

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

VALESCA PANDOLFI

**Análise transcricional do fitopatógeno *Fusarium graminearum* Schwabe na  
interação antagonista com a bactéria *Pantoea agglomerans* Gavini**

Piracicaba

2006

VALESCA PANDOLFI

**Análise transcricional do fitopatógeno *Fusarium graminearum* Schwabe na  
interação antagonista com a bactéria *Pantoea agglomerans* Gavini**

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura  
da Universidade de São Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Profa. Dra. Helaine Carrer

Piracicaba

2006

## DEDICATÓRIA

*Àqueles que sempre me incentivaram e me deram muito amor:  
minha mãe, Carmen Terezinha Pandolfi,  
meu pai, Wilson Moacyr Pandolfi (in memoriam);  
meu irmão, Everson Luiz Pandolfi  
e meu grande companheiro, Mauro Guida dos Santos,  
minha gratidão, meu amor, minha vida...*

DEDICO ESTA TESE

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda minha família, em especial minha mãe, Carmen T. Pandolfi, meu irmão, Everson L. Pandolfi, meu pai Wilson M. Pandolfi (*in memoriam*), meu noivo, Mauro G. dos Santos, minha cunhada Lizane Gracioli Pandolfi e minhas sobrinhas Evelyn G. Pandolfi e Yasmin G. Pandolfi pelas suas existências!

Agradeço em especial, minha amiga Erika Cristina Jorge, uma grande parceira que desde o início deste trabalho não mediu esforços para me ajudar. Agradeço pela sua amizade, pelo seu bom humor e palavras de incentivo, principalmente nos momentos mais difíceis;

À Profa. Dra. Helaine Carrer pela orientação, paciência, confiança e oportunidade;

À Profa. Dra. Laudenir M. Prioli e ao Tercílio Calsa Júnior, pela correção da tese, pelas valiosas sugestões e críticas que só enriqueceram este trabalho;

Agradeço àquelas que me deram a mão nos primeiros passos da minha vida profissional e que continuam torcendo por mim, minhas queridas amigas Profa. Dra. Maria Irene B. de Moraes Fernandes, Profa. Dra. Judith Viégas, Dra. Sandra P. Brammer, Dra. Ana Christina Sagebin Albuquerque, e Profa. Dra. Norimar Dávila Denardin;

Um agradecimento especial àqueles que fizeram da minha vida mais feliz nestes últimos quatro anos, minhas amigas Graziela Denardin, Jeanedy Pazinato, Priscylla Ferraz e Maria Clara Pestana e meus amigos Henrique S. Alves, Adriano R. Lucheta, Irving Berger, Tercílio Calsa Júnior, Alexandre Martinez, Lucas B. de Azevedo e Carlos F. Ragassi.

Aos amigos do CEBTEC, Prof. Dr. Murilo de Melo, Prof. Dr. Luiz A. Gallo, Valentina de Fátima de Martin, Enio Tiago de Oliveira, Maria Solizete G. Silva, Antônio F. C. Amaral, Danila M. Melotto Passarin, Simone Guidetti-Gonzalez, Roberta M. Chagas, Keini Dressano, Gregori Ferrão, Eduardo C. M. Picelli, Berenice K. de Alcântara, Davis A. Miguel, Felipe A. Gasparotto, Reimar Padovani e Judite Bonifácio, pelo convívio e amizade.

Ao Dr. Luiz Lehmann Coutinho, por ter disponibilizado a infraestrutura para realização de algumas etapas deste trabalho. Agradeço também a todos os amigos e amigas, em especial, Erika C. Jorge, Lílian Zaros, Ana Paula Dini, Mateus Patricio e Helena J. Alves, pela amizade e auxílio;

Ao Prof. Dr. Augusto Etchegaray, Profa. Dra. Norimar D. Denardin e Caroline S. Pamplona da Silva pelo auxílio em algumas etapas deste trabalho;

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai e ao Dr. Welington Luis de Araújo pelo incentivo, sugestões durante a qualificação e, principalmente, pela amizade;

Ao Prof. Dr. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo pela análise estatística dos dados do macroarranjo;

Ao Mateus Patrício, Jesus P. Mena-Chalco e ao Prof. Dr. Alan Mitchell Durham pela disponibilização das ferramentas de bioinformática para análises dos dados;

Aos amigos da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, pelos quase nove anos de convívio, em especial, Dra. Martha Z. de Miranda, Dra. Rita Maria A. de Moraes, Dr. Edson J. Iorczeski, Dr. Benami Bacaltchuk, Dr. Pedro L. Scheeren, e Dr. Ariano Prestes;

Ao Dr. Wilmar Cório da Luz (Embrapa Trigo) pelas sugestões no projeto de pesquisa, auxílio e pelo fornecimento dos microrganismos utilizado neste trabalho;

À Marília R. G. Henyei pela amizade e pelas correções das referências bibliográficas;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de Doutorado e pelo suporte financeiro necessário à realização desta pesquisa.

Agradeço a DEUS!

## RESUMO

PANDOLFI, V. **Análise transcricional do fitopatógeno *Fusarium graminearum* Schwabe na interação antagonista com a bactéria *Pantoea agglomerans* Gavini.** 2006. 140 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

Gramíneas cultivadas, como trigo, cevada e milho são produtos agrícolas de fundamental importância no Brasil. Entre os fatores causadores de perdas na produção de grãos dessas espécies estão os estresses causados por fitopatógenos como *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorfo *Gibberella zeae* Schw.), agente causador da fusariose e de difícil controle químico, biológico ou mesmo genético. Uma estratégia que tem se mostrado eficiente no controle de doenças é a utilização de microrganismos antagonistas a diferentes fitopatógenos, dentre os quais destaca-se a bactéria *P. agglomerans*. O presente trabalho teve como objetivo identificar genes diferencialmente expressos em interações fungo fitopatogênico-microrganismo antagonista, considerando como modelo o sistema *F. graminearum*-*P. agglomerans*. A construção de uma biblioteca de cDNA de *F. graminearum* cultivado *in vitro* proporcionou a geração de 1.983 seqüências válidas, resultando em 1.283 unigenes. As categorias de maior representatividade desta biblioteca foram aquelas constituídas por proteínas envolvidas em vias da informação genética - DNA-RNA-proteína (26 %); proteínas hipotéticas (24 %) e proteínas do metabolismo (16 %). Tanto a categoria de proteínas envolvidas nos processos de desenvolvimento como as envolvidas na percepção a estímulos externos constituíram 10 % dos unigenes. Dentre os genes presumivelmente anotados, foram identificados aqueles codificadores de enzimas de importantes rotas metabólicas como gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, fosfoglicerato quinases e

fosfoenolpiruvato carboxilases, como também componentes produzidos pelo metabolismo secundário como micotoxinas e outras proteínas associadas a estresse e patogenicidade de fungos. Neste trabalho também foi verificado o potencial de antagonismo *in vitro* da bactéria *P. agglomerans* frente a três fitopatógenos de trigo: *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoem e *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorok.) e *F. graminearum*. Foi verificado que a inibição do crescimento destes fungos está associada à liberação de compostos solúveis e voláteis pela bactéria, que foram responsáveis por cerca de 50 % e 40 % de inibição, respectivamente. O perfil da expressão gênica de *F. graminearum* na interação com a bactéria *P. agglomerans* foi avaliado via macroarranjo. Dos 1.014 genes avaliados, 29 genes de *F. graminearum* foram diferencialmente expressos ( $p < 0,05$ ) durante a interação com a bactéria antagonista, sendo 19 genes induzidos e 10 genes reprimidos. Entre os transcritos induzidos foram identificadas proteínas envolvidas nos processos de defesa e/ou virulência de fungos, cuja expressão foi induzida em resposta a estresses tanto abióticos como bióticos. Dos genes que foram reprimidos, destacaram-se: um transcrito com similaridade a uma proteína com um domínio do tipo dedo de zinco “*zinc finger*” que é um fator de transcrição importante no processo de divisão celular, bem como proteínas envolvidas na cadeia respiratória, na modulação protéica e sinalização celular. Os dados do macroarranjo foram validados via transcrição reversa seguida de PCR quantitativo em tempo real (RT-PCRq), metodologia que se mostrou adequada para complementar a análise transcricional obtida por macroarranjo. As informações geradas na análise de antagonismo *in vitro*, bem como a análise e seqüenciamento dos transcritos, juntamente com a quantificação do nível de expressão na interação, foram fundamentais para compreender o padrão de resposta do fungo *F. graminearum* na interação com a bactéria *P. agglomerans*.

Palavras-chave: cDNA, fitopatógeno, antagonismo, expressão diferencial, RT-PCRq

## ABSTRACT

PANDOLFI, V. **Transcriptional analysis of the phytopathogen *Fusarium graminearum* Schwabe in antagonistic interaction with the bacteria *Pantoea agglomerans* Gavini.** 2006. 140 f. Thesis (Doctoral) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

Cultivated grasses such as wheat, barley and maize are agricultural products of fundamental economic and social importance in Brazil. Among causing factors of important grain production losses in these species are diseases caused by phytopathogenic fungi such as *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorfo *Gibberella zeae* Schw.), the causal agent of fusariosis, a disease of difficult chemical, biological or even genetic control. An efficient and promising strategy to be adopted in order to protect cultivated plants against such diseases is the selection of antagonist microorganisms, amongst them the bacteria *Pantoea agglomerans*. This microbiota might have an important impact in scab control, isolated or in an integrated management program with chemical treatment. The present work aimed at identifying differentially expressed sequences in pathogenic fungi-antagonistic microorganisms interactions, considering the *F. graminearum* – *P. agglomerans* model. The construction of a cDNA library for *F. graminearum* grown in PDA medium generated 1,983 valid sequences and provided 1,283 unigenes. The most representative categories in this library were proteins involved in genetic information pathways, DNA-RNA-protein (26 %); hypothetical proteins (24 %); and proteins involved in metabolism (16 %). The protein category involved in developmental processes as well as those related to external stimuli perception comprised 10 % of the obtained unigenes. Among putatively annotated genes, some coding for enzymes of important metabolic routes were identified, such as glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase, phosphoglycerate kinase and phosphoenolpyruvate carboxylase. Also secondary metabolism compounds, specially micotoxins and proteins related to fungi stresses and pathogenicity were identified. In the present work, the control of three wheat phytopathogens, *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoem, *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.in Sorok.) and *F. graminearum*, using specific isolates of *P. agglomerans* was demonstrated. It was observed that the 50 % and 40 % growth inhibition of these fungi is associated to the bacteria release of soluble and volatile compounds, respectively. The gene expression profile of *F. graminearum* during interaction with the bacteria *P. agglomerans* was evaluated via macroarray. Among the 1,014 analysed genes, 29 *F. graminearum* genes were differentially expressed ( $p < 0,05$ ) during its interaction with the antagonist bacteria: 19 genes were induced while 10 genes were repressed. Among the induced transcripts, proteins involved in fungi defense and/or virulence processes were identified, whose expression was induced in response to abiotic or biotic stresses. Among the identified repressed genes, a transcript similar to a protein containing a zinc finger-type domain, a transcription factor relevant in cell division, deserves special attention, as well as proteins involved in respiratory chain, in protein modulation and in cell signaling. Additionally, the macroarray data were validated by reverse transcription followed by real-time quantitative PCR (RT-PCRq), a suitable method for complementing transcriptional analysis through macroarray. Finally, the information generated in *in vitro* pathogenic fungi-antagonistic microorganisms interactions analysis, as well as in the analysis and sequencing of the obtained transcripts, together with the determination of the level of expression during the evaluated interactions were essential for better understanding the response pattern of the fungus *F. graminearum* in interaction with the bacteria *P. agglomerans*.

Key-words: cDNA, phytopathogen, antagonism, differential expression, RT-PCRq.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                   |   |
|-------------------|---|
| Blast             | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>  |
| BlastN            | comparação de seqüências de nucleotídeos em bancos de dados de DNA;                   |
| BlastX            | comparação seqüência de nucleotídeos contra bancos de proteínas                       |
| cDNA              | ácido desoxirribonucléico complementar ao RNAm  |
| <i>contig</i>     | agrupamento de ESTs alinhados   |
| DH10-B            | cepa de células eletrocompetentes de <i>Escherichia coli</i>                          |
| EST               | etiqueta de seqüência expressa  |
| E-value           | <i>expected value</i> , indica o grau de "confiabilidade" de um alinhamento.          |
| FGDB              | <i>Fusarium Graminearum Data Base</i>   |
| IPTG              | $\beta$ -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo  |
| MIPS              | <i>Munich Information Center for Protein Sequences</i>                                |
| NCBI              | <i>National Center for Biotechnological Information</i>                               |
| PCR               | reação em cadeia da polimerase  |
| rDNA 16S          | DNA ribossômico 16S   |
| RNAm              | ácido ribonucléico mensageiro   |
| RT-PCRq           | transcrição reversa seguida de PCR quantitativo em tempo-real                         |
| <i>singletons</i> | ESTs que não tiveram similaridade o suficiente para serem agrupadas em <i>contigs</i> |
| T.A.              | temperatura ambiente  |
| X-Gal             | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactopiranosídeo                                |
| IP                | <i>Image Plate</i>  |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|     |                   |
|-----|-------------------|
| °C  | graus Celsius     |
| Kb  | Quilobases        |
| Pb  | pares de bases    |
| U   | unidade de enzima |
| p/v | peso/volume       |
| v/v | volume/volume     |
| ng  | Nanograma         |
| µg  | Micrograma        |
| µl  | Microlitro        |
| µm  | micrômetro        |

## SUMÁRIO

|         |  |    |
|---------|--|----|
|         | <b>RESUMO</b> .....  | 5  |
|         | <b>ABSTRACT</b> .....  | 7  |
|         | <b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....  | 9  |
|         | <b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....   | 10 |
|         | <b>SUMÁRIO</b> .....   | 11 |
| 1       | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 14 |
| 2       | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 16 |
| 2.1     | <i>Fusarium graminearum</i> e fusariose.....   | 16 |
| 2.2     | Utilização de microrganismos como biocontrole de doenças.....  | 18 |
| 2.3     | Utilização de arranjos de DNA na análise de expressão gênica.....  | 20 |
| 3       | <b>PERFIL TRANSCRICIONAL DO FUNGO FITOPATOGÊNICO <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i> SCHWABE COM BASE EM ESTS (<i>EXPRESSED SEQUENCE TAGS</i>)</b> ..... | 24 |
|         | RESUMO.....  | 25 |
|         | ABSTRACT.....  | 27 |
| 3.1     | INTRODUÇÃO.....  | 29 |
| 3.2     | MATERIAL E MÉTODOS.....  | 33 |
| 3.2.1   | Condições de cultivo de <i>F. graminearum</i> .....  | 33 |
| 3.2.2   | Construção da biblioteca de cDNA.....  | 33 |
| 3.2.2.1 | Extração de RNA total.....   | 33 |
| 3.2.2.2 | Isolamento do RNA mensageiro.....  | 34 |
| 3.2.2.3 | Síntese do cDNA fita dupla.....  | 35 |
| 3.2.2.4 | Fracionamento do cDNA e clonagem no vetor pSPORT1.....   | 37 |
| 3.2.2.5 | Transformação em células competentes.....  | 38 |
| 3.2.2.6 | Extração do DNA plasmidial – Miniprep.....   | 39 |
| 3.2.2.7 | Validação da biblioteca de cDNA.....   | 40 |
| 3.2.2.8 | Reação de Sequenciamento.....  | 40 |
| 3.2.3   | Análise das ESTs.....  | 41 |
| 3.2.3.1 | Análise de similaridade e anotação funcional das seqüências únicas.....  | 42 |
| 3.3     | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 43 |
| 3.3.1   | Construção e análise da biblioteca de cDNA.....  | 43 |
| 3.3.2   | Análise das ESTs.....  | 46 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 3.3.3   | Distribuição das ESTs em <i>contigs</i> e <i>singletons</i> .....  | 46 |
| 3.3.4   | Análise de similaridade (BlastX ) contra o banco (nr) do <i>GenBank</i> .....  | 48 |
| 3.3.5   | Análise de similaridade (BlastN e BlastX) contra o banco FGDB – MIPS.....  | 49 |
| 3.3.6   | Análise comparativa: biblioteca FGEQBDA <i>versus</i> biblioteca FGDB (MIPS).....  | 51 |
| 3.3.7   | Classificação funcional dos unigenes.....  | 53 |
| 3.3.8   | Análise de redundância dos transcritos.....  | 58 |
| 3.4     | CONCLUSÕES.....  | 64 |
| 4       | <b>ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS DE <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i> SCHWABE EM RESPOSTA A INTERAÇÃO ANTAGONISTA COM A BACTÉRIA <i>PANTOEA AGGLOMERANS</i> GAVINI, COM BASE EM MACROARRANJOS</b> ..... | 65 |
|         | RESUMO.....  | 66 |
|         | ABSTRACT.....  | 68 |
| 4.1     | INTRODUÇÃO.....  | 70 |
| 4.2     | MATERIAL E MÉTODOS.....  | 73 |
| 4.2.1   | Análise do antagonismo da bactéria <i>P. agglomerans</i> frente ao fungo <i>F. graminearum</i> .....   | 73 |
| 4.2.1.1 | Cultura dos microrganismos.....  | 73 |
| 4.2.1.2 | Seleção do isolado da bactéria com maior eficiência de antagonismo.....  | 74 |
| 4.2.1.3 | Análise qualitativa de produtos produzidos por <i>P. agglomerans</i> no antagonismo contra alguns fungos fitopatogênicos.....  | 76 |
| 4.2.2   | Confirmação da classificação taxonômica do isolado <i>P. agglomerans</i> 1494.4.2A pela amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA.....  | 78 |
| 4.2.2.1 | Reação de sequenciamento do gene 16S rDNA.....   | 79 |
| 4.2.2.2 | Análise e identificação das seqüências de DNA.....   | 80 |
| 4.2.3   | Seleção dos clones de <i>F. graminearum</i> para confecção dos macroarranjos.....  | 80 |
| 4.2.3.1 | Confecção das membranas de macroarranjos.....  | 80 |
| 4.2.3.2 | Normalização das membranas pela sonda plasmidial – <i>Overgo</i> .....   | 83 |
| 4.2.3.3 | Hibridização com a sonda plasmidial.....   | 83 |
| 4.2.3.4 | Geração das imagens das membranas.....   | 85 |
| 4.2.3.5 | Extração do RNA total de <i>F. graminearum</i> e síntese da sonda de cDNA.....   | 85 |
| 4.2.3.6 | Hibridização dos macroarranjos com as sondas FgC e FgI.....  | 88 |
| 4.2.3.7 | Normalização dos dados e análise estatística.....  | 89 |
| 4.2.4   | Validação dos dados do macroarranjo por RT-PCRq.....   | 90 |
| 4.2.4.1 | Seleção dos genes e obtenção dos <i>primers</i> .....  | 91 |

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| 4.2.4.2 | Síntese de cDNA fita simples.....  | 92  |
| 4.2.4.3 | PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-PCRq).....  | 93  |
| 4.3     | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 94  |
| 4.3.1   | Análise do antagonismo da bactéria <i>P. agglomerans</i> frente ao fungo <i>F. graminearum</i> .....                                       | 94  |
| 4.3.2   | Análise qualitativa dos produtos secundários produzidos por <i>P. agglomerans</i> no antagonismo contra alguns fungos fitopatogênicos..... | 98  |
| 4.3.3   | Confirmação da classificação taxonômica do isolado <i>P. agglomerans</i> 1494.4.2A pela análise do gene rDNA 16S.....                      | 102 |
| 4.3.4   | Análise estatística dos dados obtidos no experimento com macroarranjos.....  | 105 |
| 4.3.5   | Genes de <i>F. graminearum</i> diferencialmente expressos na interação com <i>P. agglomerans</i> ....                                      | 108 |
| 4.3.5.1 | Trancritos de <i>F. graminearum</i> super-expressos.....   | 110 |
| 4.3.5.2 | Trancritos de <i>F. graminearum</i> reprimidos.....  | 115 |
| 4.3.6   | Validação dos dados de Macroarranjo por RT-PCRq.....   | 117 |
| 4.4     | CONCLUSÕES.....  | 125 |
| 5       | CONCLUSÕES.....  | 126 |
|         | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 127 |

## 1. INTRODUÇÃO

Gramíneas cultivadas, como o milho e os cereais de inverno trigo e cevada, são produtos agrícolas de fundamental importância no Brasil e a redução na produção dos mesmos acarreta prejuízos consideráveis à economia e à sociedade. Entre os fatores causadores de perdas de produtividade nessas espécies, estão os estresses causados por fungos hemibiotróficos como *Fusarium graminearum*, agente causador da fusariose, principalmente por ser destrutivo e de difícil controle químico, biológico, cultural ou mesmo genético.

