

# Integração de pAN7-1 no Genoma de *Magnaporthe grisea* Mediada por Enzima de Restrição\*

Carlos E. Marchi<sup>1</sup>, Sérgio H. Brommonschenkel<sup>1</sup>, Marisa V. de Queiroz<sup>2</sup>  
& Eduardo S. G. Mizubuti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia; <sup>2</sup>Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, MG, e-mail: shbromo@ufv.br

(Aceito para publicação em 12/05/2006)

Autor para correspondência: Sérgio H. Brommonschenkel

MARCHI, C.E., BROMMONSCHENKEL, S.H., QUEIROZ, M.V. de & MIZUBUTI, E.S.G. Integração de pAN7-1 no genoma de *Magnaporthe grisea* mediada por enzima de restrição. Fitopatologia Brasileira 31:254-260. 2006.

## RESUMO

Visando explorar a mutagênese insercional em *Magnaporthe grisea*, foram avaliadas a transformação dos protoplastos obtidos após adequação do protocolo e a eficiência da integração de pAN7-1 no genoma do ascomiceto na presença da enzima de restrição *Hind* III. Os protoplastos de *M. grisea* I-22 foram prontamente transformados para a resistência à higromicina. Quando o vetor linearizado com *Hind* III foi usado para transformar o fungo na presença de *Hind* III, a eficiência de transformação foi 1,1 a 8,1 vezes superior ao tratamento sem a adição da enzima. No geral, a melhor concentração de *Hind* III foi 5 unidades/reacção de transformação. Tal concentração promoveu a produção média de 332 transformantes/ $\mu\text{g}$  de pAN7-1/ $10^7$  protoplastos. A presença do gene de seleção *hph* no genoma de 18 indivíduos resistentes à higromicina foi confirmada por PCR.

**Palavras-chave adicionais:** *Pyricularia grisea*, *P. oryzae*, brusone, transformação de fungos, integração mediada por enzimas de restrição, REMI.

## ABSTRACT

### Integration of pan7-1 into the *Magnaporthe grisea* genome mediated by restriction enzyme

To investigate insertional mutagenesis in *Magnaporthe grisea*, we tested the transformation of protoplasts produced after protocol optimization, and analyzed the integration efficiency of pAN7-1 into the *M. grisea* genome mediated by the restriction endonuclease *Hind* III. The I-22 protoplasts were readily transformed for hygromycin resistance. When pAN7-1 was linearized with *Hind* III and used to transform fungal protoplasts in the presence of the corresponding enzyme, the transformation efficiency was increased 1.1 to 8.1-fold. The optimal *Hind* III concentration for enhanced transformation corresponded to 5 unit/transformation mix. This concentration led to average frequency of 332 transformants/ $\mu\text{g}$  de pAN7-1/ $10^7$  protoplasts. The presence of selection gene *hph* in the 18 transformant genome was confirmed by PCR.

**Additional keywords:** *Pyricularia grisea*, *P. oryzae*, brusone, fungi transformation, restriction enzyme-mediated integration, REMI.

## INTRODUÇÃO

Os vetores para a transformação de fungos filamentosos se integram predominantemente no genoma do hospedeiro via eventos de recombinação (Riach & Kinghorn, 1996; Mullins & Kang, 2001). Em geral, integrações de vetores sem homologia com o DNA do fungo ocorrem em sítios ectópicos no genoma, o que permite a utilização dessas moléculas para interromper e marcar fisicamente genes de interesse (Mullins *et al.*, 2001; Recorbet *et al.*, 2003), estratégia esta denominada de “mutagênese insercional mediada por transformação (MIMT)”.

Em fungos fitopatogênicos, MIMT tem sido amplamente explorada para a identificação e clonagem de

genes (Talbot & McCafferty, 1997; Idnurm & Howlett, 2001). Tomando como exemplo os genes de patogenicidade listados por Idnurm & Howlett (2001), constata-se que cerca de 25% foram identificados a partir de MIMT. Seguramente, a contribuição dessa tecnologia aumentou nos últimos anos, sobretudo com o desenvolvimento de sistemas de transformação mediados por *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn (De Groot *et al.*, 1998).

O estabelecimento de programas de MIMT em *Magnaporthe grisea* (T.T. Hebert) M.E. Barr, o patógeno mais destrutivo da cultura do arroz, foi inicialmente limitado pela baixa eficiência de transformação usualmente alcançada (Valent & Chumley, 1991). Em anos recentes, entretanto, a frequência de transformantes aumentou com o uso de enzimas de restrição para mediar a integração do DNA transformante (Schiestl & Petes, 1991). A técnica REMI

\*Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Universidade Federal de Viçosa. 2003.

