a fisiologia geral do fungo, interferindo no nível de transcritos, ou em decorrência de múltiplas repicagens, a possibilidade de ter gerado uma linhagem “menos virulenta do fungo”. Embora não se possa informar no momento por qual causa, as bananeiras inoculadas com esta linhagem apresentaram o surgimento dos sintomas característicos da doença no mesmo período que as bananeiras inoculadas com a linhagem T4, 10 dias mais tarde, que as bananeiras inoculadas com WT. (Figura 13). Uma vez que, o silenciamento do gene *SGE1* não impede que os sintomas sejam apresentados, apenas retarda-os.

Os dados indicam que, as linhagens transformantes e a selvagem conseguiram penetrar nas raízes e colonizar as plantas hospedeiras, onde progrediram com a infecção para o sistema vascular, dados confirmados pelo isolamento das linhagens a partir do rizoma e pseudocaule das bananeiras, comprovando que, os sintomas presentes foram mesmo ocasionados pela presença dos fungos inoculados nas plantas hospedeiras, porém os transformantes progrediram mais lentamente com os sintomas internos, provavelmente devido ao silenciamento do gene. Michielse *et al.* (2009) avaliaram esse mesmo processo de interação patógeno-hospedeira com mutantes de deleção confirmando a importância do gene *SGE1* na patogenicidade e/ou virulência e a dificuldade do fungo progredir no sistema vascular do tomateiro, quando infectado com transformante de *Fol*.

De alguma maneira ainda não compreendida ocorreu de forma visível o retardamento da doença na linhagem T11, porém são necessárias mais análises para chegar a uma conclusão consistente, para comprovar a relação da redução da virulência com o silenciamento do gene *SGE1* ou se há também outros fatores que podem está interferindo.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que o mecanismo de RNAi está presente e ativo em *F. oxysporum cubense*, onde foi confirmada a redução dos transcritos alvo analisados, pois no início do processo de transformação estavam com níveis bem elevados e após o teste de estabilidade mitótica, os níveis de expressão do dsRNA *hairpin* aumentaram, reduzindo assim o nível de mRNA mensageiro do gene *SGE1*. Também foi possível observar de forma visível a redução da virulência nas bananeiras do tipo Maçã, consideradas as mais suscetíveis à doença mal-do-Panamá, mesmo com a necessidade de realizar mais análises para confirmar e investigar melhor a atividade do gene *SGE1*. Então, desde já, é possível concluir que este gene também tem papel importante na patogenicidade e/ou virulência em *F. oxysporum cubense*, como foi constatado em *Fol* por Michielse, *et al.* (2009).

O estabelecimento da metodologia de silenciamento gênico neste fitopatógeno, utilizando a estratégia de produção constante de dsRNAs *hairpin* e conseqüentemente, o silenciamento, demonstra a eficiência da metodologia, abrindo novos caminhos para o desenvolvimento de mecanismos que bloqueiem ou diminuam a ação do patógeno, bem como, explorar funcionalmente dados genômico.

6 REFERÊNCIAS

1. CARIBÉ DOS SANTOS, A. C.; SENA, J. A. M.; SANTOS, S. C.; DIAS, C. V.; PIROVANI, C.; VALLE, R. R.; CASCARDO, J. C. M.; VINCENTZ, M. dsRNA-induced gene silencing in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches broom disease of cacao. **Fungal Genetics and Biology**. v.46, p. 825-836, 2009.
2. CARRERAS-VILLASEÑOR, N.; ESQUIVEL-NARANJO, E. U.; VILLALOBOS-ESCOBEDO, J. M.; ABREU-GOODGER, C.; HERRERA-ESTRELLA, A. The RNAi machinery regulates growth and development in the filamentous fungus *Trichoderma atroviride*. **Mol Microbiol**. v.89(1), p. 96-112. doi: 10.1111/mmi.12261, 2013.
3. COGONI, C.; MACINO, G. Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme. **Current Opinion in Microbiology**. v.2, p.657–662, 1999.
4. CONNOLLY, L. R.; SMITH, K. M.; FREITA, G. M.; The *Fusarium graminearum* Histone H3 K27 Methyltransferase KMT6 Regulates Development and Expression of Secondary Metabolite Gene Clusters. **PLoS Genet**. v.9(10), e1003916. doi:10.1371/journal.pgen.1003916, 2013.
5. DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolamento of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. v. 12, p. 13-14, 1990.
6. DANG, Y.; YANG, Q.; XUE, Z.; LIU, Y. RNA Interference in Fungi: Pathways, Functions, and Applications **Eukaryot Cell**. v.10(9), p. 1148–1155, 2011.
7. FENG, J.; ZHANG, H.; STRELKOV, S. E.; HWANG, S-F. The LmSNF1 Gene Is Required for Pathogenicity in the Canola Blackleg Pathogen *Leptosphaeria maculans*. **PLoS ONE** v.9(3). e92503. doi:10.1371/journal.pone.0092503, 2014.
8. FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**. v.391 (6669), p.806-811, 1998.
9. FRANÇA, N. R.; MESQUITA JÚNIOR, D.; LIMA, A. B.; PUCCI, F. V. C.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Rev. Bras. Reumatologia** v.50(6), p.695-709, 2010.