Uma estratégia que tem se mostrado eficiente e promissora no manejo de doenças é a seleção de antagonistas a diferentes fitopatógenos capazes de, eficientemente, serem agregados ao arsenal de proteção contra a doença. Microorganismos descritos como antagonistas em potencial sobre *F. graminearum* incluem vários gêneros de bactérias gram-negativas e gram-positivas. Entre estas, encontra-se a *Pantoea agglomerans*, uma bactéria gram-negativa e endofítica, capaz de habitar o interior dos tecidos vegetais da planta hospedeira sem causar danos à mesma.

A caracterização, o seqüenciamento, a análise funcional e, principalmente, a disponibilização de genes envolvidos no sistema de bioproteção contra doenças fúngicas têm sido prioridades em estudos realizados em diferentes culturas, destacando-se as de expressão agrícola como os cereais. Desta forma, a construção de bibliotecas de cDNAs de fungos fitopatogênicos tem gerado informações úteis para estudos de predição de genes, principalmente daqueles relacionados aos processos de patogenicidade.

O uso de metodologias como macroarranjos permite a análise global do perfil transcricional de organismos em resposta a determinados processos biológicos, inclusive a resposta a condições de estresse. Análises da expressão diferencial de seqüências genômicas relacionadas à patogenicidade de *F. graminearum*, baseadas em macroarranjos, podem auxiliar a estabelecer a base de conhecimentos sobre como este fitopatógeno responde a

condições adversas. Além disso, as informações geradas nestes estudos constituem fonte de pesquisa para outros fitopatógenos, acelerando a determinação e a caracterização dos genes de virulência, assim como de genes ativados ou silenciados quando em presença de um agente antagônico. Complementando esses estudos, análises de caracterização funcional dos transcritos diferencialmente expressos são obviamente fundamentais para a determinação de sua natureza química e para o conhecimento de seu modo de ação em processos biológicos como os de fitopatogenicidade. Assim sendo, a proposta de pesquisa aqui apresentada tem como objetivo gerar conhecimentos sobre seqüências diferencialmente expressas em interações fungo fitopatogênico x microrganismo antagonista, utilizando como modelo o sistema *Fusarium graminearum* x *Pantoea agglomerans* no trigo.

Os dados obtidos neste trabalho poderão constituir uma base para estudos futuros da constituição e função dos genes do microrganismo antagonista, bem como dos componentes envolvidos na sua interação com o fitopatógeno. A ampliação da base de conhecimentos sobre os mecanismos responsáveis pela patogenicidade em plantas certamente auxiliará o estabelecimento de manejos adequados e poderá até levar à solução do problema da incidência de sérias doenças fúngicas de plantas de importância agrônômica, que são fundamentais para o desenvolvimento econômico.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Fusarium graminearum* e fusariose

Entre os agentes causadores de consideráveis perdas na agricultura destaca-se o fungo patogênico *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorfo *Gibberella zae* Schw.) espécie que causa a séria doença conhecida como fusariose, e que é de difícil controle químico, agrônômico ou mesmo genético (LIMA, 2002; LUZ; STOCKWELL; BERGSTROM, 2003; PANISSON; REIS; BOLLER, 2003; REIS, 1986).

A importância do *F. graminearum* como um dos principais fitopatógenos de plantas cultivadas se deve, em grande parte, à sua capacidade de sobreviver entre as estações de cultivo e de se adaptar à vida e crescimento saprofítico em resíduos vegetais de culturas hospedeiras (SNIJDERS, 1990; SUTTON, 1982).

Este fungo é caracterizado por apresentar, durante seu ciclo de vida, a fase saprofítica e a fase parasitária, ao mesmo tempo que é considerado um fungo competidor, capaz de grande variação na virulência (CARTER et al., 2002; GANG et al, 1998; MIEDANER; SCHILLING, 1996). Durante a fase saprofítica, sobrevive na forma teleomórfica, também chamada de sexual, e recebe o nome de "*Gibberella zae*", caracterizada pela produção de peritécios (corpos de frutificação). Na presença do hospedeiro, a partir do espigamento (estádio inicial de suscetibilidade) e sob condições climáticas favoráveis, os peritécios liberam os ascósporos que, ao atingirem as espigas, germinam, dando início à fase parasitária, que se transforma na fase anamórfica ou assexual, denominada "*F. graminearum*" (LIMA, 2004; PUHALLA, 1981). Tanto os macroconídios (fase assexual) como os ascósporos (sexual) infectam os tecidos vegetais. Na antese, a infecção por *F. graminearum* tem início nas anteras, propagando-se sistematicamente até atingir toda a espiga (SUTTON, 1982).

Os sintomas da fusariose são de difícil diagnóstico para algumas culturas, uma vez

que a descoloração é facilmente confundida com sintomas causados por outros patógenos de sementes ou por fatores abióticos (TEKAUZ et al., 2000). Em cereais de inverno como o trigo e a cevada, os sintomas da fusariose são caracterizados pela coloração rosa-salmão das espiguetas, que podem morrer antes mesmo de formar o grão (VAN GINKEL et al., 1996). Os grãos, quando formados, apresentam baixo peso e coloração rosada (LIMA, 2002). Além disso, nos grãos de trigo ocorre menor proporção de gluteninas, proteínas de reserva características da espécie, principais determinantes da qualidade tecnológica deste cereal, e queda na extração de farinha (DEXTER, 1997). Em milho, é um dos patógenos mais encontrados associados à podridão do colmo, e da espiga. Ocasionalmente, esta podridão pode iniciar-se na base e progredir para a ponta da espiga, confundindo o sintoma com aquele causado por outras espécies de *Fusarium* como *F. moniliforme* ou *F. subglutinans*. As sementes infectadas constituem importantes fontes de inóculos, cujos patógenos podem causar podridões de sementes, morte de plântulas e podridões radiculares (PINTO, 2002; REIS et al., 2004).

Juntamente, com outras enfermidades de sementes e de raízes, a fusariose pode provocar um grande impacto econômico e social em função dos prejuízos causados a várias culturas, não somente na produção, mas também na qualidade, palatabilidade e no valor nutritivo dos grãos (LUZ, 1999). Um fator determinante desta enfermidade é a produção de uma substância tóxica, o desoxinivalenol (DON), popularmente denominado vomitoxina, que inviabiliza o uso dos grãos tanto para consumo humano como animal (LIMA, 2002; PLACINTA; D'MELLO; MACDONALD, 1999; STOCKWELL et al., 1997).

Ainda não se conhece uma forma eficaz de controle da fusariose. Entretanto, algumas práticas têm sido adotadas no intuito de amenizar o impacto desta enfermidade, a exemplo da rotação de culturas e do tratamento químico (LUZ, 2001a; PICININI; FERNANDES, 2001). O controle por meio de rotação de culturas, embora recomendado, é

ineficiente uma vez que o fungo sobrevive nas sementes e nos restos da cultura de um grande número de hospedeiros (REIS; CASA, 1998; WIESE, 1987). A aplicação de fungicidas, por sua vez, além da baixa eficiência no controle do desenvolvimento do fungo, resulta no acúmulo de resíduos químicos nos grãos após a colheita, aumentando o risco à saúde animal e humana (LUZ, 2001a; PICININI; FERNANDES, 2001). Finalmente, o uso de genótipos resistentes é a forma mais correta de controle da doença (MESTERHAZY, 1997). Porém, existem poucas fontes de resistência genética conhecidas e a incorporação de genes de resistência é uma tarefa difícil, uma vez que há uma variação muito alta na virulência de isolados dentro e entre espécies (CARTER et al. 2002; GANG *et al.* 1998; LIMA, 2002; MIEDANER; SCHILING, 1996). Além disso, o entendimento do mecanismo de patogenicidade em fungos é bastante complexo, uma vez que é regulado por um conjunto de genes, cuja função pode estar relacionada à formação de estruturas de infecção, na produção de enzimas de degradação celular, ou na produção micotoxinas (IDNURM; HOWLETT, 2001).

## **2.2. Utilização de microrganismos como biocontrole de doenças**

O uso de microrganismos antagonistas a diferentes fitopatógenos tem sido uma alternativa eficiente e promissora no manejo e controle de doenças de plantas. Estes microbiotas têm tido um importante papel no controle da fusariose, tanto utilizados isoladamente por meio de pulverização de bioprotetores, como utilizados para a inoculação de sementes em uma medida adicional ao tratamento químico (LUZ, 2001b, 2001c; STOCKWELL; LUZ; BERGSTROM, 1997).

A diversidade de microrganismos eficientes no controle de *F. graminearum* em importantes culturas como o trigo, o milho e a cevada, é representada por 15 diferentes espécies, entre elas, a bactéria *Pantoea agglomerans* (LUZ, 2001c). Embora patologistas e

microbiologistas de plantas tivessem considerado os nomes *Erwinia herbicola* e *Enterobacter agglomerans* como sinônimos, Gavini et al. (1989) propuseram a reclassificação da estirpe dentro de *herbicola* e *agglomerans*, respectivamente, baseado na homologia entre seqüências de DNA. Desta forma, um novo gênero e duas espécies foram propostas: *Pantoea agglomerans* e *Pantoea dispersa*. Estirpes identificadas provisoriamente como *Erwinia herbicola* foram reclassificadas como *Pantoea dispersa* e outras como *Pantoea agglomerans* (GAVINI et al., 1989).

A espécie *P. agglomerans* é uma bactéria gram-negativa e anaeróbica facultativa, que cresce bem em temperaturas próximas a 30°C, como a maioria das estirpes apresentando coloração amarelada. É capaz de crescer e sobreviver na superfície e no interior de tecidos de plantas, como raízes, caule e folhas, bem como no solo e na água (BERGEY, et al., 1994; RUPPEL et al., 1992). Devido à característica endofítica, é capaz de habitar o interior dos tecidos da planta hospedeira sem causar danos à mesma (AZEVEDO et al., 2000). Assim, esta bactéria apresenta um grande potencial para o controle biológico de fitopatógenos que compartilham o mesmo nicho ecológico (KUNOH, 2002; COOMBS et al., 2004). Apesar da pouca informação sobre as propriedades antagônicas entre microrganismos, sabe-se que estão baseadas em predação, competição por nutrientes, parasitismo direto e produção de metabólitos (BORMANN et al., 1999; LODEWYCKX et al., 2002; GREGOLETTI Jr.; SANTOS; AUER, 2004).

Embora os testes de seleção *in vitro* e *in vivo* de microrganismos com potencial antagonista sejam métodos complementares, muitas vezes, os resultados positivos *in vitro* não coincidem, ou são opostos àqueles obtidos *in vivo*. Entretanto, os métodos *in vitro*, além de serem práticos, servem como uma seleção preliminar para avaliar a capacidade antagonista, e também indicam o comportamento do microrganismo em relação à sua capacidade de adaptação, crescimento, reprodução etc. (GREGOLETTI Jr.; SANTOS; AUER, 2004). Em tal

contexto, a aplicação de técnicas moleculares em estudos envolvendo a interação patógeno x microrganismo antagonista poderá ser eficientemente utilizada para analisar, com alto nível de resolução, a expressão diferencial de seqüências associadas a este tipo de interação.

### **2.3. Utilização de arranjos de DNA na análise de expressão gênica**

Diferentes metodologias têm sido empregadas com a finalidade de medir a expressão diferencial de genes em resposta celular a uma variedade de estímulos químicos ou físicos (CARULLI et al., 1998) e incluem: *northern blotting* (ALWINE; KEMP; STARK, 1977), *differential display* (LIANG; PARDEE, 1992), *serial analysis of gene expression* (VELCULESCU et al., 1995), *dot blots* (LENNON; LEHARACH, 1991), RT-PCR (WATAKABE et al., 2001). Embora estas técnicas sejam amplamente utilizadas na análise de variação de expressão gênica, a escolha deve ser criteriosamente avaliada, para que a eficiência e viabilidade da técnica sejam condizentes com o objetivo do estudo em questão.

Estudos de análise de expressão gênica têm utilizado, com sucesso, técnicas de arranjos de DNA (BALDWIN et al., 1999). A maior vantagem do uso desta metodologia, quando comparada às técnicas convencionais, é a possibilidade de se analisar a expressão gênica de uma determinada amostra biológica em escala genômica, ou seja, é possível visualizar o padrão de expressão de milhares genes simultaneamente (DOPAZO et al., 2001; FREEMAN; ROBERTSON; VRANA, 2000). Mesmo em larga escala, esta metodologia apresenta maior sensibilidade, facilitando a análise comparativa de um grande número de amostras (VAN HAL et al., 2000).

A metodologia de arranjos de DNA utiliza suportes sólidos, comumente vidro ou náilon, onde são fixadas seqüências completas ou parciais de DNA (ESTs, produtos de PCR, plasmídeos ou bactérias contendo plasmídeos). As sondas de cDNAs são produzidas a partir da transcrição reversa dos RNA mensageiros na presença de fluoróforos ou isótopos radioativos, obtidos de células sob condições específicas. Estas sondas de cDNA são

submetidas à hibridização com o DNA fixado na membrana ou lâmina. A intensidade do sinal de radiação emitido pelas moléculas hibridizadas no suporte sólido é o critério para a quantificação da concentração do transcrito correspondente. Assim, a intensidade de hibridização é determinada, por meio de um processo automatizado, sendo então convertida em uma leitura quantitativa, que é relativa ao nível de expressão de cada gene. Desta forma, a indução ou repressão de cada gene é medida em função desta intensidade de sinal emitido em cada condição testada (COX, 2001; FELIX et al., 2002; FREEMAN; ROBERTSON; VRANA, 2000).

Embora várias denominações sejam freqüentemente utilizadas na literatura, os arranjos de DNA são diferenciados por três aspectos fundamentais, ou seja, o tipo de suporte, método de detecção e número de genes analisados (FREEMAN; ROBERTSON; VRANA, 2000). Microarranjos ou *Microarrays*, também conhecidos como *DNA arrays*, *Oligonucleotide arrays*, *cDNA glass slides* e *Gene chip*, são geralmente assim denominados para descrever os arranjos em suporte de vidro ou *chips* de sílico, utilizam nucleotídeos fluorescentes (*Cy3* e *Cy5*) para marcação da sonda, e o número de genes avaliados pode ser superior a 50.000. Os termos Macroarranjos ou *Macroarrays*, também conhecidos como *High Density Membranes*, *Nylon arrays*, *cDNA macroarrays* e *Filter arrays*, são usados para arranjos que utilizam membranas de náilon ou nitrocelulose como suporte sólido. A detecção de sinal dos macroarranjos é realizada pela incorporação de  $P^{32}$  (DERISI et al., 1996; FREEMAN; ROBERTSON; VRANA, 2000; HARRINGTON; ROSENOW; RETIEF, 2000) ou preferencialmente  $P^{33}$ , porque permite maior sensibilidade e resolução de sinal (BERTUCCI et al., 1999; COX, 2001). Segundo Kuhn et al. (2001), o número de genes analisados numa membrana de macroarray pode variar de 5.000 a 6.000 genes.

Com microarranjos é possível a análise de um maior número de genes simultaneamente e com maior sensibilidade, porém estes tipos de arranjos não permitem sua

reutilização (KUHN et al., 2001). Esta limitação, associada à exigência de equipamentos mais complexos, faz com que a utilização de microarranjos seja ainda uma metodologia de alto custo, sendo inviável para muitos experimentos (VAN HAL et al., 2000; KUHN et al., 2001). Outro fator importante que limita seu uso é que os microarranjos atualmente disponíveis estão restritos a relativamente poucos organismos (LUCCHINI et al., 2001; YE et al., 2001).

Desta forma, o macroarranjo tem sido considerado uma técnica adequada e eficiente para análise transcricional de centenas a milhares de genes (BALDWIN et al., 1999; FREEMAN; ROBERTSON; VRANA, 2000), de fácil implementação e a um custo mais acessível uma vez que emprega metodologias rotineiras em laboratórios de biologia molecular. Outra vantagem em se utilizar macroarranjos é a sua maior flexibilidade de fixação dos genes nas membranas, que pode ser realizada roboticamente ou manualmente, além de disso, as membranas podem ser reutilizadas em novas hibridizações (FREEMAN; ROBERTSON; VRANA, 2000; KUHN et al., 2001). Assim, a técnica de macroarranjos não requer grandes investimentos e/ou longos períodos de padronização de metodologia (BALDWIN et al., 1999; FELIX et al., 2002).

Os arranjos de DNA têm sido utilizados como metodologia em estudos tanto de microrganismos eucariotos como procariotos, com destaque em: comparação do nível transcricional de organismos sob vários estádios de desenvolvimento, condições de cultivo ou sob algum tipo de estresse; elucidação da interação DNA - proteína; predição de novos genes; determinação de fatores de virulência de patógenos e mecanismos envolvidos na interação patógeno – hospedeiro, como também na derminação da função gênica em determinadas vias metabólicas (BALDWIN et al., 1999; LUCCHINI et al., 2001; VAN HAL et al., 2000; YE et al., 2001).

Experimentos com micro e/ou macroarranjos de DNA podem ser realizados com seqüências parciais de genomas, como por exemplo, ESTs. Este fato tem gerado novas

perspectivas em estudos de expressão gênica, tendo em vista os inúmeros projetos de transcriptomas em andamento. Nos últimos anos, estudos têm sido conduzidos utilizando-se arranjos de DNA, com diversas espécies de microorganismos tais como, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pilory*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* (AIGN et al., 2003; DERISI et al., 2000; HAYES et al., 2002; KUHN et al., 2001; SIMS et al., 2004; YE et al., 2001; ZHANG et al., 2002).

O aumento de seqüências geradas por programas de sequenciamento tanto de genomas completos como seqüências parciais de diferentes organismos têm proporcionado à comunidade científica, um grande número de informações importantes na elucidação e entendimento dos mecanismos globais relacionados aos fenômenos biológicos (DOPAZO et al., 2001; VAN HAL et al., 2000). Enquanto a construção de bibliotecas de ESTs tem proporcionado maior rapidez na identificação de novos genes, a técnica de micro ou macroarranjos tem permitido a análise global da expressão desses genes e são, portanto, consideradas técnicas complementares (WANG; HU; LEGER, 2005).

Segundo Melo et al. (2002), menos de 5 % dos microrganismos existentes são conhecidos e suas funções são ainda menos conhecidas. Também ainda pouco conhecidas são as interações patógeno x hospedeiro e patógeno x antagonistas, que poderão se beneficiar da ampliação da base de conhecimentos gerada pelas técnicas de biologia molecular. Dessa forma, o uso de técnicas moleculares torna possível uma análise detalhada, tanto de genes dos fungos causadores de doenças em plantas, como dos microrganismos a eles antagônicos, em interações patogênicas, permitindo expandir a aplicação de ferramentas de grande potencial em processos de obtenção de cultivares resistentes ao ataque de microrganismos patogênicos, como a engenharia de metabolismo e a transformação genética (GHANNOUM; RICE, 1999; MARASCHIN; VERPOORTE, 2002).