(*Restriction Enzyme-Mediated Integration*), como ficou conhecida, aumentou a frequência de integração do vetor pAN7-2 no genoma de *M. grisea*, acima de 10 vezes, quando as enzimas de restrição *Bam*HI ou *Bgl*II foram utilizadas (Shi *et al.*, 1995). Menor frequência de transformantes foi verificada quando *Hind*III mediou a integração do vetor (Shi *et al.*, 1995).

As características de REMI, como transformação eficiente e predominância de eventos simples de integração, têm estimulado o uso desta técnica na investigação de genes envolvidos na patogenicidade de *M. grisea* (Shi *et al.*, 1995; Sweigard *et al.*, 1998; Balhadère *et al.*, 1999; Fujimoto *et al.*, 2002). Contudo, mutantes REMI com patogenicidade alterada não têm sido obtidos com pAN7-1, talvez pela baixa taxa de integração no genoma de *M. grisea* obtida com a adição de enzimas de restrição. Em *Mycosphaerella zae-maydis* Mukunya & Boothr., por exemplo, a eficiência de REMI variou com o tipo de vetor empregado e foi insatisfatória com pAN7-1 (Yun *et al.*, 1998). Esse vetor tem sido amplamente empregado para a transformação de fungos filamentosos, sobretudo ascomicetos, por apresentar tamanho relativamente pequeno e assim proporcionar maiores chances de sucesso no processo de recuperação das seqüências dos genes inativados.

Apesar da contribuição da MIMT para a prospecção de genes envolvidos na patogênese de *M. grisea*, o conhecimento do repertório de genes envolvidos nos diferentes estágios da patogênese é ainda restrito. A compreensão mais detalhada dos genes que controlam esses mecanismos pós-penetração é de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias eficientes de manejo da brusone do arroz.

Em face do potencial de REMI em suprir a carência de mutantes com defeitos em genes que controlam eventos pós-penetração em arroz, iniciou-se uma série de estudos visando estabelecer as condições de REMI que maximizam a obtenção de mutantes com eventos simples de integração no genoma deste fungo. Como primeiro passo, recentemente, foi otimizado o protocolo de protoplastização do ascomiceto (Marchi *et al.*, 2006). Neste trabalho verificou-se a possibilidade de transformar os protoplastos obtidos segundo esse protocolo e determinou-se a frequência de integração de pAN7-1 no genoma do fungo mediada pela endonuclease de restrição *Hind*III.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Magnaporthe grisea* e condições de cultivo

Foi utilizado o isolado monospórico I-22 de *M. grisea*, obtido a partir de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.), e gentilmente cedido pelo Laboratório de Fitopatologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

O fungo foi cultivado em meio de farinha de arroz-água (FAA - 20 g de farinha de arroz com casca, 5 g de sacarose, 15 g de água, 1 L de água destilada) por cinco a sete dias, em BOD a 28-30 °C no escuro. Para a preservação do

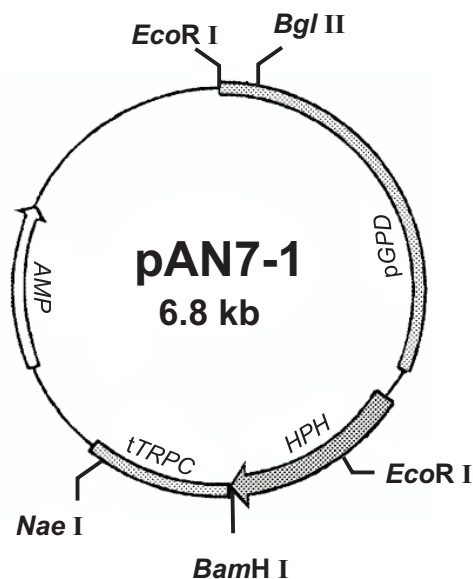
fungo em longo prazo, pedaços (4 cm<sup>2</sup>) de papel manteiga colonizados pelo micélio foram mantidos a - 80 °C (Valent *et al.*, 1991).

### Vetor de transformação pAN7-1

A transformação de *M. grisea* foi realizada com o plasmídeo pAN7-1, que possui 6,75 Kb (Figura 1). O gene *hph*, que codifica para a resistência ao antibiótico higromicina B, constitui a marca de seleção de pAN7-1. *hph* está fusionado ao promotor do gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e a seqüência terminadora do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter (Punt *et al.*, 1987).