10. GOLDONI, M.; AZZALIN, G.; MACINO, G.; COGONI, C.; Efficient gene silencing by expression of double stranded RNA in *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Biol.** v.41, p. 1016-1024, 2004.
11. IIDA, Y.; FUJIWARA, K.; YOSHIOKA, Y.; TSUGE, T. Mutation of FVS1, encoding a protein with a sterile alpha motif domain, affects asexual reproduction in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. **FEMS Microbiol Lett.** p. 1574-6968, 2013.
12. LESLIE & SUMMERELL. The *Fusarium* Laboratory Manual. **Blackwell Publishing**. Primeira edição. 2006.
13. MAK, C.; MOHAMED, A. A.; LIEW, K. W.; HO, Y. W. Early screening technique for *Fusarium* wilt resistance in banana micropropagated plants. In: S. MOHAN JAIN. & RONY SWENNEN. (Ed.) *Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutations*. Enfield, NH, USA. **Science Publishers, INC.** 2004. cap. 18.
14. MA, LI-JUN *et al.* Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. **Nature**. v.464 (7287), p.367-373, 2010.
15. MATITYAHU, A.; HADAR, Y.; DOSORETZ, C. G. & BELINKY, P. A. Gene Silencing by RNA interference in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, p. 5359-5365, 2008.
16. MEYER, V.; Genetic engineering of filamentous fungi progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**. v. 26, p. 177-185, 2008.
17. MELDRUM, A.; FRASER-SMITH, S.; TRAN-NGUYEN, L. T. T.; DALY, A. M.; AITKEN, E. A. B. Presence of putative pathogenicity genes in isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from Australia. **Australasian Plant Pathol.** v.41, p.551-557, 2012.
18. MICHIELSE, C.B.; VAN WIJK, R.; REIJNEN, L.; MANDERS, E. M. M.; BOAS, S. *et al.* The Nuclear protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* is required for parasitic growth. **PLoS Pathog.** v.5(10), e1000637, 2009.
19. MICHIELSE, C.B.; REP M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. **Molecular plant pathology**. v.10(3), p. 311-324, 2009.

20. MUMBANZA, F. M.; KIGGUNDU, A. TUSIIME, G. TUSHEMEREIRWE, W. K.; NIBLETT, C.; BAILEY, A. In vitro antifungal activity of synthetic dsRNA molecules against two pathogens of banana, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and *Mycosphaerella fijiensis*. **Pest Manag Sci.** v. 69, p.1155–1162, 2013.
21. NAKAYASHIKI, H.; NGUYEN, Q. B. RNA interference: roles in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology.** v.11, p. 494–502, 2008.
22. PLOETZ, R.C. Variability in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Can. J. Bot.** v. 68, p.1357-1363, 1990.
23. PLOETZ, R.C. *Fusarium* wilt (Panama disease). In: Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests. CIRAD/FLHOR. Montpellier, France. Ganry, J. (ed.). p. 149-158, 393 pp, 1993.
24. PLOETZ, R.; PEGG, K. *Fusarium* wilt of banana and Wallace's line: was the disease originally restricted to his Indo-Malayan region? **Australasian Plant Pathology.** v. 26, p.239–249, 1997.
25. ROMANO, N.; MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. **Mol. Microbiol.** v.6, p. 3343-353, 1992.
26. RONCERO, M. I. G. *et al.* *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. Review. **Physiological and Molecular Plant Pathology.** v. 62, p.87-98, 2003.
27. SCHUMANN, U.; SMITH, N. A.; KAZAN, K.; AYLIFFE, M.; WANG, M-B. Analysis of *hairpin* RNA transgene-induced gene silencing in *Fusarium oxysporum*. **Silence.** v. 4 (3), 2013.
28. TEUNISSEN, H. A. S., VERKOOIJEN, J., CORNELISSEN, B. J. C.; HARING, M. A. Genetic exchange of avirulence determinants and extensive karyotype rearrangements in parasexual recombinants of *Fusarium oxysporum*. **Mol Genet Genomics.** v.268, p.298-310, 2002.
29. VISSER, M.; GORDON, T.; WINGFIELD, B.; WINGFIELD, M.; VILJOEN, A. Transformation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, causal agent of Fusarium wilt of banana, with the green fluorescent protein (GFP) gene. **Australasian Plant Pathology.** v. 33, p. 69-75, 2004.

30. XIAO, R. F.; ZHU, YU J.; LI YAN, D.; LIU, B. O. Studies on vascular infection of *Fusarium* f. sp. *ubense* race 4 in banana by field survey and green fluorescent protein reporter. **ESci Journal of Plant Pathology**. v 02, ed 1, p 44-51, 2013.

31. ZWIERS, L. H.; DE WAARD, M. A. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*- mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Current Genetic**. v. 39, p. 388-393, 2001.