**3. PERFIL TRANSCRICIONAL DO FUNGO FITOPATOGÊNICO *FUSARIUM GRAMINEARUM* SCHWABE COM BASE EM ESTs (*EXPRESSED SEQUENCE TAGS*).**

## RESUMO

PANDOLFI, V. **Perfil transcricional do fungo fitopatogênico *Fusarium graminearum* Schwabe com base em ESTs (expressed sequence tags)** 2006. 140 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

Perdas na produção e qualidade de grãos de culturas de importância econômica como trigo, milho e cevada causadas pelo fitopatógeno *Fusarium graminearum* Schwabe é uma realidade na agricultura brasileira e no mundo. Desta forma a análise genômica funcional como a disponibilização de genes envolvidos no sistema de bioproteção contra doenças como a fusariose têm sido uma das prioridades em estudos realizados em diferentes culturas. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de sequências espessas (ESTs) a partir de uma biblioteca de cDNA do fitopatógeno *F. graminearum* isolado de espigas de cultivares de trigo nacional cultivado sob condições de cultura *in vitro*, visando a obtenção de um banco de dados de genes expressos deste microrganismo, disponibilizado para estudos futuros de expressão gênica, inclusive na interação com organismos antagonistas. Foi obtido um índice de sucesso de 87 %, resultando em 1.983 seqüências válidas. A montagem dessas seqüências válidas resultou na formação de 1.282 unigenes, constituídos por 1.008 *singletons* e 274 *contigs*. Na análise pelo BlastX pelo *GenBank*, 88 % os unigenes apresentaram similaridade ( $e\text{-value} \leq 10^{-5}$ ) com proteínas deste banco de dados, entretanto, 91 % destes apresentaram similaridade a proteínas hipotéticas. Quando estas seqüências foram analisadas pelo banco específico de *F. graminearum* (FGDB-MIPS), a frequência de proteínas hipotéticas foi quase quatro vezes inferior ao obtido no *GenBank*. A anotação dos unigenes foi realizada, presumivelmente, de acordo com as categorias funcionais (FunCat-MIPS). As categorias de maior representatividade desta biblioteca de cDNA foram aquelas constituídas por: proteínas envolvidas em vias da informação genética DNA-RNA-proteína (26 %); proteínas hipotéticas

(24 %) e proteínas do metabolismo (16 %). Tanto a categoria de proteínas envolvidas nos processos de desenvolvimento como as envolvidas na percepção a estímulos externos constituíram 10 % dos unigenes. A categoria constituída por proteínas envolvidas nos transporte celular e a categoria *no hit* (sem similaridade) representaram 8 % e 6 % dos unigenes, respectivamente. Também foi obtido 6 % dos unigenes que apresentaram similaridade a proteínas associadas à estresses em geral. A análise de redundância revelou que apenas 4 % dos transcritos apresentaram alta ou média expressão e destes, 45 % apresentaram similaridade com proteínas hipotéticas, sem uma função presumível por este banco de dados. Dentre os genes presumivelmente anotados, destacam-se os que codificam para enzimas importantes em vias metabólicas, principalmente integrantes do metabolismo de carboidratos como, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, fosfoglicerato quinases e fosfoenolpiruvato carboxilases. Também foram identificados componentes produzidos pelo metabolismo secundário, como micotoxinas, proteínas associadas a estresse e patogenicidade de fungos. Este estudo possibilitou a geração de um grande número de informações sobre o perfil de expressão de genes deste fitopatógeno induzidos em resposta a estresses semelhantes ao obtido pelo fungo durante o processo de infecção, contribuindo para o conhecimento dos mecanismos envolvidos durante a interação patógeno – hospedeiro.

Palavras-chave: cDNA, expressão gênica, fusariose, sequenciamento de DNA

## ABSTRACT

PANDOLFI, V. **Transcriptional profile of the phytopathogen fungus *Fusarium graminearum* Schwabe, based on ESTs (expressed sequence tags) analysis.** 2006. 140 f. Thesis (Doctoral) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

Losses in production and quality of economically important grain crops, for instance wheat, maize and barley, caused by the phytopathogen *Fusarium graminearum* Schwabe is a reality in Brazilian and in worldwide agriculture. Hence, functional genomics analysis searching for genes involved in bioprotection against diseases, such as fusariosis, has been a priority in different crops. The objective of this work was to obtain expressed sequences (ESTs) of a cDNA library, which was constructed from the phytopathogen *F. graminearum* isolated from spikes of national cultivars of wheat, under *in vitro* conditions, aiming at obtaining a database of expressed genes that can be useful for future studies on gene expression and interaction of this phytopathogen to antagonist organisms. A success index of 87 % resulted in 1,983 valid sequences. The assembly of valid sequences lead to the formation of 1,282 unigenes, consisted by 1,008 *singletons* and 274 *contigs*. In the BlastX analysis against the *GenBank*, 88 % of unigenes were similar (e-value  $\leq 10^{-5}$ ) to known proteins, however, 91 % of these unigenes displayed similarity to hypothetical proteins. When these sequences were analysed at the *F. graminearum* specific dataset (FGDB-MIPS), the hypothetical proteins frequency was almost four times lower than the one obtained at the *GenBank*. Unigene annotations were putatively performed according to established functional categories (FunCat-MIPS). The highest representativeness categories in this cDNA database comprised: proteins involved on genetic information - DNA-RNA-protein (26 %); hypothetical proteins (24 %) and metabolism proteins (16 %). Proteins associated with developmental processes as well as

proteins involved in perception of external stimuli comprised 10 % of unigenes. Cell transport and no hit (no similarity) categories represented 8 % and 6 % of unigenes, respectively. In addition, 6 % of the unigenes presented similarity to proteins associated to stresses in general. Redundancy analysis revealed that only 4 % of transcripts presented high or medium expression levels and, from these, 45 % were similar to hypothetical proteins, without any putative function in this database. Among putatively annotated genes, it was remarkable the presence of important enzymes involved in metabolic routes, mainly in carbohydrate metabolism, such as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinases and phosphoenolpyruvate carboxylases. Important compounds associated to secondary metabolism were also identified, such as micotoxins, proteins related to fungi stress and pathogenicity. This study generated fundamental information about gene expression profile of this phytopathogen in response to stresses that are similar to infection process, contributing to the understanding of genetic and biochemical mechanisms involved at pathogen-host interactions.

Key-words: cDNA, gene expression, fusariosis, DNA sequencing

### 3.1. INTRODUÇÃO

O fungo *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomórfo *Gibberella zeae* - Schwein. Petch) é considerado um dos mais importantes patógenos de trigo (*Triticum aestivum* L. em. Thell), cevada (*Hordeum vulgare* L.) e milho (*Zea mays* L.), no Brasil e em vários países (LIMA, 2002; LUZ; STOCKWEL; BERGSTROM, 2003; REIS, 1986). A doença causada por este fitopatógeno, conhecida por fusariose, é considerada um dos grandes obstáculos para a manutenção da estabilidade da produção de grãos.

Um dos grandes desafios em estudos de interação patógeno x hospedeiro é entender como os organismos respondem ao ambiente onde vivem e como se comportam frente a uma condição de estresse. Tem sido reportado que a cultura *in vitro* de microrganismos fitopatogênicos sob o efeito de algum estresse nutricional ou ambiental pode favorecer a indução de genes relacionados à patogenicidade, uma vez que estas condições simulariam aquelas encontradas por estes microrganismos durante o processo de infecção (NIGENT, CHOFFE; SAVILLE, 2004; TRAIL et al., 2003). Metodologias moleculares nas áreas da genômica, transcriptoma e proteômica têm sido bastante utilizadas em estudos que visam investigar como organismos respondem a condições adversas, como choque térmico, exposição a drogas, estresse nutricional e ataque de patógenos (FELIX et al., 2002).

O conhecimento do genoma completo de *Haemophilus influenzae*, o primeiro microrganismo a ter seu genoma seqüenciado (FLEISCHMANN et al., 1995), abriu novas perspectivas para a descoberta e interpretação das funções de seqüências de DNA numa escala genômica de diferentes organismos. Um exemplo é o seqüenciamento do fungo *Saccharomyces cerevisiae* (GOFFEAU et al., 1996), o primeiro eucarioto a ter seu genoma seqüenciado e referido como um dos fungos modelos para estudos na biologia molecular e genética. Em 2003, Galagan e colaboradores reportaram o seqüenciamento de *Neurospora crassa*, o primeiro fungo filamentosos. A partir daí, novos projetos de seqüenciamento de

genomas foram estabelecidos, dando início a uma nova linha de pesquisa em biologia e genética molecular, denominada genômica funcional.

O estudo de seqüências de regiões expressas (*Expressed Sequence Tags* - ESTs) de genomas tem se mostrado uma importante metodologia para geração de informações úteis na elucidação de como determinados genes, ou grupo deles, são transcritos em determinadas condições fisiológicas e metabólicas. Inicialmente desenvolvida para o estudo do genoma humano (ADAMS et al., 1991), o impacto desta tecnologia tem gerado um grande incentivo a projetos de transcriptomas de outros organismos eucariotos, incluindo fungos. Esta tecnologia é baseada no sequenciamento parcial de extremidades 3' ou 5' de clones de bibliotecas de cDNA (DNA complementar) gerados a partir do RNA mensageiro (RNAm) (ADAMS et al., 1991). Assim, quanto maior a expressão de um determinado gene em uma célula num determinado momento, teoricamente maior será o número de transcritos e, conseqüentemente, maior será o número de cópias de cDNAs correspondentes (OHLROGGE; BENNING, 2000). Desta forma, ESTs representam o perfil de expressão de uma célula ou organismo, gerando uma grande quantidade de informação em curto espaço de tempo (FARIA-CAMPOS et al., 2003).

Com base nisso, a construção de bibliotecas de cDNAs de fungos fitopatogênicos tem possibilitado a geração de informações úteis para estudos de predição de genes, principalmente daqueles relacionados aos processos de patogenicidade (IDNURM; HOWLETT, 2001). Na construção de um banco de dados de ESTs de *Heterobasidion annosum*, um fungo fitopatogênico de coníferas (KARLSSON; OLSON; STENLID, 2003), foram identificados sete genes associados ao processo de infecção. Um estudo conduzido por Keon et al. (2005) revelou que de 5.180 ESTs de *Mycosphaerella graminicola*, um dos mais importantes patógenos de trigo, 35 unigenes apresentaram homologia a seqüências relacionadas a fatores de virulência ou patogenicidade de fungos. Em uma análise

comparativa de ESTs de oito bibliotecas de cDNAs de *Fusarium verticillioides*, foram identificados genes envolvidos tanto na produção de micotoxinas por este fitopatógeno de milho, como genes associados em processos de interação fungo-planta (BROWN et al., 2005). Além disso, a metodologia de ESTs em diferentes fungos fitopatogênicos de importância agrônômica como por exemplo *Magnaporthe grisea* (KIM et al., 2001); *Verticillium dahliae* (NEUMANN; DOBINSON, 2003); *Ustilago maydis* (NUGENT; CHOFFE; SAVILLE, 2004) e *Fusarium oxysporum* (IIDA; OHARA; TSUGE, 2006) têm sido utilizada para investigar genes preferencialmente expressos tanto nos processos normais de desenvolvimento como aqueles associados a algum tipo de defesa/ virulência.

Devido à sua importância como patógeno de culturas de expressão econômica significativa, *F. graminearum* tem sido alvo de estudos e muitos aspectos fisiológicos e de patogenicidade deste microrganismo têm sido elucidados com auxílio da genômica. Estudos genômicos de *F. graminearum* tiveram início no final dos anos 90, com a geração de bibliotecas de ESTs do fungo cultivado *in vitro* ou isolado de plantas infectadas com este fitopatógeno (GOSWAMI; KISTLER, 2004). Em 2002, Kruger e colaboradores, construíram um banco com 4.838 ESTs geradas a partir de uma biblioteca de cDNA de trigo infectado por *F. graminearum*. Porém uma porção muito pequena destas seqüências era derivada do fungo, obtendo-se assim pouca informação sobre este fitopatógeno.

Para melhor entendimento do desenvolvimento e patogenicidade de *F. graminearum*, Trail et al. (2003) realizaram um estudo que resultou na geração de três bibliotecas de cDNA: uma biblioteca a partir de peritécio do fungo em maturação (P) e as outras duas bibliotecas a partir da cultura micelial do fungo crescendo em meio com deficiência de carbono (C) ou nitrogênio (N). Segundo estes autores, dos 16 genes associados à virulência e patogenicidade, 15 foram obtidos a partir das bibliotecas C e N, confirmando que o crescimento deste fungo sob baixa disponibilidade de C ou N, pode favorecer a

expressão de genes importantes no processo de infecção. Ainda neste ano, com a divulgação do sequenciamento do genoma de um membro da linhagem 7 de *F. graminearum* (isolado PH-1), pelo Instituto “Broad” ([www.broad.mit.edu](http://www.broad.mit.edu)), em colaboração com cientistas das universidades do Estado de Michigan, de Minnesota e Purdue, do Instituto de Tecnologia de Massachusetts e do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, surgiram novas perspectivas em estudos envolvendo este fitopatógeno. A técnica de sequenciamento adotada (WGS - *whole genome shotgun sequencing*, ou sequenciamento do genoma completo por fragmentos aleatórios), consiste na clivagem mecânica aleatória do DNA genômico e consequente agrupamento das seqüências contíguas (BATZOGLOU et al., 2002). Esta estratégia foi eficiente para cobrir 90 % do genoma deste fungo, cujo tamanho foi estimado em 40 Mb, distribuído em 4 cromossomos. Desde então, o avanço no conhecimento e geração de informações tem evoluído rapidamente, tornando-se um fator importante para que seja considerado um organismo modelo em estudos de interação patogênica fungo-planta.

Tendo em vista a expressão de *F. graminearum* como um fitopatógeno importante na América do sul, principalmente na região sul do Brasil, estudos genômicos de isolados de incidência local são de extrema importância, uma vez que geram um grande número de informações que poderão ser utilizadas em várias linhas de pesquisas, principalmente aquelas associadas ao controle de doenças fúngicas de abrangência nacional.

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de sequências expressas (ESTs) a partir de uma biblioteca de cDNA do fitopatógeno *F. graminearum*, isolado de espigas de cultivares de trigo da Embrapa Trigo, RS, e cultivado sob condições de cultura *in vitro*, visando a obtenção de um banco de dados de genes expressos deste microrganismo, a ser disponibilizado para estudos futuros de expressão gênica, inclusive frente a organismos antagonistas.

## **3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1. Condições de cultivo de *F. graminearum***

O isolado do fungo *F. graminearum* utilizado neste trabalho foi obtido de espigas de cultivares de trigo, e gentilmente fornecido pelo pesquisador Dr. Wilmar C. da Luz, da Embrapa Trigo, Passo fundo, RS. A cultura deste isolado foi estabelecida em meio de cultura BDA (batata-dextrose-agar) (NELSON; TOUSSON; MARASAS, 1983) em câmara de crescimento a 28°C, fotoperíodo de 12 horas, durante 6 dias. Após este período as culturas foram mantidas a 4°C no Laboratório de Biologia Molecular e Genômica do Depto. de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (CEBTEC/ ESALQ/ USP). Experimentos foram conduzidos a partir da massa micelial do fungo crescido em meio de cultura BDA ¼ (contendo ¼ da quantidade de dextrose e extrato de batata). As culturas foram incubadas durante 6 dias a 28°C, sob condições de fotoperíodo de 12 horas luz/ 12 horas escuro. Foram preparadas diversas repetições de placas de cultivo, a fim de se obter quantidade suficiente de micélio para o isolamento do RNA total.

### **3.2.2. Construção da biblioteca de cDNA**

#### **3.2.2.1. Extração de RNA total**

O RNA total foi isolado de micélios de *F. graminearum* de acordo com protocolo descrito por Sokolovsky et al. (1990). Alíquotas de 300µg do micélio do fungo foram maceradas em nitrogênio líquido e ressuspensas em 750µL de tampão de extração (NaCl 0,6 M; EDTA 10 mM; TRIS-HCl 100 mM, pH 8,0; SDS 4 %) mais 750µL de Fenol saturado com TRIS- HCl, 0,1 M, pH 8,0. Após agitação vigorosa por 15 segundos, as amostras foram centrifugadas a 10.600 x g (Eppendorf. 5804 Rotor F45-30-11) a temperatura ambiente (T.A.) por 10 minutos. A fase superior foi transferida para um novo microtubo e, após a adição de

0,75 volume de LiCl 8 M , a suspensão foi incubada por uma noite a  $-20^{\circ}\text{C}$ . No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a  $10.600 \times g$ , a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso em  $300\mu\text{L}$  de água-DEPC (água tratada com *diethylpyrocarbonate* 0,1 %), 1/10 do volume de NaOAc 3M, pH 5,5 e 2,5 volumes de etanol absoluto ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Após permanecerem a  $-70^{\circ}\text{C}$ , por 1 hora, as amostras foram centrifugadas a  $10.600 \times g$ , a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o RNA total foi precipitado em 1 mL de etanol 80 % (80 % de etanol absoluto:20 % água-DEPC), novamente centrifugado a  $10.600 \times g$ , a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. O RNA sedimentado foi seco em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos e ressuspenso em  $50 \mu\text{L}$  de água-DEPC. A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotometria a 260 nm ( $1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g}$  de RNA  $\text{mL}^{-1}$ ) e a qualidade determinada pelas razões  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230\text{nm}}$ . A integridade do extrato de RNA total foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1 % , utilizando brometo de etídeo ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para visualização das bandas (SAMBROOK et al., 1989). A documentação fotográfica foi realizada no *Electrophoresis Documentation and Analysis System-120* (Kodak Digital Science) utilizando-se o programa *1D Image Analysis Software* (Kodak Digital Science). O RNA foi precipitado em 1/10 do volume de NaOAc 300 mM, pH 5,5; 1/50 volumes de glicogênio ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 2,5 volumes de etanol absoluto e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.2.2. Isolamento do RNA mensageiro

Amostras de RNAm foram isoladas a partir do RNA total utilizando o Kit *Oligotex dT* (QIAGEN), conforme as instruções do fabricante. Partiu-se de uma alíquota de 1 mg de RNA total em  $500 \mu\text{L}$  de água-DEPC. Foram adicionados  $500 \mu\text{L}$  de uma solução tampão *Buffer OBB* (TRIS-HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 1M; EDTA 2 mM e SDS 0,2 % ) e  $100\mu\text{L}$  de *Oligotex Suspension*. Os *oligos* (dT) contidos nesta resina pareiam-se à cauda poli(A)<sup>+</sup> das extremidades 3' das moléculas de RNAm. Após aquecimento a  $70^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, seguido

pela incubação a 37°C por mais 20 minutos, a suspensão composta por RNA total/ e *oligo (dT)* foi centrifugada a 20.000 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e identificado como “eluato” 1. O precipitado remanescente foi ressuspendido em 600µL de *Buffer OW2* (TRIS-HCl 10mM, pH 7,5; NaCl 150mM e EDTA 1mM). A suspensão foi transferida para uma coluna *RNase-free Spin Columns*, que foi colocada dentro de um microtubo. Após centrifugação a 12.000 x g por 2 minutos, retirou-se a coluna do microtubo e a solução remanescente foi denominada de “eluato 2”. A coluna foi transferida para um novo tubo e adicionou-se novamente 600 µL de *Buffer OW2*. Após nova centrifugação o eluato foi coletado e identificado como “eluato 3”. A coluna foi novamente transferida para um novo microtubo e, após a adição de 100µL de *Buffer OEB* (TRIS-HCl 5 mM, pH 7,5) pré-aquecido a 70°C, foi submetida a centrifugação a 20.000 x g por 1 minuto. Esta última etapa foi repetida mais uma vez, sem trocar o microtubo, obtendo-se 200 µL de solução identificada de mRNA. Por fim, o mRNA eluído da coluna foi precipitado em 1/10 do volume de NaOAc 300 mM, pH 5,5; 1/50 volumes de glicogênio (50µg/ mL) e 2,5 volumes de etanol absoluto (-20°C). Após permanecer a -80°C por 2 horas, a solução foi centrifugada a 20.000 x g a 4°C por 45 minutos, o precipitado foi lavado com 2 mL de etanol 75 % (75 % de etanol absoluto: 25 % água-DEPC) e seco por 20 minutos a 37°C. O RNAm final foi ressuspendido em 7 µL de água-DEPC e uma alíquota de 1 µL foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1 %.

### **3.2.2.3. Síntese do cDNA fita dupla**

A síntese do cDNA e clonagem direcionada no vetor pSPORT I foi realizada utilizando-se o Kit *SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Cloning* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. À suspensão de RNAm (6 µL) obtida na etapa anterior foram adicionados 2 µL de *NotI primer adapter*, o qual consiste de um

iniciador *oligo(dT)* associado a um adaptador com um sítio de restrição para a enzima *NotI*. A reação foi aquecida a 70°C por 10 minutos e transferida para o gelo a fim de permitir a ligação do adaptador às extremidades poli(A). Em seguida, adicionou-se 4 µL do tampão *First Strand Buffer* (TRIS-HCl 250 mM, pH 8,3; KCl 375 mM e MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 2 µL de DTT 0,1 M, 1µL de dNTP 10 mM e 1µL de nucleotídeo radioativo <sup>32</sup>P dCTP (1 µCi/ µL). Após estabilizado a 37°C por 2 minutos, o RNAm foi reversamente transcrito através da adição de 4 µL da enzima *SuperScriptRT II* (200 U/ µL). A mistura de reação foi incubada a 37°C por 2 h.