### Curva de sensibilidade de *M. grisea* I-22 à higromicina

*Magnaporthe grisea* I-22 foi cultivado em placas de Petri contendo meio FAA acrescido de higromicina em concentrações que variaram de 0 a 350 µg/mL. Foram utilizadas seis repetições (placas de Petri) por tratamento, e as placas de Petri foram mantidas por seis dias em BOD a 28-30 °C no escuro. A sensibilidade ao antibiótico foi estimada com base no crescimento micelial (área da colônia em cm<sup>2</sup>).



**FIG. 1** - Mapa do vetor de transformação pAN7-1 (Punt *et al.*, 1987). O gene *AMP* (que confere resistência à ampicilina), e o gene da fosfotransferase da higromicina (*HPH*) de *Escherichia coli* (que confere resistência à higromicina) constituem os sistemas de seleção para os organismos procaríoto e eucaríoto, respectivamente. *HPH* está ligado ao promotor do gene *GPD* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e ao terminador do gene para a biossíntese de triptofano (*tTRPC*) de *Aspergillus nidulans*. Sítios de reconhecimento para enzimas de restrição são indicados. A origem de replicação, necessária para a manutenção e replicação do plasmídeo em *E. coli*, não está representada.

### Produção de protoplastos de *M. grisea*

Os protoplastos foram obtidos segundo o protocolo de Marchi *et al.* (2006). Brevemente, misturaram-se 100 mg de micélio úmido a 3 mL de estabilizador osmótico  $\text{MgSO}_4$  a 1,2 M /  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 0,01 M (pH 5,8) contendo 10 mg de *Lysing Enzymes* (*Sigma Chemicals Co.*) e 10 mg de *Cellulase Onozuka R10* (*Yakult Biochemical Co. Ltd.*). Após 3 h de agitação a 100 rpm, a 30 °C, a suspensão de protoplastos foi colocada em tubo corex (15 mL) e, suavemente, adicionaram-se 4 mL de estabilizador ST (sorbitol a 0,6 M, Tris-HCl a 0,1 M, pH 8,0). Após centrifugação em rotor de caçamba (3000 rpm por 5 min), os protoplastos se agregaram na interface dos estabilizadores osmóticos. Os protoplastos foram transferidos para outro tubo corex e 2 mL de estabilizador STC (sorbitol a 1 M, Tris-HCl a 0,05 M,  $\text{CaCl}_2$  a 0,05 M, pH 8,0) foram adicionados. Os protoplastos foram precipitados por centrifugação a 5000 rpm por 10 min e, em seguida, lavados três vezes em STC. Os protoplastos foram ressuspensos em STC para a concentração final de  $10^7/\text{mL}$ .

### Transformação de *M. grisea*

A integração de pAN7-1 no genoma de *M. grisea* foi avaliada na ausência ou presença de *HindIII*. Optou-se por esta enzima de restrição devido aos resultados satisfatórios obtidos em outros sistemas envolvendo o mesmo vetor de transformação (Akamatsu *et al.*, 1997; Linnemannstöns *et al.*, 1999).

A transformação foi conduzida em microtubo de 1,5 mL, onde 1 µg de pAN7-1, suspenso em 150 µL de SaTC (sacarose 20%, Tris-HCl a 0,05 M,  $\text{CaCl}_2$  a 0,05 M, pH = 8,0), foi misturado a 100 µL da suspensão de protoplastos ajustada para  $10^7/\text{mL}$ . Quando a reação requereu a presença de *HindIII*, esta foi simultaneamente adicionada com o pAN7-1-*HindIII*. A mistura foi homogeneizada e mantida em gelo por 20 min. Após a adição de 1 mL de solução de polietileno glicol (PEG 3350 60%,  $\text{CaCl}_2$  a 0,025 M, Tris-HCl a 0,025 M, pH = 7,5) pré-aquecida a 37 °C, efetuou-se nova incubação em gelo por 20 min. O volume foi transferido para tubo corex 30 mL contendo 12 mL de meio de regeneração TB3 (sacarose 20%, extrato de levedura 0,3%, caseína hidrolisada 0,3%) e mantido a 24 °C sob agitação (100 rpm) por 1 hora. Ao final, dividiu-se o volume entre quatro placas de Petri, onde verteu-se TB3 contendo 2% de ágar e 300 µg de higromicina/mL. Em seguida, as placas foram mantidas em incubadora a 28-30 °C.