Para a síntese da segunda fita de cDNA, foram adicionados à reação 93 µL de água-DEPC, 30 µL do *Second Strand Buffer* [TRIS-HCl 100mM, pH 6,9; KCl 450 mM; MgCl<sub>2</sub> 23 mM; β-NAD<sup>+</sup> 0,75 mM; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM] e 3 µL de dNTP 10 mM. A seguir, adicionou-se 1 µL de *E. coli DNA ligase* (10U/ µL), 4 µL de *E.coli DNA polimerase I* (10U/ µL ) e 1 µL de *RNase H* (2U/ µL). Após a incubação a 16°C por 2 horas, foram adicionados 2 µL de *T4 DNA polimerase* (5U/ µL) e a mistura de reação foi novamente incubada a 16°C por mais 5 minutos. À suspensão de cDNA foram adicionados 10 µL de EDTA 0,5 M, seguindo-se de extração com 150 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após centrifugação a 20.000 x g, 4°C, por 5 minutos, a fase superior foi transferida para um novo microtubo, e o cDNA foi precipitado com 70 µL de NH<sub>4</sub>OAc 7,5 M e 500 µL de etanol absoluto (-20°C). Realizada a centrifugação a 14.000 x g 4°C, por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70 % (-20°C) preparado com água-DEPC, centrifugado (14.000 x g a 4°C, por 10 minutos) seco a 37°C por 10 minutos e então ressuspendido em 25 µL de água-DEPC.

Após ter sido sintetizada a segunda fita, foi adicionado um novo sítio de restrição (adaptador *SalI*) às duas extremidades dos insertos. Para isso foram adicionados 10 µL de

tampão T4 DNA ligase [TRIS-HCl 250 mM, pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; ATP 5 mM; DTT 5 mM e PEG 8000 25 % (p/v)], 10 µL do adaptador *SalI* (1µg/ µL) e 5 µL da enzima T4 DNA ligase (1U/ µL) em volume final de 50 µL. A reação permaneceu por 16 h a 37°C. Os adaptadores não ligados e as enzimas foram removidos com a adição de 50 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), seguida de centrifugação a 20.000 x g, à T.A., por 5 minutos. A fase superior foi transferida para um novo microtubo e o cDNA foi precipitado com mesmo volume de etanol absoluto, centrifugado mais uma vez, e então foi lavado com 200 µL de etanol 70 % (-20°C), contendo água-DEPC. Após nova centrifugação, o cDNA foi seco a 37°C por 10 minutos e ressuspensionado em 41 µL de água-DEPC. Os adaptadores *SalI*, adicionados às extremidades 3' dos insertos, foram digeridos para se obter sítios de restrição distintos em cada extremidade: *SalI* na extremidade 5' e *NotI* na extremidade 3'. Para isso, adicionou-se 5 µL de tampão *React 3* e 4 µL da enzima de restrição *NotI* (15 U/ mL). Após 2 horas de incubação a 37°C, a mistura de reação foi novamente precipitada com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugada a 20.000 x g, T.A., por 5 minutos. A fase superior (45 µL) foi transferida para um novo microtubo e ressuspensionada em 25 µL de NH<sub>4</sub>OAc 7,5 M e 150 µL de etanol absoluto (-20°C). Após centrifugação (20.000 x g à T.A. por 20 minutos), o precipitado foi lavado com etanol 70 %, centrifugado por 10 minutos e seco a 37°C por 10 minutos.

#### **3.2.2.4. Fracionamento do cDNA e clonagem no vetor pSPORT1**

O cDNA foi ressuspensionado em 100 µL de tampão TEN (TRIS-HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 0,1 mM; NaCl 25 mM) para dar início à etapa de fracionamento, que permite a redução de insertos pequenos e facilita a construção da biblioteca com frações enriquecidas de cDNAs maiores que 500 pb. A seleção das frações do cDNA foi conduzida por cromatografia através de coluna *Sephacryl S-500 HR* fornecida pelo Kit *SuperScript Plasmid System for*

*cDNA Synthesis and Cloning* (Invitrogen). Vinte frações de 35 µL foram individualmente coletadas e alíquotas de 5 µL foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1 %. O cDNA contido no gel de agarose foi transferido para uma membrana de náilon *Zeta-Probe membrane* (Bio-Agency) e as frações reveladas em *Storm Scanner* (Amersham Biosciences). Fragmentos de cDNA acima de 500 pb foram clonados nos sítios *NotI* e *SalI* do plasmídeo pSPORT1 *SuperScript Plasmid System* (Invitrogen). Para a reação de ligação, foram utilizados 3 µL de cDNA das frações selecionadas para 0,5 µL de vetor pSPORT1, 2 µL de tampão de *T4 DNA ligase*, 1 µL da enzima *T4 DNA ligase* (50U/ µL) e o volume final ajustado para 10 µL com água milli.Q esterilizada. A mistura de reação foi mantida à T.A. por 3 horas.

#### **3.2.2.5. Transformação em células competentes**

À mistura de reação de ligação foram adicionados 2,5 µL de tRNA de levedura, 6 µL de NH<sub>4</sub>OAc 7,5 M e 35 µL de etanol absoluto (-20°C). Após centrifugação a 20.000 x g à T.A., por 20 minutos, o sedimento foi lavado com 500 µl de etanol 70 % (-20°C), centrifugado novamente, seco a 37°C por 10 minutos e ressuscitado em 5 µL com água Milli.Q esterilizada. Alíquotas de 2 µL da mistura de reação de ligação foram utilizadas para transformação em 20 µL de células competentes *Escherichia coli* EletroMAX DH10B (Invitrogen), por eletroporação no equipamento BioRad Gene Pulser (25 µF; 200 Ω; 1.8 kV). Imediatamente foi adicionado 1 mL de meio de cultura S.O.C (triptona 2 %; extrato de levedura 0,5 %; NaCl 5 M; MgCl<sub>2</sub> 1 M; KCl 1 M e MgSO<sub>4</sub> 1 M) à suspensão de células eletroporadas, que foram então incubadas a 240 rpm, 37°C, durante 2 h. Após esse período, as células foram plaqueadas em meio LB sólido, suplementado com ampicilina 1,2 % (100 mg/L). Aproximadamente 30 minutos antes da inoculação, foram adicionados ao meio de cultura, 100 µL de X-Gal (20 mg/ mL) e 40 µL de IPTG (100 mM). As culturas foram incubadas a

37°C durante 16 h e posteriormente transferidas a 4°C para identificação das colônias recombinantes, com coloração branca.

### 3.2.2.6. Extração do DNA plasmidial - Miniprep

As colônias recobinantes foram inoculadas individualmente em microplacas de cultivo (96 poços) contendo 1 mL de meio de cultura *CircleGrow* (Bio 101, Inc., Cat. N. 3000-142) suplementado com ampicilina 1,2 % (100 mg/ L). Em seguida, as microplacas foram fechadas com adesivos plásticos transparentes, perfurados com agulha, para oxigenação e melhor crescimentos dos clones, e incubadas a 320 rpm, 37°C, durante uma noite. Alíquotas de 100 µL de cada cultura foram transferidas para uma nova microplaca e após adicionado 100 µL de glicerol 50 % as microplacas foram armazenadas a -80°C.

Para a extração do DNA plasmidial foi utilizado o método de lise alcalina para microplacas (<http://sucest.lad.ic.unicamp.br/public>), com algumas modificações. Após as células terem sido sedimentadas a 3.200 x g (centrífuga Eppendorf A-4-62) por 6 minutos à T.A., o sobrenadante foi descartado por inversão e as células foram ressuspendidas em 240 µL de solução GET (glicose 20 %; EDTA 0,5 M, pH 8,0 e TRIS-HCl 1 M pH 7,4). Após uma nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado por inversão e as células foram ressuspendidas em 80 µL de G.E.T. A suspensão foi transferida para uma microplaca de fundo redondo (tipo Elisa) contendo 2,5 µL de RNase (10 mg/ mL). Foram então adicionados 80 µL de uma solução consistindo de NaOH 0,2 N e SDS 1 % e após 10 minutos à T.A. foram adicionados 80 µL de KOAc 3 M, permanecendo por mais 10 minutos à T.A. A suspensão foi incubada a 90°C durante 30 minutos, imediatamente transferida para o gelo por 10 minutos e centrifugada a 3.200 x g, à T.A., por 4 minutos. Aproximadamente 160 µL das suspensões foram filtradas através de microplaca *Millipore* (MAGV N22). Ao filtrado foram adicionados 110 µL de isopropanol que foi então centrifugado a 3.200 x g, à T.A., por 45 minutos. O

sobrenadante foi descartado por inversão e o sedimento foi lavado com 200  $\mu$ L de etanol 70 % (-20°C) e novamente centrifugado a 3.200 x g à T.A., por 45 minutos. O sedimento resultante foi seco à T.A., durante 16 h e, finalmente, ressuspenso em 60  $\mu$ L de água Milli-Q esterilizada.

### 3.2.2.7. Validação da biblioteca de cDNA

Para validação da biblioteca de cDNA de *F. graminearum*, fez-se uma análise de presença e tamanho dos insertos clonados no vetor pSPORT1. Uma média de 20 clones por microplaca foram selecionados, aleatoriamente, e submetidos a digestão com a endonuclease *Pvu* II (Invitrogen). Foram utilizados 1  $\mu$ L do DNA plasmidial, 1  $\mu$ L da enzima *Pvu* II (10 U/ $\mu$ L), 1,5  $\mu$ L de tampão *React* 3 (Invitrogen) e o volume final ajustado para 15  $\mu$ L com água Milli.Q esterilizada. Após permanecer por 3 horas a 37°C, uma alíquota da mistura de reação foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1 % a 100 V durante 2 h. A biblioteca de cDNA foi estabelecida como válida, contendo maioria dos clones (média de 70 %) com insertos acima de 500 pb e o DNA plasmidial foi quantificado em gel de agarose 1 %, usando como padrões de peso molecular pGEM (Promega) 50, 100 e 200 ng/ mL.

### 3.2.2.8. Reação de Sequenciamento

As ESTs foram obtidas a partir do sequenciamento da extremidade 5' dos insertos, utilizando o *primer* T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'). A reação de sequenciamento foi realizada segundo as especificações do *DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham Biosciences). Aos 200 ng de DNA plasmidial foram adicionados 2  $\mu$ L de tampão “*Save money*” (TRIS 200 mM, pH 9,0; MgCl<sub>2</sub> 5 mM), 2  $\mu$ L de *DYEnamic ET Terminator* (Amersham Biosciences) e 2  $\mu$ L de *primer* T7 [(3,2 pmoles/  $\mu$ L)]. O volume foi ajustado para 10  $\mu$ L com água Milli.Q esterilizada. A mistura de reação foi submetida a 30 ciclos de 20

segundos a 95°C, 25 segundos a 50°C e 1 minuto a 60°C, no termociclador *GeneAmp PCR Systems 9700* (Applied Biosystem). A purificação das amostras foi realizada adicionando 1µL de NaOAc 1,5 M, pH 8,5, EDTA 250 mM e 100 µL de etanol absoluto (-20°C). Após centrifugação a 3.200 x g, a 4°C, durante 45 minutos, o etanol foi descartado e o DNA foi lavado com 150 µL de etanol 70 % (-20°C). Foi realizada mais uma centrifugação a 3.200 x g, a 4°C, por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado, o DNA foi seco à T.A. durante 1 hora e ressuspendido em 10 µL com *Hi Di Formamide* (Applied Biosystem). Os clones foram submetidos ao seqüenciamento automático ABI 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystem).

### 3.2.3. Análise das ESTs

Os arquivos de cromatogramas, oriundos das leituras dos fragmentos produzidos pelo seqüenciador automático de DNA, foram transferidos para o banco local para armazenamento, processamento e análises e busca de similaridade utilizando o sistema Egene (DURHAM et al., 2005), desenvolvido no Departamento de Ciência da Computação, da Universidade de São Paulo (IME/ USP).

O pré-processamento das seqüências incluiu a eliminação de trechos de baixa qualidade (valor *phred* abaixo de 20). Nas seqüências de boa qualidade, foram retiradas as regiões correspondentes a vetores, *primers*. Foram eliminadas, também possíveis seqüências contaminantes (seqüências mitocondriais, RNA ribossômicos e humano) e seqüências de tamanho reduzido, ou seja, onde os trechos de boa qualidade correspondentes aos insertos tinham menos do que 70 pb. Desta forma, os nucleotídeos das seqüências de entrada similares a estas regiões contaminantes foram removidos ou mascarados e não fizeram parte das análises computacionais. Através do programa *Contig Assembly Program 3 - CAP3* (HUANG; MADAN, 1999) foi realizado o agrupamento e montagem das seqüências, onde fragmentos com tamanho maior ou igual a 100 pb, com qualidade *Phred*  $\geq 20$ , foram

utilizados na formação dos *contigs* (grupos de seqüências alinhadas) e *singletons* (seqüências distintas não agrupadas). Foram exigidos, no mínimo, 30 pb de similaridade entre as seqüências com identidade de 90 % para que houvesse a sobreposição das ESTs. A biblioteca foi designada FGEQBDAXXX-YY, onde: FG = *Fusarium graminearum*; EQ= ESALQ/USP; BDA = meio de cultura “batata-dextrose-ágar”; XXX = nº da microplaca (96 poços) e YY = localização do clone na microplaca.

### 3.2.3.1. Análise de similaridade e anotação funcional das seqüências únicas

Primeiramente, as seqüências consenso dos *contigs* e os *singletons* de *F.graminearum* gerados foram comparadas com seqüências depositadas no banco de dados não redundante (nr) do *GenBank* utilizando o algoritmo BlastX (ALTSCHUL et al., 1990). Uma segunda análise foi realizada comparando-se os unigenes (*contigs* + *singletons*) com seqüências de nucleotídeos e de proteínas (BlastN e BlastX, respectivamente) específicas de *F. graminearum*, presentes no *Fusarium graminearum Genome Database* –FGDB (GÜLDENER et al., 2006) e disponível no *Munich Information Center for Protein Sequences*- MIPS (MEWES et al., 2000).

As seqüências identificadas pelo BlastN (e-value  $\leq 10^{-5}$ ) foram classificadas de acordo com quatro categorias protéicas definidas pelo banco do FGDB-MIIPS: classe 1, seqüências com similaridade a proteínas com função conhecida (*Known protein*); classe 2, similaridade a proteínas com função presumível determinada (*putative/ related protein*); classe 3, similaridade a proteínas cuja função é desconhecida (*Unknown/ hypothetical protein*) e classe 4, similaridade a ESTs (*Similarity to ESTs*). Esta classificação foi realizada pelo sistema *Protein extraction, description and analysis tool* – PEDANT (<http://pedant.gsf.de>) com base em proteínas previamente anotadas para o genoma de *Neurospora crassa* e *S. cerevisiae* (FRISHMAN et al., 2003, RILEY, 2005).

Os resultados da análise pelo BlastX no banco FGDB-MIPS foram agrupados de acordo com o e-value obtendo-se, desta forma, 4 grupos: seqüências com “alta significância”(e-value  $\leq 10^{-20}$ ), “média significância” (e-value de  $10^{-5}$  a  $10^{-19}$ ), “baixa/nenhuma significância” (e-value  $> 10^{-5}$ ) e “sem similaridade” (*no hit*). Somente as identificações de seqüências com alta e média significância, juntamente com os *no hit* foram anotados, manualmente, de acordo com as categorias do *Functional Catalogue* – FunCat (RUEPP et al., 2004), um sistema de anotação funcional disponível em: <http://mips.gsf.de/genre/proj/fusarium>. Para a análise de redundância desta biblioteca de cDNAs de *F. graminearum*, os *contigs* (conjunto de seqüências com sobreposições) constituídos a partir de 9 ESTs foram considerados “altamente expressos”, sendo que os *contigs* constituídos de 5 a 8 ESTs foram considerados de “média expressão”.

### **3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.3.1. Construção e análise da biblioteca de cDNA**

As amostras de RNA total de *F. graminearum* crescido em meio BDA ¼ foi isolado conforme descrito por Sokolovsky et al. (1990) e o RNA mensageiro foi purificado com o Kit Oligotex dT (Qiagen). A síntese de cDNA do fungo crescido sob condições *in vitro* foi realizada utilizando o Kit *SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Cloning* (Invitrogen). A metodologia utilizada mostrou-se eficiente tanto para a obtenção de RNA total (Figura 3.1a) e RNAm mensageiro (Figura 3.1b) de *F. graminearum* de boa qualidade, como para a obtenção de um alto número de clones recombinantes.

A seleção das frações utilizadas para clonagem no vetor pSPORT1 (Invitrogen) foi feita com base no tamanho dos fragmentos de cDNA separados em gel de agarose 1 %. A visualização do tamanho dos fragmentos foi possível devido ao uso dos nucleotídeos

radioativos ( $\alpha$ - $^{32}$ P dCTP) incorporados ao cDNA durante sua síntese. Com base nisso, somente fragmentos acima de 500 pb foram selecionados para clonagem (Figura 3.1c).

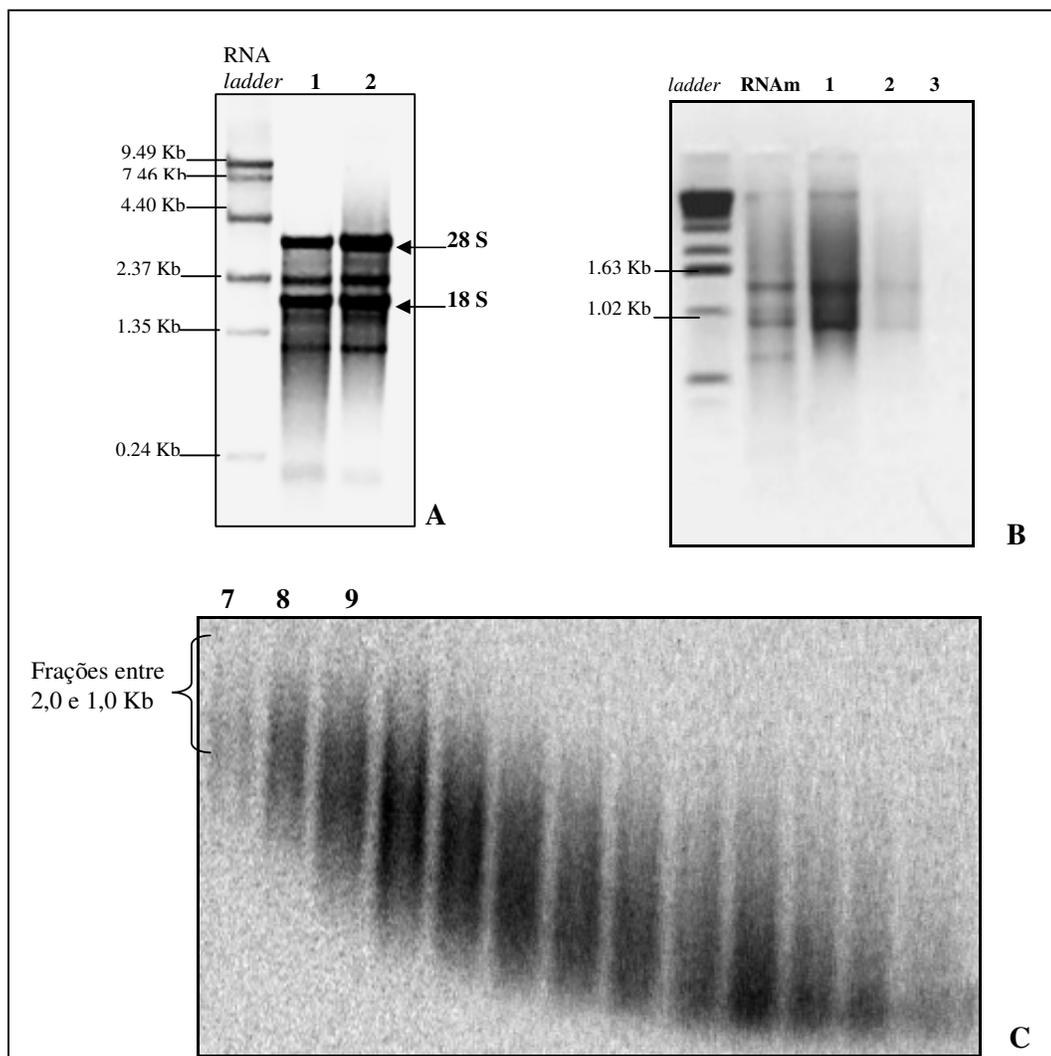


Figura 3.1 - Ilustração das etapas envolvidas na obtenção de fragmentos de cDNA de *F. graminearum*. A) RNA total; B) RNAm purificado a partir do RNA total; C) Frações de cDNA purificadas em colunas de Sepharose. As frações 7, 8 e 9 (entre 1Kb e 2Kb) foram selecionadas para clonagem no plasmídeo pSPORT1.