No total realizaram-se cinco ensaios de transformação independentes, em que foram avaliados diferentes tratamentos, a saber: 1) controle, isto é, vetor na forma circular (C); 2) pAN7-1-*HindIII*, com a inativação da enzima de restrição utilizada para a linearização do vetor (LI), por meio de incubação em banho-Maria a 75 °C por 15 min; 3) pAN7-1-*HindIII*, sem inativação da enzima de restrição residual; 4) pAN7-1-*HindIII*, sem inativação da enzima de restrição residual, com adição de *HindIII* durante a reação de transformação. Nesse caso, foram utilizadas 5, 10, 20, 30, 40 ou 50 U de enzima de restrição.

Para a linearização do vetor utilizaram-se 10 U de *HindIII*/µg de pAN7-1, e a reação permaneceu em banho-Maria a 37 °C por 2 h.

### Extração de DNA

O fungo foi cultivado em meio completo (0,5% de sacarose, 0,3% de extrato de levedura, 0,3% de caseína hidrolisada), sob agitação (130 - 150 rpm) durante dez-14 dias a 28 °C, no escuro. O micélio produzido, após secagem, foi macerado em nitrogênio líquido. Fração do macerado foi transferida para tubo de microcentrifuga e misturada com 750 µL de tampão de extração (CTAB a 55 mM, Tris a 100 mM, pH 8,0, EDTA a 10 mM, NaCl a 0,7 M) e 15 µL de mercaptoetanol. Após incubação a 65 °C por 30 min, foram acrescentados 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e a mistura foi centrifugada por 5 min a 14.000 rpm. A fase aquosa superior foi transferida para outro microtubo, adicionados 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), e a mistura foi centrifugada novamente. A fase líquida foi transferida para microtubo contendo 750 µL de isopropanol (-20 °C), incubada em gelo por 10 min e centrifugada. Em seguida, o precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70% (-20 °C), seco e ressuspensionado em 50 µL de tampão TE (Tris a 10 mM, pH 8,0, EDTA a 1 mM). A concentração do DNA foi estimada por comparação com padrões de DNA. As amostras de DNA foram armazenadas a -20 °C.

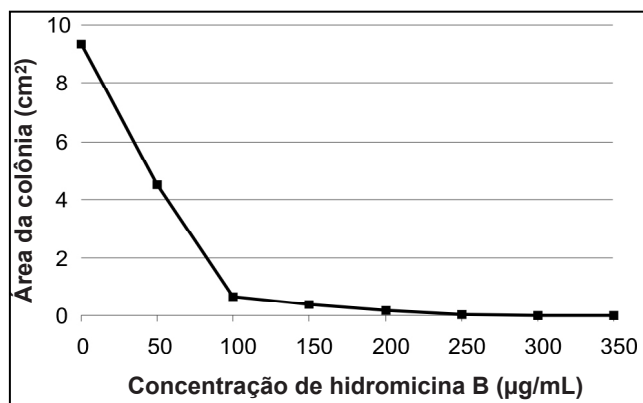
### Polymerase Chain Reaction (PCR)

Dezoito indivíduos resistentes à higromicina foram examinados para a presença do gene de seleção *hph*. Após a extração, o DNA total foi submetido à amplificação pela técnica de PCR utilizando os oligonucleotídeos específicos *hph1* (CAGCGAGAGCCTGACCTATTGC) e *hph2* (GCCATCGGTCCAGACGGCCGCGC). O programa de amplificação consistiu de um ciclo de desnaturação de 2 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos com 1 min de desnaturação (92 °C), 60 s para o anelamento dos oligonucleotídeos a 60 °C, e 90 s de polimerização a 72 °C. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1,4%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A resposta de *M. grisea* I-22 às crescentes concentrações de higromicina está representada na Figura 2. Embora seja possível a ocorrência de isolados de *M. grisea* exibindo resistência à higromicina (Leung *et al.*, 1995), I-22 apresentou sensibilidade ao antibiótico. O crescimento micelial de I-22 foi totalmente inibido em concentrações superiores a 250 µg/mL (Figura 2).

Determinado o potencial da higromicina como agente de seleção, o isolado I-22 foi submetido à protoplastização e, subsequentemente, ao processo de transformação. Por segurança, a concentração de 300 µg de higromicina/mL foi adotada para os ensaios de transformação. Em geral, a concentração do antibiótico usada para a seleção de



**FIG. 2** - Sensibilidade de *Magnaporthe grisea* I-22 à higromicina B, estimada com base no crescimento micelial (área da colônia em cm<sup>2</sup>) em meio farinha de arroz-ágar acrescido do antibiótico em diferentes concentrações. O valor de área da colônia corresponde a média de seis repetições (placas de Petri), e foi obtido após seis dias de incubação das placas em BOD a 28-30 °C, no escuro.

transformantes de *M. grisea* tem correspondido a 200-300 µg/mL (Shi *et al.*, 1995; Rho *et al.*, 2001; Viaud *et al.*, 2002; Soanes *et al.*, 2002). A manutenção dos transformantes foi feita em concentração menor, 100 µg de higromicina/mL.