A primeira etapa para determinar a qualidade da biblioteca de *F. graminearum* foi verificar a quantidade de clones com insertos. Para esta biblioteca construída no presente

trabalho e denominada FGEQBDA, foram gerados 2.304 clones de ESTs de *F. graminearum* cultivado *in vitro*. Destes, uma média de 91 % dos clones apresentaram insertos (Figura 3.2).

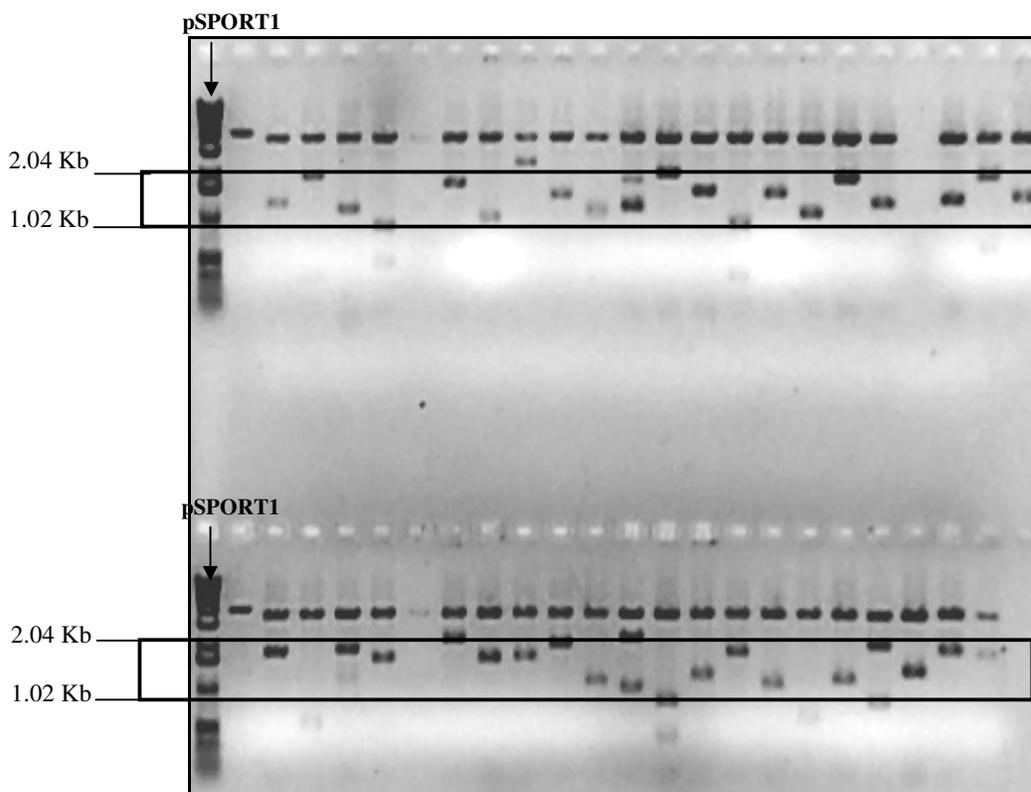


Figura 3.2 – Eletroforese em gel de agarose 1 % de clones, escolhidos aleatoriamente, digeridos com a endonuclease *PvuII* e para constatação da presença e tamanho dos insertos clonados no plasmídeo pSPORT1.

Estes resultados demonstraram a eficiência do processo de fracionamento do cDNA e do processo de clonagem. Portanto, os resultados foram considerados satisfatórios para dar prosseguimento às etapas de sequenciamento e geração de um banco de ESTs deste fungo fitopatogênico de importância agrícola.

### 3.3.2. Análise das ESTs

Dos 2.304 clones de ESTs de *F. graminearum* gerados, 2.288 (99 %) clones foram selecionados para o sequenciamento a partir da extremidade 5' dos insertos. As seqüências obtidas passaram por um pré-processamento que incluiu o corte e a remoção das seqüências com baixa qualidade. Nas seqüências de boa qualidade, foram retiradas as regiões correspondentes a vetores, *primers* e seqüências que apresentaram tamanho inferior a 70 pb com qualidade (*phred* < 20). Também foram eliminadas seqüências contaminantes, onde os insertos correspondiam a seqüências mitocondriais, ribossomais e humano.

Ao final deste processo foram obtidas 1.983 seqüências válidas, resultando em um índice de sucesso de 87 %. Este alto índice de sucesso reflete a boa qualidade do sequenciamento, sendo que apenas 8,57 % das seqüências foram removidas por baixa qualidade, ausência de seqüências contaminantes, como seqüências de bactérias, humanas e mitocondriais, como também pelo baixo número de seqüências ribossomais (4 %). Apenas 0,8 % das seqüências foram eliminadas por apresentarem tamanho considerado insatisfatório. Também foi avaliada a qualidade da biblioteca, estimando-se a porcentagem das seqüências que eram quase que unicamente vetores ou seqüências contaminantes. Estas totalizaram 130 seqüências, ou apenas 0,57 % do total, reforçando o resultado de boa qualidade da biblioteca de cDNA (ADAMS et al., 1995).

### 3.3.3. Distribuição das ESTs em *contigs* e *singletons*

Na montagem das 1.983 seqüências válidas, de acordo com o programa Cap3 (HUANG; MADAN, 1999), 1.008 transcritos (78,6 %) foram encontrados uma única vez, constituindo, assim, os *singletons*. As 975 ESTs restantes formaram 274 *contigs* (21,4 %) constituídos pela sobreposição de 2 a 33 ESTs (Figura 3.3). Foram exigidos, no mínimo, 30

pb de similaridade entre as seqüências com identidade de 90 % para que houvesse a sobreposição das ESTs.

O número médio de pares de bases nos *contigs* e nos *singletons* com qualidade *phred*  $\geq 20$  foi de 664 pb e 435 pb, respectivamente. O tamanho dos consensos nos *contigs* variou de 250 a 1.942 pb, sendo que a grande maioria (98 %) dos *contigs* foi constituída por consensos com tamanho acima de 300 pb (19 % com tamanho  $\geq 300 \leq 500$  pb e 79 % acima de 500 pb). Apenas 2 % dos *contigs* apresentaram tamanho inferior a 300 pb (mínimo de 250 e máximo de 300 pb). Esta montagem resultou na formação de 1.282 unigenes e permitiu determinar a redundância para esta biblioteca, que foi estimada em 27 %.

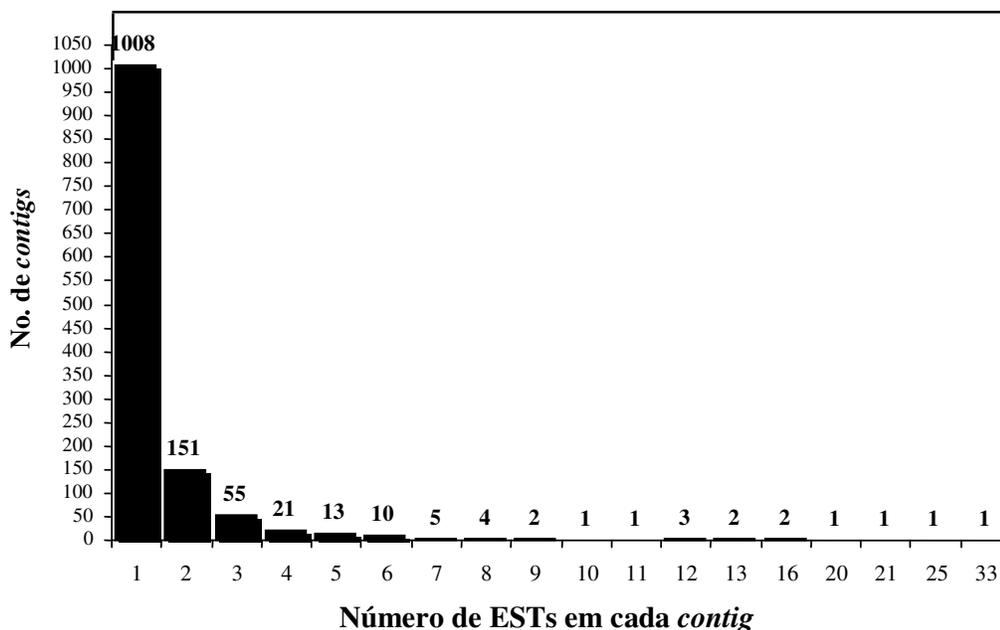


Figura 3.3 - Redundância dos unigenes (*singletons* e *contigs*) na biblioteca de cDNA de *F. graminearum* (FGEQBDA). Os unigenes, em sua maioria foram *singletons* (1.008) e os *contigs* restantes (274) foram constituídos pela sobreposição de 2 a 33 ESTs.

O índice de novidade desta biblioteca foi estabelecido dividindo-se o número de *singletons* e *contigs* pelo número total de ESTs (1.983). Para esta biblioteca, o índice de

novidade foi calculado em 65 %, ou seja, a cada dez informações seis eram novas para este banco, significando que os clones poderiam continuar a serem seqüenciados a fim de gerar novas informações. Os clones obtidos até então foram considerados suficientes para dar prosseguimento às análises inicialmente propostas para este estudo.

### **3.3.4.. Análise de similaridade (BlastX ) contra o banco (nr) do *GenBank***

Numa primeira análise, os 1.282 unigenes foram comparados contra o banco de proteínas (nr) do *GenBank* utilizando-se o algoritmo BlastX. Nesta comparação, 88 % das seqüências (1.133 unigenes) tiveram similaridade (e-value  $\leq 10^{-5}$ ) com proteínas deste banco de dados, sendo que 12 % tiveram baixa ou nenhuma similaridade (e-value  $>10^{-5}$ ) com proteínas do *GenBank*. A identidade de aminoácidos no alinhamento das seqüências com este banco de dados variou de 50 a 100 %, porém a maioria 87 % (985) das seqüências apresentou identidade maior que 80 %.

Também foi verificado, o valor de “S” (*score*) obtido no BlastX entre as seqüências com similaridade neste banco. Nesta análise, somente os dados do BlastX com *score*  $\geq 50$  e e-value  $\leq 10^{-5}$  foram considerados significantes. Segundo este critério, 78 % das seqüências apresentaram similaridade satisfatória com o *GenBank* (52 % com *score*  $\geq 50 \leq 299$  e 26 % com *score*  $\geq 300$ ) ou seja, 10 % a menos que obtido na análise onde foi considerado o ponto de corte o e-value. Entretanto, a freqüência de seqüências com *score*  $<50$  (e-value  $>10^{-5}$ ) manteve-se em 12 %. Um exemplo utilizando este tipo de análise (e-value e *score*) é o estudo com bibliotecas de ESTs de *V. dahliae*, geradas a partir de duas condições de crescimento *in vitro* deste fungo (NEUMANN; DOBINSON, 2003). Segundo estes autores, aproximadamente 55 % das ESTs geradas tiveram alta similaridade com seqüências de proteínas no banco “nr” do NCBI, quando utilizando os mesmos padrões (*score*  $>50$ , e-value  $\leq 10^{-5}$ ). Os restantes 45 % tiveram baixa ou nenhuma similaridade. *V.dahliae* tem sido

referido como um importante patógeno de um grande número de plantas, incluindo espécies de importância econômica (FRADIN; THOMMA, 2006). Estas análises revelam a importância de se avaliar os dois parâmetros no momento de inferir sobre a significância entre duas seqüências.

Embora a maior proporção dos unigenes, 88 % ou 78 % , dependendo do padrão utilizado como referência, tenha mostrado similaridade com proteínas do banco “nr” do *GenBank*, quando era identificada a proteína associada à seqüência, 91 % destas apresentavam homologia a proteínas hipotéticas. Este alto índice de proteínas hipotéticas, embora bastante comum em trabalhos de sequenciamento de ESTs, foi muito superior ao obtido em estudos tanto com outras espécies de fungos, *U. maydis*, *F. oxysporum*, *V. dahliae* (NUGENT; CHOFFE; SAVILLE, 2004; IIDA; OHARA; TSUGE, 2006; NEUMANN; DOBINSON, 2003), como para a mesma espécie de *F. graminearum*: isolado PH-1 (TRAIL et al., 2003). Segundo estes autores, o índice de unigenes representativos por proteínas hipotéticas têm sido inferior a 50 %.

### **3.3.5. Análise de similaridade (BlastN e BlastX) contra o banco FGDB – MIPS**

Os unigenes foram comparados com as seqüências de nucleotídeos (BlastN) e de proteínas (BlastX) do FGDB-MIPS (GÜLDENER et al., 2006; MEWES et al., 2000). Neste banco estão depositadas inúmeras informações geradas no projeto de sequenciamento do isolado PH-1, um membro da linhagem 7 de *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*), predominante na América do Norte e Europa (O’DONNEL et al., 2000). O sequenciamento foi realizado pelo *Broad Institute* (<http://www.broad.mit.edu/>), envolvendo cientistas das universidades do Estado de Michigan, de Minnesota e Purdue, do Instituto de Tecnologia de Massachusetts em parceria com o Departamento de Agricultura dos EUA.

Em uma primeira análise contra este banco de dados, os unigenes foram comparados com as seqüências de nucleotídeos (BlastN), a fim de verificar o tamanho e grau de identidade de nucleotídeos entre as seqüências. Esta análise revelou que dos 1.282 unigenes avaliados, 1.157 (90 %) apresentaram identidade entre 90 % e 100 % (e-value  $\leq 10^{-5}$ ). Destes unigenes, 71 % apresentaram identidade de mais de 300 pares de bases (pb), 28 % entre 100pb e 300 pb e 1 % inferior a 100 pb. Esta distribuição foi verificada tanto entre os *singletons* como entre os *contigs*. O alinhamento contra seqüências de nucleotídeos nos permite, ainda, identificar regiões codificadoras de proteínas homólogas em seqüências de nucleotídeos não anotadas, como é o caso de seqüências expressas – ESTs.

Os resultados do BlastX obtidos contra o banco de dados FGDB foram semelhantes aos revelados no *GenBank*, ou seja, 1.145 unigenes (89 %) apresentaram similaridade (e-value  $\leq 10^{-5}$ ) com proteínas neste banco e 11 % das seqüências apresentando baixa ou nenhuma similaridade (e-value  $> 10^{-5}$ ). Entretanto, chama-se atenção para o baixo número de seqüências com similaridade a proteínas hipotéticas, quando comparadas com o *GenBank*. A análise de BlastX contra as seqüências do FGDB revelou que apenas 24 % dos unigenes apresentaram similaridade com proteínas hipotéticas, ou seja, quase quatro vezes inferior ao obtido pela análise contra o banco “nr” do NCBI (91 %).

Embora o banco “nr” do *GenBank* seja considerado uma base de dados “referência” para estudos envolvendo de genômica e transcriptoma dependendo do tipo de estudo que está sendo realizado, faz-se necessária a busca de informações em outros bancos, principalmente em bancos que reúnem um grande número de dados, como neste estudo, o de *Fusarium graminearum* (FGDB-MIPS). Isto pode ser explicado pelo menor número de similaridade a proteínas hipotéticas quando comparado com o FGDB em relação ao *GenBank*, uma vez que o FGDB é constituído por um grande número informações sobre genes cuja anotação “computacional” permitiu atribuir uma função presumível.

Segundo Gildener et al. (2006), além dos 11.640 genes presumíveis, importados do Broad Institute, o FGDB conta com um conjunto de chamadas do MIPS para aproximadamente 14.000 genes identificados por meio de um programa com uma matriz treinada para seqncias de fungos de diferentes origens, a exemplo de *U. maydis* e *Schizosaccharomyces pombe*. Além disso, o sistema apresenta um serviço de atualizao constante dos dados. Diante disso, as análises posteriores dos unigenes gerados no presente trabalho foram realizadas com base no banco FGDB-MIPS

### **3.3.6. Análise comparativa: biblioteca FGEQBDA versus biblioteca FGDB (MIPS).**

Os 1.157 unigenes resultantes da análise por BlastN (e-value  $\leq 10^{-5}$ ) deste banco de dados foram comparados com os dados do FGDB disponível no MIPS. Esta análise foi realizada com a finalidade de verificar a distribuio dos unigenes obtidos nas duas bibliotecas de *F. graminearum*: isolado brasileiro (FGEQBDA) versus isolado PH-1 (FGDB\_MIPS). Nesta comparao, as seqncias foram classificadas em 4 categorias (GILDENER et al., 2006) definidas com base no grau de similaridade entre as proteínas disponíveis nestes dois bancos de dados. Na classe 1 (*Known protein*) estão as seqncias com similaridade a proteínas com funo conhecida; na classe 2 (*putative/ related protein*), estão as seqncias com similaridade a proteínas com funo "presumível" determinada; a classe 3 (*unknown/ hypothetical protein*) são as seqncias que apresentaram similaridade a proteínas cuja funo é desconhecida, e a classe 4 (*Similarity to ESTs*), representam aquelas seqncias que apresentaram similaridade  ESTs (Figura 3.4).

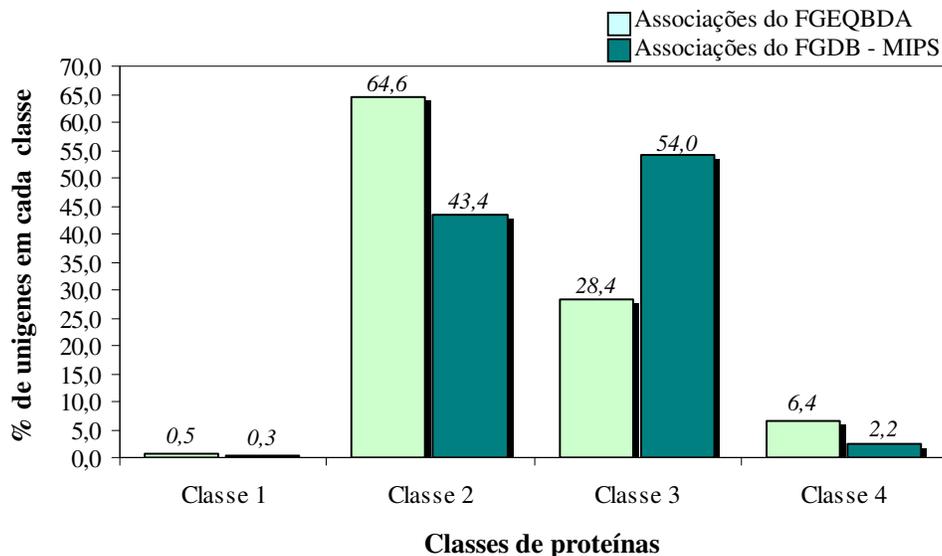


Figura 3.4 – Comparação da distribuição das associações obtidas no banco FGEQBDA (do presente estudo) com a distribuição revelada no banco FGDB-MIPS. As 4 categorias representam a classificação das associações com base no grau de similaridade às proteínas descritas nos banco de dados.

Na biblioteca de cDNA de *F. graminearum* construída neste estudo (FGEQBDA), a classe de menor representação (0,5 %) foi aquela constituída por proteínas com função conhecida (classe 1). Este dado também foi confirmado quando comparado com as seqüências depositadas no banco FGDB-MIPS, sendo que das 14.092 seqüências depositadas, apenas 43 (0,3 %) tiveram similaridade a proteínas com função conhecida (GÜLDENER et al., 2006, <http://mips.gsf.de/genre/proj/fusarium/Search/Catalogs/catalog.jsp>). A classe constituída por seqüências com similaridade à ESTs (classe 4) apresentou resultados semelhantes nos dois bancos de dados, com 6,4 % e 2,2 % para FGEQBDA e para FGDB-MIPS, respectivamente. Segundo Cirera, Winter e Fredholm (2000), a falta de similaridade dos transcritos com genes previamente caracterizados pode significar que estas seqüências representam novos genes, ainda não caracterizados em outros organismos, seqüências que representam genes que divergiram ao longo do tempo, ou ESTs que representam regiões diferentes do gene transcrito.

A maior representação na biblioteca FGEQBDA foi constituída por seqüências com similaridade a proteínas com função “presumível” determinada (classe 2), com 64,6 % das seqüências contra 43,4 % do FGDB-MIPS, e por seqüências com similaridade a proteínas hipotéticas (classe 3), cuja freqüência foi de 28,4 % contra 54 % do FGDB-MIPS. A incidência de proteínas hipotéticas nos permite inferir sobre a necessidade de estudos funcionais, uma vez que são seqüências já identificadas para outras espécies, porém, sem uma função biológica determinada.