Em todos os ensaios de transformação, os protoplastos obtidos segundo o protocolo de Marchi *et al.* (2006) foram prontamente transformados para a resistência a higromicina (Tabela 1). As primeiras colônias resistentes ao antibiótico foram detectadas após o quarto e quinto dia de incubação.

A análise dos cinco ensaios de transformação permitiu constatar que o número de colônias resistentes à higromicina variou consideravelmente dentro dos tratamentos (Tabela 1). Variações na frequência de transformantes são comuns entre ensaios de transformação, poucas vezes conseguindo-se repetibilidade. Analisando a Tabela 1, nota-se que, no geral, todos os tratamentos do ensaio B resultaram em menor produção de transformantes. Isto sugere que diferenças qualitativas e/ou quantitativas nas preparações de protoplastos podem ter contribuído para as oscilações na eficiência de transformação dentro dos tratamentos. Variações na condição fisiológica do micélio utilizado para protoplastização e na quantidade de residual da endonuclease após o tratamento térmico de inativação podem explicar em parte, essas variações de eficiência de transformação de um mesmo tratamento nos diferentes ensaios.

A linearização do vetor elevou a frequência de transformantes (Tabela 1). O pAN7-1 na forma linear (LI) foi cerca de oito vezes mais eficiente na transformação de *M. grisea* I-22 do que na forma circular (C). Embora o mecanismo não esteja esclarecido, o aumento da eficiência de transformação pela linearização do vetor tem sido demonstrado em outros sistemas como *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus.) Briosi & Cavara. (Redman & Rodriguez, 1994), *Cochliobolus heterostrophus* (Drechsler) Drechsler (Lu *et al.*, 1994), *Aspergillus*

*oryzae* (Ahlb.) E. Cohn. (Yaver *et al.*, 1999) e *Penicillium griseoroseum* Dierckx (Soares, 2002). Redman & Rodriguez (1994) acreditam que o vetor linearizado possa ser mais estável ou ter acesso facilitado ao núcleo.

Em todos os ensaios, a eficiência de transformação constatada no tratamento LI foi superior a do tratamento controle (Tabela 1). Não ignorando a condição física do vetor, é provável que o tratamento térmico empregado em LI tenha promovido apenas inativação parcial da enzima utilizada para linearizar pAN7-1. Desta forma, o aumento da eficiência de transformação seria reflexo da atividade enzimática residual. Shi *et al.* (1995) observaram fenômeno semelhante ao transformarem o isolado Guy 11 de *M. grisea* com pAN7-2. Após a inativação total da enzima, esses autores obtiveram eficiência de transformação com o vetor linear similar a observada com o vetor circular, demonstrando a importância da atividade enzimática residual.

O efeito positivo da atividade enzimática residual na transformação de *M. grisea* I-22 foi mais evidente no tratamento onde não houve inativação térmica (Tabela 1). Nos ensaios A e B, sem a adição de *Hind*III na reação de transformação, houve aumento de seis a sete vezes na frequência de transformantes em relação a LI, respectivamente. Desconsiderando o ensaio D, em média esse aumento correspondeu a 4,9 vezes. Em *P. griseoroseum* a atividade enzimática residual, *Xba*I, também afetou positivamente a eficiência de transformação (Soares, 2002).

**TABELA 1** - Número de transformantes de *Magnaporthe grisea*, isolado I-22, obtido com transformação convencional ou mediada por *Hind*III, utilizando o vetor de transformação pAN7-1

Ensaio	C <sup>a</sup>	LI <sup>b</sup>	Unidades de <i>Hind</i> III adicionadas à reação <sup>c</sup>							
			0	5	10	20	30	40	50	
A	13,3 <sup>d</sup>	120,0	713,3	nr <sup>e</sup>	nr	nr	nr	nr	nr	133,3
B	3,3	11,0	72,5	85,7	89,0	nr	nr	nr	nr	nr
C	34,7	55,4	108,9	nr	46,9	nr	nr	nr	nr	nr
D	51,8	696,5	418,8	677,6	776,5	393,7	nr	nr	nr	nr
E	14,1	35,9	183,7	232,6	72,8	68,5	44,6	33,7	59,8	nr
<b>Média</b>	<b>23,4</b>	<b>183,8</b>	<b>299,4</b>	<b>332,0</b>	<b>246,3</b>	<b>231,1</b>	<b>44,6</b>	<b>33,7</b>	<b>96,6</b>	

<sup>a</sup> pAN7-1 circular.

<sup>b</sup> pAN7-1-*Hind*III. Linearização com 10 U de *Hind*III (37 °C/2 h) e posterior inativação da enzima residual (70 °C/15').

<sup>c</sup> pAN7-1-*Hind*III. Linearização com 10 U de *Hind*III (37 °C/2 h), sem inativação da enzima residual.

<sup>d</sup> Número de transformantes/µg de DNA/10<sup>7</sup> protoplastos.

<sup>e</sup> nr: tratamento não realizado.

A integração de pAN7-1 no genoma de *M. grisea* foi influenciada pela adição de *Hind*III na mistura de transformação. Quando unidades de *Hind*III foram adicionadas à reação de transformação do fungo com pAN7-1-*Hind*III observou-se frequência de transformantes 1,1 a 8 vezes superior ao LI (Tabela 1). Contudo, para a integração

de pAN7-2, *Hind*III apresentou eficiência inferior se comparada a outras enzimas de restrição (Shi *et al.*, 1995). Transformação eficiente de *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. patótipo do tomate e *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw. também foi alcançada utilizando pAN7-1 na presença da enzima de restrição *Hind*III (Akamatsu *et al.*, 1997; Linnemannstöns *et al.*, 1999).

No geral, a adição de 5 U de *Hind*III por reação de transformação resultou na obtenção de maior número de transformantes, com eficiência de transformação cerca de duas vezes superior ao tratamento controle (LI). É possível que a concentração ótima de *Hind*III esteja entre 0 e 5 U/reação.

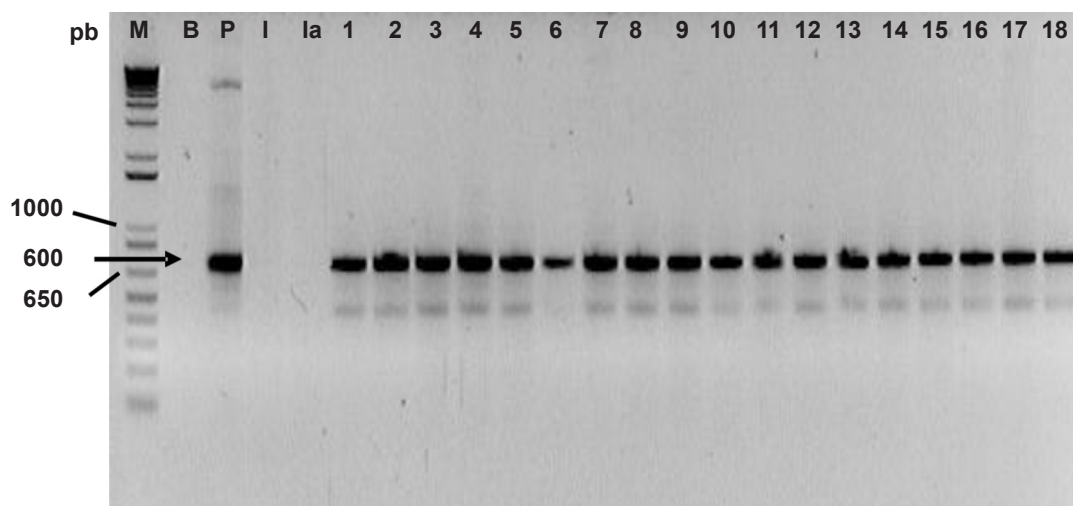
No ensaio A, a adição de 50 U de *Hind*III na reação promoveu pequeno aumento na produção de transformantes em relação ao tratamento sem adição de enzima (Tabela 1). O último ensaio reproduziu melhor a tendência de declínio na eficiência de transformação quando concentrações elevadas de enzima foram utilizadas. No geral, a adição de mais de cinco unidades de *Hind*III na reação de transformação reduziu o número de transformantes. Trinta ou quarenta unidades de enzima provocaram queda drástica do número de transformantes (Tabela 1). O efeito negativo de altas concentrações enzimáticas na frequência de transformantes foi anteriormente verificado em *M. grisea* (Shi *et al.*, 1995). Quando 600 U de *Hind*III ou *Bam*HI, por mL de reação, foram utilizadas para mediar a transformação do isolado Guy 11 com pAN7-2, a recuperação de transformantes foi menor do que a obtida com o vetor circular (Shi *et al.*, 1995). Respostas semelhantes têm sido obtidas com outros fungos fitopatogênicos (Akamatsu *et al.*, 1997; Linnemannstöns *et al.*, 1999). Por exemplo, a reação de transformação de *A. alternata* Keissler patótipo do tomate com mais de 20 U de *Hind*III ou *Xba*I promoveu redução significativa no número

de transformantes (Akamatsu *et al.*, 1997).