Com a finalidade de obter uma melhor caracterização da biblioteca construída neste trabalho (FGEQBDA), as comparações obtidas nos alinhamentos com as seqüências de proteínas (BlastX) do banco específico de *F. graminearum* (FGDB-MIPS) foram classificadas de acordo com o e-value obtido: e-value  $\leq 10^{-20}$ , e-value entre  $10^{-5}$  e  $10^{-19}$  e e-value  $> 10^{-5}$ , para alta, média e baixa/ nenhuma significância, respectivamente. Esta classificação permitiu uma definição mais confiável dos unigenes e, conseqüentemente, uma melhor caracterização desta biblioteca. Os dados do BlastX revelaram que dos 1.282 unigenes gerados, 89 % (1.145 unigenes) apresentaram similaridade com seqüências de proteínas do banco FGDB-MIPS (e-value  $\leq 10^{-5}$ ). Destes, 1.052 unigenes (82 %) apresentaram associações de alta significância e 93 unigenes (7 %) com significância moderada. Apenas 11 % (137 unigenes) apresentaram baixa, ou nenhuma similaridade com seqüências de proteínas nesta base de dados.

### **3.3.7. Classificação funcional dos unigenes**

Tendo em vista que a maioria dos unigenes teve comparações associações de alta significância (82 %), foi determinado que todos os unigenes (1.282) seriam submetidos à anotação funcional nas 20 categorias principais estabelecida no FunCat (RUEPP et al., 2004). Por se tratar de um esquema estruturalmente hierárquico, flexível e eficiente para anotação de dados gerados por estudos de genomas, transcriptomas e proteomas (RUEPP et al., 2006), este sistema de anotação tem sido amplamente utilizado para atribuir uma descrição funcional às

seqüências de ESTs de diferentes fungos como por exemplo *S. cerevisiae* (HAYES et al., 2002; ZHANG et al., 2002), *V. dahliae* (NEUMMAN; DOBINSON, 2003), *M. graminicola* (KEON et al., 2005), *F. graminearum* (TRAIL et al., 2003), *F. oxysporum* (IIDA; OHARA; TSUGE, 2006).

A descrição funcional foi realizada com base na anotação descrita para *F. graminearum* e disponível no FGDB-MIPS (<http://mips.gsf.de/proj/fusarium/Search/>; GÜLDENER et al., 2006). Cabe aqui salientar que a designação das categorias funcionais (anotação) para cada comparação foi estabelecida automaticamente com base em resultados de BlastX estabelecidos previamente para outros organismos e sem uma confirmação funcional experimental (TRAIL et al., 2003). Em função disso, a maioria dos resultados de comparações são referidos como função “presumível”. Esta denominação é utilizada, por exemplo, quando o sistema de categorização é feito de forma automática, ou seja, baseado no grau de similaridade entre duas seqüências, sem confirmação experimental. Assim, a denominação “proteína x” pode ser substituída por “proteína x provável”, “presumível”, “semelhante à proteína x”, refletindo seu grau de incerteza na transferência da função (RIGDEN; MELLO, 2002).

Em adição, da mesma forma que os genes podem estar envolvidos em mais de uma função e/ou processo biológico, estes podem ser incluídos em mais de uma categoria e/ou subcategoria (CAMON et al., 2003). Com base nisso, os unigenes classificados em mais de uma categoria e/ou subcategoria foram incluídos separadamente para cada uma delas. Numa primeira análise, os unigenes foram classificados em sete maiores categorias (Figura 3.5).

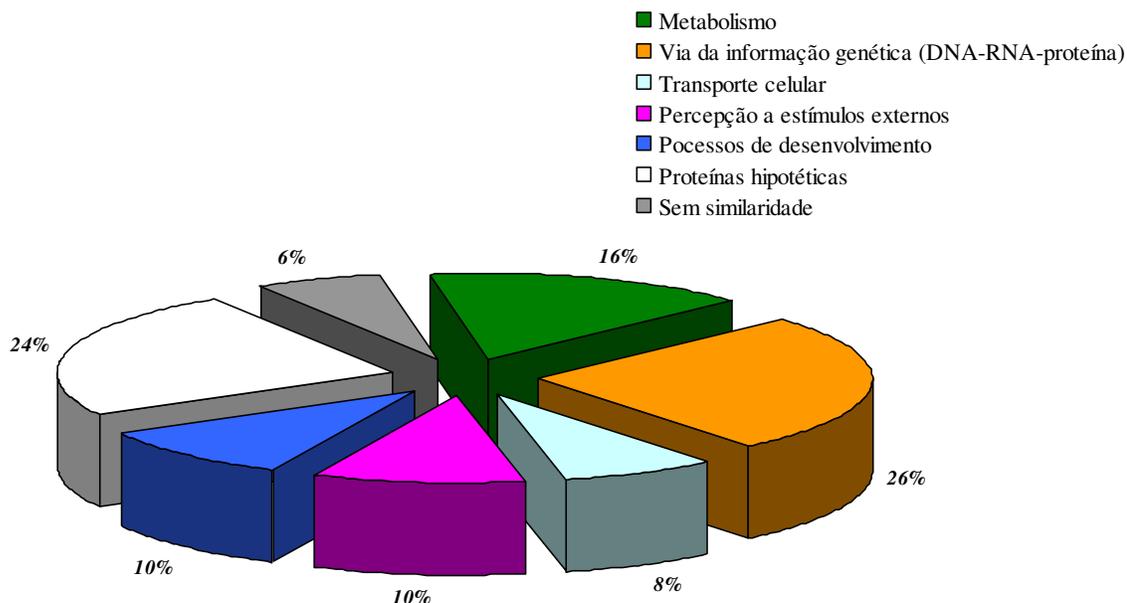


Figura 3.5 - Classificação funcional dos 1.145 unigenes da biblioteca de cDNA de *F. graminearum* (FGEQBDA) de acordo com 5 categorias gerais do catálogo funcional FunCat (RUEPP et al., 2004), baseada na anotação funcional do FGBD-MIPS.

Como mostrado na Figura 3.5, as categorias de maior representatividade foram aquelas constituídas por unigenes com similaridade a proteínas envolvidas em vias da informação genética (DNA-RNA-proteína) (26 %), seguida por proteínas com similaridade a proteínas hipotéticas (24 %), bem como proteínas envolvidas no metabolismo (16 %). Ambas as categorias representadas por proteínas envolvidas nos processos de desenvolvimento e percepção a estímulos representaram 10 % dos unigenes, seguidos pela categoria transporte celular, a qual representou 8 % dos unigenes desta biblioteca.

A categoria de menor representatividade foi a constituída por seqüências sem similaridade (6 %). Esta categoria foi muito inferior ao obtido para outras espécies de fungos, como por exemplo, *Phytophthora infestans*, *U. maydis*, *Mycosphaerella graminicola*, *Phakopsora pachyrhizi* e *F. graminearum* (KAMOUN et al., 1999; NUGENT; CHOFFE;

SAVILLE, 2004; KEON et al., 2005; POSADA-BUITRAGO; FREDERICK, 2005; TRAIL et al., 2003), cuja frequência de proteínas com baixa ou nenhuma similaridade tem sido descrita variando entre 30 % e 50 %. A baixa frequência de seqüências sem similaridade se deve à grande quantidade de informações disponíveis neste banco específico de *F. graminearum* (FGDB-MIPS), o qual atualmente dispõe de mais de 14.000 genes anotados. Estes dados ressaltam a importância de estudos com microrganismos de ampla distribuição geográfica como *F. graminearum*, não somente na geração, mas na disponibilização destas informações, para que possam ser utilizadas por outros grupos de pesquisa. Tal conhecimento servirá como base para um amplo entendimento de como fitopatógenos agem frente a condições adversas, otimizando assim, o processo de descoberta de genes úteis a serem potencialmente utilizados em programas de melhoramento genético vegetal.

Como apresentado na Figura 3.6, a distribuição dos unigenes em algumas das principais subcategorias do *FunCat*, revelou que 12 % destes estão associados ao metabolismo primário e secundário. No metabolismo primário estão incluídas as proteínas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos, lipídios, carboidratos, etc., e no metabolismo secundário estão as proteínas envolvidas na biossíntese de compostos como fatores de virulência e defesa celular, entre outras. No metabolismo “energético” (4 %), foram identificados transcritos envolvidos nos processos de respiração, fermentação, fotossíntese, etc. Juntas, as categorias que envolvem a síntese, direcionamento e regulação protéica representaram 18 % dos unigenes desta biblioteca. Valores semelhantes destas categorias foram obtidos em três estudos de ESTs, do fitopatógeno de trigo *M. graminicola* (KEON et al., 2005), fitopatógeno de soja *P. pachyrhizi* (POSADA-BUITRAGO; FREDERICK, 2005) e do fitopatógeno de coníferas *Heterobasidion annosum* (ABU; LI; ASIEGBU, 2004; KARLSSON; OLSON; STENLID, 2003).

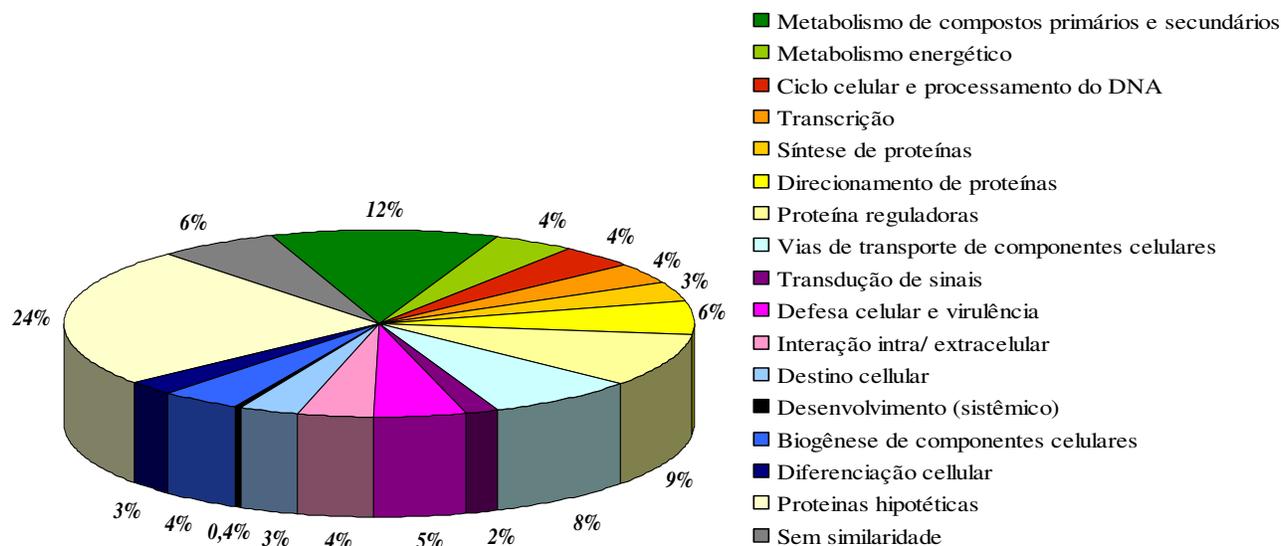


Figura 3.6 - Distribuição dos unigenes gerados na biblioteca FGEQBDA em 17 subcategorias descritas no FunCat (RUEPP et al., 2004), baseada na anotação funcional do FGDB-MIPS.

A categoria de defesa e virulência celular constituiu 5 % dos unigenes, sendo representada por transcritos que apresentaram similaridade à proteínas envolvidas na patogenicidade de fungos, como isocitrato liases, trealases, calmodulinas, policetídeos sintases, entre outras. Frequências semelhantes para esse tipo de categoria também foi verificada em bibliotecas de *N. crassa* sob diferentes condições de crescimento *in vitro* (NELSON et al 1997).

A frequência de transcritos com função desconhecida (proteínas hipotéticas, 24 %), juntamente com os transcritos que apresentaram baixa (e-value  $>10^{-5}$ ) ou nenhuma similaridade (6 %) com proteínas depositadas nos bancos de dados (*GenBank* e *FGDB-MIPS*) reflete o grande número de genes de *F. graminearum* expressos sob condição de crescimento *in vitro*, que ainda não foram caracterizados e/ou identificados (KEON et al., 2005). Estes

transcritos representam um grupo importante de genes que são expressos nestas condições específicas de crescimento e, portanto necessitam ser melhor elucidados.

### 3.3.8. Análise de redundância dos transcritos

O banco de dados obtido através do sequenciamento de ESTs de *F. graminearum* crescendo em meio de cultura BDA ¼ permitiu verificar a abundância de determinados transcritos sob esta condição. Conforme Coward; Haas e Vingron (2002), a alta redundância de determinados transcritos, entre as ESTs, significa que possuem similaridade o suficiente para se assumir que são derivados de um mesmo gene. Conseqüentemente, esta redundância poderia refletir um maior nível de expressão do gene correspondente (KARLSSON; OLSON; STENLID, 2003).

Entretanto, não tem sido relatado na literatura um critério para se determinar o número mínimo de ESTs num *contig* para que este seja referido como o transcrito de maior expressão, e a escolha tem sido estabelecida de acordo com o tipo de estudo. Assim, os genes descritos como mais abundantes em estudos de ESTs de fungos têm sido referidos aqueles representados por *contigs* constituídos partir de 2, 10, 20 ou mais ESTs (ABU; LI; ASIEGBU, 2004; IIDA; OHARA; TSUGE, 2006; KEON et al., 2005; NEUMMAN; DOBINSON, 2003; TRAIL et al., 2003; WANG; HU; LEGER, 2005).

Com base nisso, para esta análise os genes representados por *contigs* com 5 a 8 ESTs foram considerados de “média expressão” e para aqueles constituídos a partir de 9 ESTs foram considerados “altamente expressos”. Esta classificação permitiu estabelecer, de uma forma mais precisa, o perfil de expressão gênica de *F. graminearum* sob cultivo *in vitro*. Nesta condição, 47 transcritos foram identificados como mais expressos, sendo 32 % (15 transcritos) altamente expressos e 68 % (32 transcritos) de média expressão (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Transcritos (RNAm) mais abundantes revelados pela redundância de ESTs, e a correspondente anotação presumível.

| Nome do Contig                      | Nº de ESTs | Contig (pb) <sup>a</sup> | Melhor <i>match</i> contra banco de FGDB-MIPS          | E-value |
|-------------------------------------|------------|--------------------------|--|---------|
| <b>Unigenes altamente expressos</b> |            |                          |  |         |
| Contig 186                          | 33         | 1.203                    | Álcool desidrogenase I (ADH1)                          | 0.0     |
| Contig 117                          | 25         | 1.065                    | Proteína hipotética                                    | 1e-72   |
| Contig 237                          | 21         | 1.942                    | Proteína hipotética                                    | 2e-97   |
| Contig 08                           | 20         | 394                      | Proteína de choque térmico -DDR48                      | 1e -69  |
| Contig 01                           | 16         | 869                      | Gliceraldeído-3- fosfato-desidrogenase (GAPDH)         | 3e -151 |
| Contig 191 <sup>b</sup>             | 16         | 312                      | Proteína hipotética                                    | 1e -10  |
| Contig 124                          | 13         | 1.818                    | Precursor de woronina                                  | 1e -83  |
| Contig 13                           | 13         | 1.083                    | Proteína hipotética                                    | 0.0     |
| Contig 56                           | 12         | 1.245                    | Relacionado a 6-hidroxi-d-nicotina-oxidase             | 2e -221 |
| Contig 59                           | 12         | 1.216                    | Proteína CyPBP37                                       | 5e -170 |
| Contig 74 <sup>b</sup>              | 12         | 767                      | Proteína hipotética                                    | 4e -32  |
| Contig 181                          | 11         | 868                      | Proteína hipotética                                    | 1e -127 |
| Contig 172                          | 10         | 830                      | Proteína hipotética                                    | 1e -114 |
| Contig 263 <sup>c</sup>             | 9          | 316                      | Proteína hipotética                                    | 5e -57  |
| Contig 31                           | 9          | 804                      | Nitrilase alifática                                    | 1e -146 |
| <b>Unigenes de média expressão</b>  |            |                          |  |         |
| Contig 173                          | 8          | 1.272                    | Fosfoglicerato quinase (PGK)                           | 8e -212 |
| Contig 146                          | 8          | 574                      | Proteína hipotética                                    | 4e -37  |
| Contig 254                          | 8          | 1.266                    | Piruvato descarboxilase (PDC)                          | 4e -195 |
| Contig 243                          | 8          | 1.269                    | Relacionado a sintase de policetônicos (PKS)           | 9e -201 |
| Contig 226                          | 7          | 616                      | Proteína <i>nmt1</i> “no message thiamine”             | 4e-45   |
| Contig 51                           | 7          | 636                      | Aflatoxina   | 3e -99  |
| Contig 81                           | 7          | 1.035                    | Urate oxidase  | 1e-169  |
| Contig 168                          | 7          | 622                      | Proteína hipotética                                    | 1e-103  |
| Contig 195                          | 7          | 622                      | Proteína hipotética                                    | 3e-45   |
| Contig 89                           | 6          | 1.649                    | Relacionada a permease                                 | 0.0     |
| Contig 26 <sup>d</sup>              | 6          | 561                      | Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK)                 | 5e-88   |
| Contig 188                          | 6          | 1.235                    | Co transportador de fosfato Na+                        | 0.0     |
| Contig 102                          | 6          | 581                      | Fator de virulência (CAP20)                            | 2e-75   |
| Contig 229                          | 6          | 680                      | Translocase  | 1e-106  |
| Contig 230                          | 6          | 1.071                    | Proteína hipotética                                    | 4e -88  |
| Contig 144                          | 6          | 769                      | Proteína hipotética                                    | 1e-83   |
| Contig 270                          | 6          | 1.792                    | Proteína hipotética                                    | 0.0     |
| Contig 154                          | 6          | 632                      | Proteína hipotética                                    | 0.0     |
| Contig 145                          | 6          | 547                      | Proteína hipotética                                    | 5e-46   |
| Contig 43 <sup>c</sup>              | 5          | 1.078                    | Proteína hipotética                                    | 1e-107  |
| Contig 227                          | 5          | 557                      | Proteína hipotética                                    | 9e-80   |
| Contig 138                          | 5          | 581                      | Proteína hipotética                                    | 3e-41   |
| Contig 100                          | 5          | 1.101                    | Transportador de carnitina                             | 1e-177  |
| Contig 11                           | 5          | 757                      | Proteína hipotética                                    | 1e-92   |
| Contig 201                          | 5          | 1.074                    | Proteína hipotética                                    | 1e-170  |
| Contig 202                          | 5          | 516                      | Relacionado a translocação de um fosfolípido ATPase    | 4e-74   |
| Contig 193                          | 5          | 1.212                    | Ácido acetil-D-galactosaminurônico desidrogenase       | 0.0     |
| Contig 184 <sup>d</sup>             | 5          | 1.147                    | Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK1)                | 0.0     |
| Contig 200                          | 5          | 594                      | Relacionado a 1,3-beta-glucosidase                     | 3e-48   |
| Contig 252                          | 5          | 992                      | Relacionado a um gene específico de esporulação (SPS2) | 1e-119  |
| Contig 20                           | 5          | 388                      | Glutamina sintetase (GS)                               | 1e-54   |
| Contig 273                          | 5          | 762                      | Proteína – RIC1  | 4e-24   |

<sup>a</sup> Tamanho de cada *contig* em pares de bases (pb); <sup>b, c, d</sup>, *Contigs* 191 e 74, *contigs* 26 e 184, *contigs* 263 e 43 apresentaram o mesmo *match* para diferentes regiões dos transcritos respectivamente, indicando que podem representar o mesmo gene.

Cabe aqui salientar que o termo maior ou menor “expressão” é referido para a quantidade de transcritos em nível de RNA, os quais, não necessariamente serão codificados em proteínas, tendo em mente as alterações pós-transcricionais. Juntos, os *contigs* 191 e 74 somaram 28 ESTs e os *contigs* 263 e 43 com 14 ESTs, ambos com similaridade a proteínas hipotéticas. Da mesma forma, os *contigs* 26 e 184 somaram 11 ESTs, com similaridade a uma fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK I). A incidência de unigenes com mesma descrição tem sido associada a transcritos de um mesmo gene (TRAIL et al., 2003).

Entre os genes mais expressos, 45 % apresentaram similaridade com proteínas hipotéticas já identificadas para *F. graminearum*, através do FGDB-MIPS. Estes transcritos, embora ainda não apresentem estudos funcionais associados, representam possíveis novos genes que precisam ser caracterizados, dado ao alto nível de expressão nesta biblioteca.