É possível que altas concentrações de enzimas produzam danos genéticos irreversíveis que levam à inviabilidade celular (Riggle & Kumamoto, 1998). Contudo, Shi *et al.* (1995) não evidenciaram decréscimo na viabilidade dos protoplastos de *M. grisea* quando altas concentrações de enzimas de restrição foram usadas em procedimentos de transformação sem a presença do vetor, sugerindo que este fungo é capaz de reparar as quebras duplas do DNA causadas pela ação da enzima. Por outro lado, é possível que a clivagem enzimática excessiva ocorra somente quando o DNA transformante está presente (Thon *et al.*, 2000). Além disso, tem sido sugerido que a presença do vetor de transformação é necessária para o acesso da enzima de restrição ao interior do núcleo (Maier & Schäfer, 1999). Outra possibilidade é a constante atividade da enzima nos sítios de restrição, decrescendo a frequência de integração do vetor, e conseqüentemente a eficiência de transformação.

Dezoito indivíduos I-22 resistentes ao antibiótico higromicina, amostrados aleatoriamente, foram examinados para a presença do gene de seleção *hph*. O fragmento esperado de 690 pb, correspondente à região estrutural do gene de seleção *hph*, foi amplificado em todos os 18 indivíduos, confirmando a condição de transformantes (Figura 3).

A presença de *Hind*III favoreceu a transformação de *M. grisea* I-22 com pAN7-1. Contudo, antes de pAN7-1 ser utilizado efetivamente como marcador físico na mutagênese REMI, será necessário analisar o padrão de integração no genoma do ascomiceto, bem como a aleatoriedade desses eventos. A inserção de uma única cópia do vetor em cada transformante e a restauração das seqüências reconhecidas pela enzima de restrição facilitam a recuperação dos genes de patogenicidade inativados. A aleatoriedade dos eventos



**FIG. 3** - Perfil eletroforético dos amplicons de transformantes de *Magnaporthe grisea* I-22 (1 a 18), utilizando os oligonucleotídeos *hph*1 e *hph*2 **M**: marcador de tamanho 1 Kb *Plus* (*Invitrogen*®); **I** e **Ia**: *M. grisea* I-22 e I-21, respectivamente; **B**: reação controle, contendo todos os reagentes, exceto o DNA; **P**: pAN7-1. Os fragmentos de 1000 e 650 pares de base (pb) do marcador estão indicados na margem esquerda. A seta indica os amplicons de 690 pb esperados.

de integração, por sua vez, aumenta a possibilidade de integração em genes de interesse. Análises de hibridização de DNA de transformantes *M. grisea* I-22 estão sendo conduzidas para determinar a frequência desses eventos.