Dentre os demais genes que foram presumivelmente identificados destacam-se os que codificam para enzimas importantes em vias metabólicas, principalmente integrantes do metabolismo de carboidratos, como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), fosfoglicerato quinases (PGK), fosfoenolpiruvato carboxilases (PEPC). Considerando-se que fungos filamentosos utilizam preferencialmente a respiração como fonte de carbono (KELLY et al., 1990), a alta redundância destes transcritos era esperada, pois são enzimas importantes na via glicolítica que catalisam a primeira etapa do metabolismo de gliceraldeído-3-fosfato à piruvato (FUKUCHI; OTSUKA, 1992).

Entretanto, a alta frequência do transcrito piruvato descaboxilase (PDC) e, principalmente de álcool desidrogenase I (ADH I), 8 e 33 ESTs respectivamente, sugere que a fermentação foi a via preferencial para produção de energia em fungos sob cultura *in vitro* (NEUMANN; DOBINSON, 2003). Segundo Johnston (1990), isto ocorre quando a disponibilidade de glicose no meio vai diminuindo e as células começam a consumir o etanol gerado durante a fermentação e, conseqüentemente, ativando a expressão dos genes

correspondentes. Também foi observada a alta expressão da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK), tendo-se como base os contigs 184 e 26, que juntos somaram 11 ESTs. Esta enzima é necessária para a entrada de carbono via oxaloacetato e conseqüente suprimento de glicose através da gliconeogênese. Em um meio com reduzida disponibilidade de nutrientes, a taxa de produção de ATP é o fator mais importante na competição das células. Esta conversão da glicose em etanol também foi bservada em *F. oxysporum*, sob meio de cultura com pouca disponibilidade de oxigênio (PANAGIOTOU et al., 2005).

Dentre os transcritos mais frequentes, foram também identificadas seqüências associadas à policetídeos de sintases (PKS), uma classe de compostos, antibióticos e toxinas, produzidas pelo metabolismo secundário de fungos filamentosos e bactérias (*contig* 243 e 56). Em fungos, estes componentes são sintetizados por enzimas multifuncionais, ou seja, apresentam uma estrutura modular, onde cada módulo subdivide-se em domínios envolvidos em cada etapa da catálise de metabólitos (MOFFITT; NEILAN, 2000; SIMPSON, 1995). Entre os metabótitos produzidos por espécies de Fusarium, destacam-se as micotoxinas do tipo aurofusarin, aflatoxina e zearalenone (GAFFOOR et al., 2005). Similarmente, o transcrito 6-hidroxi-D-nicotina-oxidase (12 ESTs) tem sido referido pertencer a um grupo de oxidoreductase que cataliza a conversão de 6-hidroxirubrofusarina à aurofusarin, que produz uma pigmentação avermelhada em espécies de Fusarium, como *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. pseudograminearum*. Recentemente, Malz et al. (2005) demonstraram a participação do gene PKS12 de *F. graminearum* na biossíntese desta micotoxina.

Outros tipos de PKS I são conhecidos ser fatores de virulência para alguns patógenos de plantas (KROKEN et al 2003). Com o avanço de estudos genômicos de microrganismos, a detecção e caracterização destes componentes têm se tornado cada vez mais acessível. Numa análise filogenética de genes associados à PKS de genomas de 8 espécies de fungos ascomicetos, tais como, *Cochliobolus heterostrophus* (*Bipolaris maydis*);

*Gibberella moniliformis*, *Fusarium verticillioides* e *Gibberella zeae* (*F. graminearum*), Kroken et al. (2003) verificaram uma grande diversidade de genes PKS entre estes microrganismos. A presença desses genes em fungos tem sido associada à formação de toxinas, pigmentos ou na produção de moléculas de sinalização necessárias para os processos de formação e desenvolvimento de hifas aéreas, conídios e reprodução sexual.

Gaffoor et al. (2005) observaram o perfil de expressão de 15 genes de *G. zeae* em diferentes condições de desenvolvimento deste fungo: durante a colonização sobre grãos e plantas, bem como no desenvolvimento sexual e micelial. Segundo estes autores, tanto a diferença de expressão constatada nestas condições como a variedade de genes PKS identificados se justifica pela condição saprofítica e patogênica deste fungo, havendo necessidade da produção destes diferentes metabólitos como mecanismos de defesa.

Outro gene de alta expressão foi o que codifica para proteínas de choque térmico “*heat shock protein - DDR48*”, uma proteína comum tanto em organismos eucariotos como procariotos e que tem sido associada a genes induzidos para a adaptação à condição de estresse, principalmente ao calor (CHOI et al., 1990). Este mecanismo de adaptação é bem conhecido e sabe-se que envolve a indução de várias famílias de proteínas de choque térmico conservadas. Embora todos os organismos a sintetizem, o balanço destas proteínas e sua importância na tolerância ao estresse variam muito entre organismos (QUEITSCH et al., 2000). O gene *DNA-damage-responsive* (DDR48) foi descrito em *Saccharomyces cerevisiae* como parte de um grupo de genes, induzido em resposta a algum tipo de estresse químico ou por calor, provocando alterações no DNA (McCLANAHAN; McENTEE, 1986; TREGGER; McENTEE, 1990). A alta redundância de HSPs também foi observada em *N. crassa* (AIGN; HOHEISEL, 2003) e *F. graminearum* (TRAIL et al., 2003) cultivados em meios de cultura com algum tipo de carência nutricional, como fonte de carbono e/ ou nitrogênio, por exemplo. Em *M. graminícola*, a maior incidência de transcritos com similaridade a proteínas de choque

térmico foi obtida durante o crescimento do fungo sobre folhas de trigo (KEON et al., 2005). De acordo com estes autores, a maior incidência destes transcritos reflete a importância desses genes induzidos por estresses como forma de defesa do fungo durante a interação com a planta hospedeira.

Também foi verificada a presença de uma proteína precursora de estruturas específicas de fungos ascomicetos, denominadas de “*Woronin body*” (*contig* 124). Estas estruturas são associadas ao poro septal das hifas e ocupam papel importante na manutenção da integridade celular desses fungos. Quando ocorre algum tipo de dano sobre as hifas, estas proteínas sofrem um desdobramento estrutural formando um núcleo denso utilizadas para o fechamento do poro, impedindo assim, a perda citoplasmática e conseqüente morte celular (COLLINGE; MARKHAM, 1985; JEDD; JUA, 2000). Quando o gene (HEX-1) que codifica para este precursor é alterado, não há transcrição dessa proteína e, conseqüentemente, não há formação dessas estruturas. A mutação no gene HEX-1 de *N. crassa* foi fundamental para que ocorresse a perda citoplasmática após a lise das hifas (JEDD; CHUA, 2000; TENNEY et al., 2000). Em *M. grisea*, estas estruturas são necessárias para o desenvolvimento e funcionamento normal do apressório, estruturas especializadas no estabelecimento da infecção por este fitopatógeno (SOUNDARARAJAN et al., 2004).

As informações geradas pela biblioteca FGEQBDA de *F. graminearum*, isolado de culturas de trigo no sul do Brasil poderão contribuir para estudos de entendimento da constituição e função dos genes deste fitopatógeno e sua interação com cultivares já adaptadas às condições locais. Entretanto, o conhecimento da estrutura de um gene ou de um determinado elemento funcional, muitas vezes não é suficiente para se chegar a determinadas respostas biológicas, sendo preciso conhecer a função e o perfil de expressão destes genes (PASSOS; NGUYEN; JORDAN, 1999). Desta forma, quanto maior o número de informações sobre um determinado organismo, mais rápido se poderá chegar ao conhecimento de sua

biologia e interação com o ambiente. Além disso, o banco de dados FGEQBDA será útil para futuras análises envolvendo o perfil de expressão deste fitopatógeno na interação com possíveis organismos antagonistas.

### 3.4. CONCLUSÕES

A construção de uma biblioteca de cDNA de *F. graminearum* sob cultivo *in vitro* possibilitou a obtenção de 1.983 seqüências válidas, sendo necessário o estabelecimento de um banco de dados para administrar a informação obtida. As informações geradas neste estudo poderão ser utilizadas em estudos futuros de análise de expressão gênica durante a interação fitopatógeno x microrganismo antagonista;

Os 1.282 possíveis genes (unigenes) obtidos neste estudo permitiram identificar transcritos que participam em vias metabólicas importantes do metabolismo, principalmente integrantes do metabolismo de carboidratos como gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, fosfoglicerato quinases e fosfoenolpiruvato carboxilases, entre outros. A condição de crescimento de *F. graminearum in vitro* favoreceu também, a identificação de componentes produzidos pelo metabolismo secundário em resposta a condição de estresses, semelhantes aos obtidos durante o processo de infecção pelo fungo.

Os 45 % de transcritos sem função definida “proteínas hipotéticas” constitui um grupo de genes em potencial, dada a alta freqüência, porém evidenciando a necessidade de ampliação dos estudos de genômica estrutural em fungos de importância econômica;

Os clones gerados nesta biblioteca de cDNA constituem uma fonte de genes de *F. graminearum* que poderão disponibilizados para programas de melhoramento genético vegetal, visando a obtenção de cultivares com maior tolerância a este tipo de fitopatógeno, principalmente por se tratar de um isolado patogênico específico de culturas nacionais.

**4. ANÁLISE DE SEQÜÊNCIAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS DE *FUSARIUM GRAMINEARUM* SCHWABE EM RESPOSTA A INTERAÇÃO ANTAGONISTA COM A BACTÉRIA *PANTOEA AGGLOMERANS* GAVINI, COM BASE EM MACROARRANJOS.**

## RESUMO

PANDOLFI, V. **Análise de seqüências diferencialmente expressas de *Fusarium graminearum* Schwabe em resposta a interação antagonista com a bactéria *Pantoea agglomerans* Gavini, com base em macroarranjos.** 2006. 140 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

Nos cereais, a perda de qualidade dos grãos e de produtividade em decorrência de doenças causadas por fungos como *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorfo *Gibberella zeae* Schw.), causador da fusariose, se reveste de suma importância em âmbito internacional. Uma estratégia que tem se mostrado eficiente e promissora no manejo de doenças é a seleção de antagonistas a fitopatógenos, capazes de serem agregados ao arsenal de proteção contra diferentes tipos de enfermidades. Dentre as bactérias, destacam-se diferentes linhagens de *Pantoea agglomerans*, espécie que tem se mostrado um evidente antagonista contra diferentes microrganismos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de antagonismo da bactéria *P. agglomerans* frente ao fungo fitopatogênico *F. graminearum* e também identificar genes diferencialmente expressos durante o processo de interação deste fitopatógeno com a bactéria antagonista. Os resultados dos testes de antibiose *in vitro* revelaram que tanto *F. graminearum* como dois outros fitopatógenos, *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoem e *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorok.), tiveram seu crescimento inibido na presença de *P. agglomerans*. Os dados revelaram que a inibição do crescimento estava associada a compostos solúveis e voláteis, que foram responsáveis por cerca de 50 % e 40 % de inibição, respectivamente. O perfil de expressão gênica do fungo *F. graminearum* sob o efeito de antagonismo pela bactéria *P. agglomerans* foi determinado pela técnica de macroarranjos. Dos 1.012 genes analisados, 29 genes de *F. graminearum* mostraram diferença

de expressão ( $p < 0,05$ ) durante a interação com a bactéria antagonista. Destes, 19 genes foram induzidos e 10 genes foram reprimidos. A anotação presumida destes transcritos foi realizada através da análise BlastX dentro do banco de dados FGDB-MIIPS, específico de *F. graminearum*. Entre os transcritos induzidos, destacaram-se aqueles representados por proteínas envolvidas nos processos de defesa e/ou virulência de fungos, que foram induzidos em resposta a estresses nutricional e abiótico. Entre os genes de *F. graminearum* que foram reprimidos, destacou-se um transcrito com similaridade a uma proteína com um domínio do tipo dedo de zinco “*zinc finger*”, que é um fator de transcrição importante no processo de divisão celular. Os outros transcritos reprimidos foram associados a proteínas envolvidas na cadeia respiratória, proteínas do tipo chaperona, proteínas com domínios de sinalização celular e hidrolases. Os dados de diferença de expressão foram confirmados e validados pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-PCRq). De 7 genes utilizados para confirmação da expressão do macroarranjo, 6 genes tiveram sua expressão diferencial confirmada por RT-PCRq. A quantificação do nível de expressão é fundamental para compreender o padrão de resposta do fungo na interação com o agente antagonista. Esta análise permitiu visualizar o comportamento molecular global dos genes envolvidos nas principais vias metabólicas de *F. graminearum*, incluindo-se aquelas associadas a defesa e virulência durante o processo de infecção. Estudos futuros dos genes do fungo *F. graminearum*, que foram aqui revelados como diferencialmente expressos em resposta ao antagonismo de *P. agglomerans*, poderão fornecer informações essenciais para o estabelecimento de estratégias de manejo e controle da fusariose.

Palavras-chave: fitopatógeno, antagonismo, expressão diferencial, RT-PCRq

## ABSTRACT

PANDOLFI, V. **Analysis of differentially expressed sequences of *Fusarium graminearum* Schwabe in response to antagonistic interactions with the bacteria *Pantoea agglomerans* Gavini, as based on macroarrays.** 2006. 140 f. Thesis (Doctoral) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

In cereals, the loss of grain quality and productivity due to fungal diseases, such as the fusariosis caused by *Fusarium graminearum*, is of great significance in an international context. A strategy that has shown to be efficient and promising for disease control is the selection of antagonists to phytopathogens. Among bacteria, the species *Pantoea agglomerans* has been of remarkable interest because it that has demonstrated antagonistic potential against several microorganisms. The objective of the present work was to evaluate the antagonist potential of the bacteria *P. agglomerans* against the phytopathogen fungus *F. graminearum* and, in addition, to identify genes that are differentially expressed upon the interaction between this phytopathogen and the antagonist bacteria. Antibiosis tests revealed that, under *in vitro* culture conditions, the growth of *F. graminearum* and other two pathogenic fungi, *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoem and *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorok.), was inhibited in the presence of *P. agglomerans*. The data demonstrated that the growth inhibition was associated to soluble and volatile compounds, which caused approximately 50 % and 40 % inhibition, respectively. Gene expression profile of the fungus *F. graminearum* under the antagonistic effect of bacteria *P. agglomerans* was determined by using the macroarrays technology. Of 1,012 analysed genes of *F. graminearum*, 29 displayed different patterns of expression ( $P < 0,05$ ) during interaction with the antagonist bacteria. Of those differentially expressed genes, 19 were induced and 10 genes repressed. Annotation of

these putative transcripts was performed using BlastX analysis against the FGDB-MIIPS database, which is specific to *F. graminearum*. Induced transcripts comprised genes encoding relevant proteins, which are expressed in association with fungal defense and/or virulence, in response to nutritional and abiotic stresses. Among repressed *F. graminearum* genes, there was a zinc finger protein with similarity to transcription factors and binding proteins, which are important in cell division. Other repressed transcripts were associated to respiratory chain proteins, chaperone-type proteins, proteins with cell signalling domains, and hydrolases. Data of differential expression were validated and confirmed by real-time quantitative PCR (RT-PCRq). Of 7 genes used in validation of macroarray expression, 6 genes had their differential expression confirmed by RT-PCRq. Quantification of expression level is fundamental to understand the fungus response pattern in interaction with the antagonist agent. This analysis allowed the molecular visualization of the global expression of genes involved in main metabolic routes of *F. graminearum*, including those associated to defense and virulence during infection process. Further studies on the *F. graminearum* genes herein identified as differentially expressed in response to the antagonist effect of *P. agglomerans*, would provide fundamental information useful to establish strategies concerning management and control of fusariosis.

Key-words: phytopathogen, antagonism, gene differential expression, RT-PCRq.

#### 4.1. INTRODUÇÃO

Perdas na produção e qualidade de grãos causadas por *Fusarium graminearum*, (teleomórfo *Gibberella zeae* - Schwein. Petch) têm sido uma realidade no Brasil, causando substanciais perdas econômicas. A rotação de culturas e o tratamento químico têm sido utilizados no controle desta doença (PICININI; FERNANDES, 1994; PANISSON; REIS; BOLLER, 2003). Porém, o gasto com fungicidas e, principalmente, o acúmulo de resíduos químicos nos grãos após a colheita, não podem ser ignorados, uma vez que provocam risco à saúde animal e humana (PICININI; FERNANDES, 2001). Embora o uso de germoplasmas resistentes seja a forma mais correta para se amenizar o impacto desta doença (MESTERHAZY, 1997), poucas fontes de resistência genética são conhecidas. Além disso, a incorporação de genes de resistência é uma tarefa difícil, uma vez que há uma variação muito alta na virulência entre e dentro da mesma espécie (CARTER et al. 2002; GANG et al. 1998; LIMA, 2002; MIEDANER; SCHILING, 1996).

Uma estratégia que tem se mostrado eficiente e promissora no manejo de doenças é a seleção de antagonistas a diferentes fitopatógenos, capazes de serem agregados ao arsenal de proteção contra diferentes tipos de fitopatogenicidade. Microorganismos com efeito antagonista sobre *F. graminearum* incluem vários gêneros de bactérias gram-negativas e gram-positivas, bem como gêneros de fungos filamentosos e leveduras (LUZ, 2000; SCHISLER; KHAN; BOEHM, 2000). Dentre as bactérias, destacam-se linhagens de *Pantoea agglomerans*, espécie que tem se mostrado como um potencial antagonista contra diferentes microrganismos, incluindo *Erwinia amylovora* (NICHOLSON et al., 1990; WODZINSKI et al., 1990), várias espécies de *Penicillium* (NUNES et al., 2000; WRIGHT, et al., 2001); *Xanthomonas campestris* (THIND; JINDAL, 1988), *Fusarium culmorum* (KEMPF; WOLF, 1989), entre outros.

Apesar do pouco conhecimento sobre as propriedades antagonistas dos agentes de biocontrole, sabe-se que estas estão baseadas em um dos seguintes modos de ação: atuação direta sobre o patógeno no interior da planta hospedeira, predação, competição por nutrientes, parasitismo direto e pela produção de metabólitos, entre outros (GREGOLETTI Jr.; SANTOS; AUER, 2004; LODEWYCKX et al., 2002; PAN et al., 1997; PLEBAN; CHERNIN; CHET, 1997). Outra estratégia de biocontrole “antibiose”, principalmente contra fungos patogênicos, é a produção de componentes inibitórios à síntese de DNA e ciclo celular, assim como compostos que alteram a estrutura da membrana e da parede celular, entre outros (BORMANN et al., 1999; GHANNOUM; RICE, 1999; SELITRENNIKOFF, 2001).

Embora proteínas e peptídeos com atividade antifúngica já tenham sido caracterizadas em ampla diversidade, outras substâncias com propriedades semelhantes ainda não foram estudadas. Além disso, os mecanismos de ação das substâncias antifúngicas sobre o agente patogênico precisam ser melhor elucidados (NG, 2004). Em tal contexto, o uso de técnicas moleculares torna possível a realização de análises de alta resolução da expressão diferencial de seqüências genômicas associadas à resposta no processo de antagonismo entre fungos fitopatogênicos e microrganismos a eles antagônicos.

Diferentes metodologias moleculares têm sido eficientemente utilizadas com a finalidade de medir o nível de transcritos em resposta a uma grande variedade de estímulos químicos ou físicos (CARULLI et al., 1998). Entre a variedade de metodologias atualmente disponíveis para análise de expressão, destaca-se os arranjos de DNA (BALDWIN et al., 1999), os quais permitem a análise da expressão gênica de uma determinada amostra biológica em escala genômica, ou seja, de milhares de genes avaliados simultaneamente (DOPAZO et al., 2001; FREEMAN; ROBERTSON; VRANA, 2000).