A eficiência da transformação REMI em *M. grisea* envolvendo pAN7-2 foi dependente do tipo de enzima de restrição (Shi *et al.*, 1995). Portanto, outras enzimas de restrição deverão ser analisadas no sistema *M. grisea*:pAN7-1. Além do mais, a alternância de enzimas no programa de mutagênese REMI é interessante porque garante uma distribuição aleatória das integrações e, conseqüentemente, uma maior abrangência do genoma do organismo em estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAMATSU, H., ITOH, Y., KODAMA, M., OTANI, H. & KOHMOTO, K. AAL-toxin-deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. *Phytopathology* 87:967-972. 1997.
- BALHADÈRE, P.V., FOSTER, A.J. & TALBOT, N.J. Identification of pathogenicity mutants of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* by insertional mutagenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:129-142. 1999.
- DE GROOT, M.J.A., BUNDOCK, P., HOOYKAAS, P.J.J. & BEIJERSBERGEN, A.G.M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* 16:839-842. 1998.
- FUJIMOTO, D., SHI, Y., CHRISTIAN, D., MANTANGHIHAN, J.B. & LEUNG, H. Tagging quantitative loci controlling pathogenicity in *Magnaporthe grisea* by insertional mutagenesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61:77-88. 2002.
- IDNURM, A. & HOWLETT, B.J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology* 2:241-255. 2001.
- LEUNG, H., LOOMIS, P. & PALL, M.L. Transformation of *Magnaporthe grisea* to phosphinothricin resistance using the bar gene from *Streptomyces hygrosopicus*. *Fungal Genetics Newsletter* 42:41-43. 1995.
- LINNEMANNSTÖNS, P., VOB, T., HEDDEN, P., GASKIN, P. & TUDZYNSKI, B. Deletions in the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi* by restriction enzyme-mediated integration and conventional transformation-mediated mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2558-2564. 1999.
- LU, S., LYNHOLM, L., YANG, G., BRONSON, C., YODER, O.C. & TURGEON, B.G. Tagged mutations at the *Tox1* locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 91:12649-12653. 1994.
- MAIER, F.J. & SCHÄFER, W. Mutagenesis via insertional-or restriction enzyme-mediated-integration (REMI) as a tool to tag pathogenicity related genes in plant pathogenic fungi. *Biological Chemistry* 380: 855-864, 1999.
- MARCHI, C.E., BROMMONSCHENKEL, S.H., QUEIROZ, M. de V., MIZUBUTI, E.S.G. Produção e regeneração de protoplastos de *Magnaporthe grisea*. *Summa Phytopathologica*. 2006. "no prelo".
- MULLINS, E.D. & KANG, S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58:2043-2052. 2001.
- MULLINS, E.D., CHEN, X., ROMAINE, P., RAINA, R., GEISER, D.M. & KANG, S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* 91:173-180. 2001.
- PUNT, P.J., OLIVER, R.P., DINGEMANSE, M.A., POUWELS, P.H. & VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56:117-124. 1987.
- RECORBET, G., STEINBERG, C., OLIVAIN, C., EDEL, V., TROUVELOT, S., DUMAS-GAUDOT, E., GIANINAZZI, S. & ALABOUVETTE, C. Wanted: pathogenesis-related marker molecules for *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist* 159:73-92. 2003.
- REDMAN, R.S. & RODRIGUEZ, R.J. Factors affecting the efficient transformation of *Colletotrichum* species. *Experimental Mycology* 18:230-246. 1994.
- RHO, H.S., KANG, S. & LEE, Y.H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecules and Cells* 12:407-411. 2001.
- RIACH, M.B.R. & KINGHORN, J.R. Genetic transformation and vector developments in filamentous fungi. In: Bos, C. J. (Ed.) *Fungal genetics: principles and practice*. New York. Marcel Dekker Inc. 1996. pp. 209-233.
- RIGGLE, P.J. & KUMAMOTO, C.A. Genetic analysis in fungi using restriction-enzyme-mediated integration. *Current Opinion in Microbiology* 1:395-399. 1998.
- SCHIESTL, R.H. & PETES, T.D. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 88:7585-7589. 1991.
- SHI, Z., CHRISTIAN, D. & LEUNG, H. Enhanced transformation in *Magnaporthe grisea* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Phytopathology* 85:329-333. 1995.
- SOANES, D.M., KERSHAW, M.J., COOLEY, R.N. & TALBOT, N.J. Regulation of the *MPG1* gene in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15:1253-1267. 2002.
- SOARES, M.A. Transformação e mutagênese insercional em *Penicillium griseoroseum* por REMI (integração mediada por enzima de restrição) (Dissertação de Mestrado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 2002.
- SWEIGARD, J.A., CARROLL, A.M., FARRALL, L., CHUMLEY, F.G. & VALENT, B. *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11:404-412. 1998.
- TALBOT, N.J. & McCAFFERTY, H.R.K. Identification and characterisation of pathogenicity genes from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Cahiers Options Méditerranéennes* 15:137-142. 1997.
- THON, M.R., NUCKLES, E.M. & VAILLANCOURT, L.J. Restriction enzyme-mediated integration used to produce pathogenicity mutants of *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:1356-1365. 2000.

VALENT, B. & CHUMLEY, F.G. Molecular genetic analysis of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Annual Review of Phytopathology 29:443-467. 1991.

VALENT, B., FARRALL, L. & CHUMLEY, F.G. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. Genetics 127:87-101. 1991.

VIAUD, M.C., BALHADÈRE, P.V. & TALBOT, N.J. A *Magnaporthe grisea* cyclophilin acts as a virulence determinant during plant infection. The Plant Cell 14:917-930. 2002.

YAVER, D.S., LAMSA, M., MUNDS, R., BROWN, S.H., OTANI, S., FRANSSEN, L., JOHNSTONE, J.A. & BRODY, H. Using DNA-tagged mutagenesis to improve heterologous protein production in *Aspergillus oryzae*. Fungal Genetics and Biology 29:28-37. 2000.

YUN, S.H., TURGEON, B.G. & YODER, O.C. REMI-induced mutants of *Mycosphaerella zeae-maydis* lacking the polyketide PM-toxin are deficient in pathogenesis to corn. Physiological and Molecular Plant Pathology 52:53-66. 1998.