Análises por macroarranjos requerem suportes sólidos como, por exemplo, membrana de náilon, onde são fixadas seqüências completas ou parciais de DNA, que podem ser ESTs, produtos de PCR, plasmídeos ou bactérias contendo plasmídeos. Sondas são produzidas, com incorporação de isótopos radioativos, a partir da transcrição reversa dos RNAm obtidos de células crescidas em diferentes condições. As sondas são então utilizadas para hibridização com o DNA fixado na membrana. Conseqüentemente, quanto maior for a expressão de um determinado gene em uma condição específica, maior será a quantidade do sinal radioativo emitido após a hibridização, em função da maior concentração do transcrito (COX, 2001; FELIX et al., 2002; FREEMAN; ROBERTSON; VRANA, 2000; VAN HAL et al., 2000)

Macroarranjos de DNA têm sido demonstrados como uma técnica eficiente para análise dos níveis de expressão diferencial de centenas a milhares de genes empregando metodologias rotineiras em laboratórios de biologia molecular (BALDWIN et al., 1999; FREEMAN; ROBERTSON; VRANA, 2000). A visão global da expressão gênica proporcionada por este tipo de metodologia permite avaliar as mudanças temporais e espaciais na atividade gênica, facilitando assim a seleção de genes candidatos para o problema biológico estudado (JURECIC, 2000; VAN HAL et al., 2000). Embora a construção de bibliotecas de ESTs proporcione uma maior rapidez na identificação de novos genes, na técnica de arranjos de DNA (micro ou macroarranjos) é possível realizar uma análise global da expressão gênica e são consideradas, portanto, técnicas complementares (WANG; HU; LEGER, 2005).

A técnica de expressão via arranjos de DNA tem sido descrita em inúmeros trabalhos de análise transcricional de microrganismos em diferentes condições, dentre os quais encontram-se *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pilory*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outros (YE et al., 2001; ZHANG, et al.,

2002). Em fungos, a análise por arranjos de DNA tem sido aplicada para se determinar o perfil transcricional destes microrganismos em resposta a diferentes condições de estresse tanto abiótico como biótico, tais como resposta a fatores nutricionais, a agentes antifúngicos e a interações fungo x planta. Com esta finalidade, transcriptomas de fungos como *Saccharomyces cerevisiae* (HAYES, et al., 2002; KUHN, et al., 2001; ZHANG et al., 2002; DERISI et al., 2000), *Neurospora crassa* (AIGN; HOHEISEL, 2003); *Sinorhizobium meliloti* (AMPE et al., 2003), *Aspergillus nidulans* (SIMS et al., 2004) já foram analisados com base em hibridização com arranjos de DNA.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de antagonismo da bactéria *P. agglomerans* frente ao fungo fitopatogênico *F. graminearum*, por meio de teste de antibiose *in vitro* e, a seguir, identificar genes diferencialmente expressos durante o processo de interação deste fitopatógeno com a bactéria antagonista, utilizando-se técnica de macroarranjos de DNA.

## **4.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1. Análise do antagonismo da bactéria *P. agglomerans* frente ao fungo *F. graminearum***

#### **4.2.1.1. Cultura dos microrganismos**

O fungo fitopatogênico *F. graminearum* (teleomórfo *Gibberella zeae* - Schwein. Petch), isolado de cultivares de trigo, e seu potencial antagonista, a bactéria *P. agglomerans* (isolados 1494.4.2A e 9789.TL.31A) foram gentilmente cedidos pelo pesquisador Dr. Wilmar C. da Luz, da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. O fungo foi crescido em meio de cultura BDA ¼ (35 g de batata, 2,5 g de dextrose e 15 g de agar microbiológico) em câmara de crescimento a 28°C, fotoperíodo de 12 horas, durante 6 dias. A cultura da bactéria foi estabelecida em meio Luria-Bertani (LB) sólido (SAMBROOK et al., 1989), em câmara de

crescimento a 28°C por 18 horas. Colônias dos dois isolados de *P. agglomerans* foram individualmente transferidas para meio LB líquido a 150 rpm, 28°C, por 16 horas. A seguir, as culturas dos dois isolados foram individualmente estocadas em glicerol 50 % (v/v), a -80°C.

#### **4.2.1.2. Seleção do isolado da bactéria com maior eficiência de antagonismo**

Os dois isolados da bactéria *P. agglomerans*, isolado 9789.TL.31A (tratamento A) e o isolado 1494.4.2A (tratamento B), foram testados *in vitro* para avaliar a eficiência no processo de antagonismo contra o fungo *F. graminearum*. Esses isolados foram plaqueados sobre meio de cultura BDA ¼, em placas de Petri de 150 mm x 15 mm e mantidas em câmara de crescimento a 28°C por 24 horas.

Para o teste de antagonismo, estas culturas foram transferidas para novas placas contendo BDA ¼, com auxílio de um funil de vidro de 10 cm de diâmetro, previamente esterilizado, a fim de se obter uma circunferência de bactérias sobre o meio de cultura. As culturas foram mantidas a 28°C por 24 horas e 48 horas antes da inoculação do fungo no centro da circunferência da cultura de bactéria. Assim, além de testar qual isolado seria mais eficiente no antagonismo, foi verificado se o tempo de cultura da bactéria também interferia no processo de antagonismo contra o fungo. Foram realizadas três repetições para cada tratamento (A e B) em cada tempo de inoculação (24 e 48 horas). Placas contendo meio BDA ¼ inoculadas somente com o fungo foram denominadas de controle. No total foram 15 placas: 2 isolados x 2 tempos x 3 repetições + 3 placas controles. Após a inoculação do fungo, estas placas foram mantidas a 28°C por 6 dias (Figura 4.1).

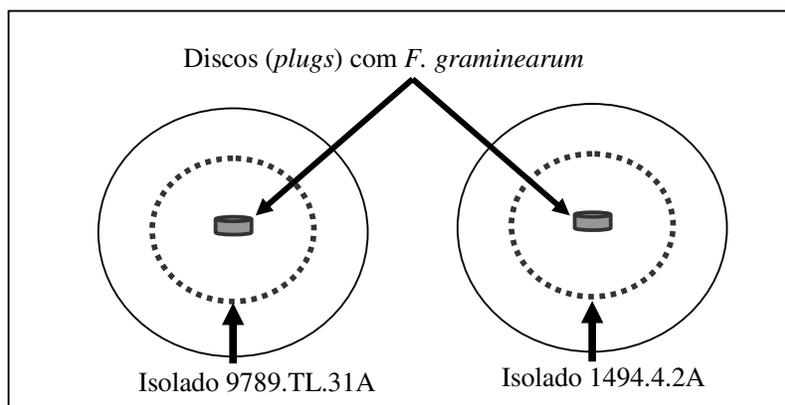


Figura 4.1 – Ilustração esquemática do teste *in vitro* de antagonismo entre *P. agglomerans* contra *F. graminearum*.

Após 6 dias de incubação, o crescimento do fungo *F. graminearum*, na presença ou ausência da bactéria *P. agglomerans*, foi avaliado por meio da medição unidirecional com uma régua graduada em centímetros. Foi realizada a análise estatística de variância fatorial A x B, inteiramente casualizado e os dados foram comparados pelo teste de Duncan ( $P = 0,05$ ).

Também foi verificado se, no processo de antagonismo, a inibição do crescimento do *F. graminearum* era dependente da presença da *P. agglomerans* no meio de cultura ou se após a retirada da bactéria ainda haveria inibição induzida pelos seus exudatos. Este teste foi realizado com o isolado 1494.4.2A, uma vez que sua propriedade antagonista já foi comprovada e patenteada (Embr. 1494, acesso ATCC PTA 3460).

Foram preparadas placas de Petri (150 mm x 15 mm) contendo meio de cultura BDA  $\frac{1}{4}$ , que foram denominadas T1, T2 e T3, todas com 5 repetições. Nos tratamentos T1 e T2, o meio de cultura havia sido previamente inoculado (24 e 48 horas, respectivamente) com a bactéria *P. agglomerans*, formando uma circunferência com 10 cm de diâmetro. No tratamento T3, o meio de cultura foi inoculado apenas com o fungo na região central da placa, sendo considerado como controle no experimento. As culturas foram incubadas durante 48

horas em câmara de crescimento, a 28°C e com fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, no tratamento T2 foi removida a porção do meio de cultura contendo a bactéria e estas placas foram transferidas novamente para a câmara de crescimento. No sexto dia de incubação foi realizada a avaliação visual da inibição.

#### **4.2.1.3. Análise qualitativa de produtos produzidos por *P. agglomerans* no antagonismo contra alguns fungos fitopatogênicos**

Foram conduzidos dois experimentos para verificar se o efeito de antagonismo da bactéria *P. agglomerans* (isolado 1494.4.2A) está associado à liberação de produtos solúveis e/ou de compostos voláteis. Nestes experimentos, os fungos fitopatogênicos testados foram: *F. graminearum*, *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoem e *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorok.).

A) Avaliação da produção de compostos solúveis em meio de cultura: uma colônia da bactéria *P. agglomerans*, crescida em meio BDA, foi transferida para 1 mL de meio BD (batata-dextrose) líquido e a cultura foi incubada sob agitação a 120 rpm, a 28°C por 48 horas. Após este período, foram realizadas diluições sucessivas da cultura bacteriana para quantificação em espectrofotômetro (Spectronic – 20 Genesys), com intuito de se obter uma curva padrão dessa suspensão bacteriana para  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> de bactérias. Desse modo, realizou-se novamente um cultivo líquido e, após 48 horas de crescimento a 120 rpm à 28 °C, fez-se uma leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 550 nm e ajustada para 0,5 de absorvância, para obtenção de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> de bactérias.

Após centrifugação a 10.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos, o sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore (0,22 micras) e 1 mL desse filtrado foi adicionado em meio de cultura (BDA) fundente, a uma temperatura aproximada de 40 °C. Após a solidificação do

meio de cultura procedeu-se o cultivo dos fungos *Bipolares*, *Drecheslera* e *F.graminearum* e a seguir, colocados para crescer em ambiente próprio com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 28 °C durante 8 dias, até o crescimento máximo na placa controle (meio de cultura sem o estrato da bactéria).

Os tratamentos neste experimento foram os seguintes:

**Tratamentos controles:** (T1) placa sem microrganismo; (T2) placa com a bactéria *P. agglomerans*, (T3) placa com o fungo *B. sorokiniana*; (T4) placa com o fungo *D. tritici-repentis* e (T5) placa com o fungo *F. graminearum*.

**Tratamentos interação:** (T6) placa com o filtrado de *P. agglomerans* + o fungo *B. sorokiniana*; (T7) placa com o filtrado de *P. agglomerans* + *D. tritici-repentis* e (T8) placa com o filtrado de *P. agglomerans* + *F. graminearum*.

B) Avaliação de compostos envolvidos no processo de interação: a bactéria *P.agglomerans* e os três fungos foram inoculados, individualmente, em placas de Petri (90 mm x 15 mm) contendo meio BDA. Em uma câmara de fluxo laminar, cada placa contendo a bactéria foi posicionada de frente com uma placa contendo o fungo, porém, de maneira que o fungo e a bactéria não tivessem contato um com o outro. Desta forma, se houvesse antagonismo este poderia ser atribuído à liberação de produtos voláteis presentes entre as duas placas. As placas foram seladas com parafilme e incubadas em fotoperíodo de 12 horas à 28 °C por 8 dias.

Os tratamentos para este experimento foram os seguintes:

**Tratamentos controles:** (T1) placa sem microrganismo; (T2) placa com a bactéria *P. agglomerans*; (T3) placa com o fungo *B. sorokiniana*; (T4) placa com o fungo *D.tritici-repentis* e (T5) placa com o fungo *F.graminearum*.

**Tratamentos interação:** (T6) placa com *P. agglomerans* + placa com *B.sorokiniana*; (T7) placa com o *P. agglomerans* + placa com *D.tritici-repentis* e (T8) placa com *P. agglomerans* + placa com *F.graminearum*

No oitavo dia de incubação em câmara de crescimento a 28°C, fotoperíodo de 12 horas, foi realizada a leitura em centímetros (cm) do crescimento radial dos fungos nos dois experimentos. O arranjo experimental foi em blocos inteiramente casualizados com 5 repetições para cada tratamento, nos dois ensaios. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com significância ao nível de 5 % de probabilidade.

#### **4.2.2. Confirmação da classificação taxonômica do isolado *P. agglomerans* 1494.4.2A pela amplificação e seqüenciamento do gene 16S rDNA.**

A classificação taxonômica de *P. agglomerans*, isolado 1494.4.2A, foi confirmada por meio da amplificação e seqüenciamento direto do fragmento do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico (16S rDNA). Colônias individuais do isolado 1494.4.2A foram estriadas em tubos de microcentrífuga contendo: 2,5 µL de tampão de PCR 10x (TRIS-HCl 200mM pH 8,4; KCl 500 mM), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,25 µL de dNTPs (10 mM cada), 1,5 U de *Taq DNA polimerase*; 0,5 µL (5 pmoles/ µL) dos *primers* FD1 e RD1 reverso e direto respectivamente, específicos para o gene rRNA 16S de bactérias (Tabela 4.1). O volume total foi ajustado para 25 µL com água Milli.Q esterilizada. A amplificação foi realizada no termociclador *GeneAmp PCR Systems 9700* (Applied Biosystem). Inicialmente, a mistura de reação foi aquecida a 96°C por 4 minutos e, a seguir, a amplificação foi realizada em 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 55°C e 2 minutos a 72°C, seguida de 10 minutos a 72°C, para uma extensão final. A amplificação dos fragmentos de DNA de 1.500 pares de bases (pb) foi confirmada em gel de agarose 1 %, usando o padrão de peso molecular *ladder λ EcoRI/ Hind III 1Kb* (Invitrogen). O produto de PCR do gene 16S rDNA foi purificado com o *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Biosciences), seguindo as especificações do fabricante.

#### 4.2.2.1. Reação de seqüenciamento do gene 16S rDNA.

A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando *primers* internos e externos específicos para a amplificação do gene 16S rDNA (Tabela 4.1). Foram realizadas duas reações para cada *primer*, que foram tratadas como duas repetições.

Tabela 4.1 - *Primers* universais internos e externos (Invitrogen) utilizados para a amplificação do gene 16S rRNA do isolado 1494.4.2A

| <b>Identificação do <i>primer</i></b> | <b>Seqüência do <i>primer</i></b> |
|---------------------------------------|-----------------------------------|
| <b><i>primers</i> externos</b>        |                                   |
| FD1                                   | 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'  |
| RD1                                   | 5' AAG GAG GTG ACT CAG CC 3'      |
| <b><i>primers</i> internos</b>        |                                   |
| 341-357F                              | 5' CCT ACG GGA GGC AGC AG 3'      |
| 357R                                  | 5' CTG CTG CCT CCC GTA GG 3'      |
| 685-704F                              | 5' GTA GSG GTG AAA TSC GTA GA 3'  |
| 704R                                  | 5' TCT ACG SAT TTC ACC SCT AC 3'  |
| 1099-1114F                            | 5' GCA ACG AGC GCA ACC C 3'       |
| 1114R                                 | 5' GGG TTG CGC TCG TTG C 3'       |

Em um termociclador *GeneAmp PCR Systems 9700* (Applied Biosystem), a mistura de reação foi submetida a 30 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 1 minuto a 60°C. A seguir, a mistura de reação foi purificada adicionando-se 1 µL de acetato de sódio (NaOAc 1,5 M, pH 8,5; EDTA 250 mM) e 100 µL de etanol absoluto. Após centrifugação a 3.200 x g, por 45 minutos a 4°C, descartou-se o etanol e o precipitado foi lavado com 150 µL de etanol 70 % (-20°C). A centrifugação foi repetida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ficou secando a temperatura ambiente (T.A.) por 1 hora. Finalmente, foram adicionados 10 µL de *Hi Di Formamide* (Applied Biosystem) e as amostras foram submetidas ao seqüenciamento automático no equipamento ABI 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystem).

#### 4.2.2.2. Análise e identificação das seqüências de DNA

As seqüências de nucleotídeos dos fragmentos do 16S rDNA amplificados a partir das culturas do isolado *P. agglomerans* 1494.4.2A foram analisadas pelos algoritmos *Phred/Phrap/Consed* (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998; GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998) para a verificação de qualidade e para agrupamento e montagem dos *contigs*. O alinhamento das seqüências consensos dos *contigs* foi realizado pelo programa CLUSTALW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). A seqüência consenso gerada neste alinhamento foi comparada com seqüências de nucleotídeos BlastN contra o banco “nr” do *GenBank* (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>) para a busca de similaridade com as seqüências do gene 16S rDNA de bactérias depositadas neste banco.

#### 4.2.3. Seleção dos clones de *F. graminearum* para confecção dos macroarranjos

A expressão diferencial de genes do fungo *F. graminearum* na presença da bactéria antagonista *P. Agglomerans* foi avaliada utilizando-se clones obtidos a partir de uma biblioteca de cDNA de *F. graminearum* crescido em meio de cultura BDA, construída no Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (CEBTEC/ ESALQ/ USP). Dos 1.282 unigenes gerados nesta biblioteca, 1.014 clones foram selecionados, entre eles, os clones acetil-CoA sintetase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) que foram utilizados como controle positivo. Os 1.014 clones selecionados foram impressos em membrana de náilon para macroarranjo, sendo representativos de todos os *contigs* e *singletons* gerados.

##### 4.2.3.1. Confecção das membranas de macroarranjos

As membranas de macroarranjo foram confeccionadas no *Brazilian Clone Collection Center*, da Universidade do Estado de São Paulo (UNESP), Jaboticabal, SP (<http://www.bcccenter.fcav.unesp.br>). Os 1.014 clones de *F. graminearum* foram transferidos

em triplicata para as membranas, formando um arranjo constituído por 3.042 pontos.

Os clones bacterianos oriundos das placas estoques (96 poços) foram transferidos para placas de 384 poços (Genetix), contendo meio de cultura CG *Cicle Grow* (Bio 101, Inc., Cat. 3000-142), suplementado com 1 % de ampicilina e 8 % de glicerol. As culturas foram incubadas a 37°C durante 18 horas. A seguir, as culturas foram “impressas” em uma membrana de náilon de alta densidade (22,5 x 22,5 cm<sup>2</sup>) PerForma II (Genetix) por meio de mecanismo robotizado (contendo 384 pinos). Foram produzidos seis microarranjos idênticos, cada um contendo 8 x 12 cm<sup>2</sup>. As membranas foram construídas a partir do arranjo em placas de 384 poços, cujos clones foram distribuídos em 24 colunas (1 a 24) e 16 linhas (A a P) das placas 384. (Figura 4.2). Cada número dentro do quadrante indica a placa de origem daquele clone assim, cada colônia bacteriana na membrana pôde ser identificada de acordo com sua placa (no. dentro do quadrante) e posição de origem (quadrante dentro da membrana).

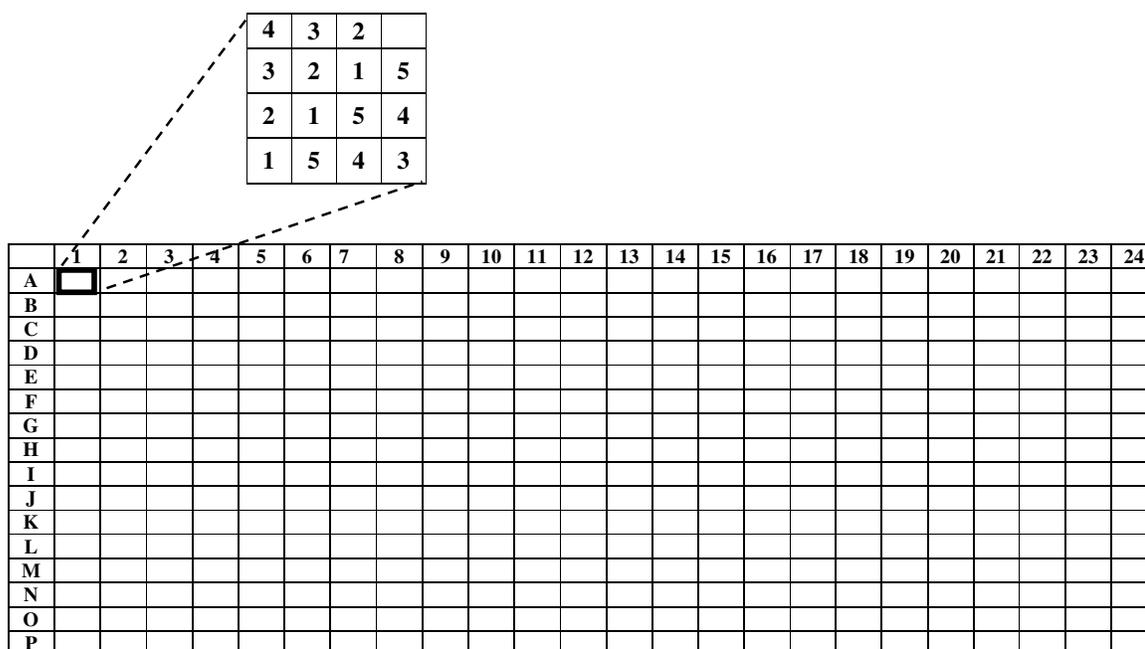


Figura 4.2 - Esquema da membrana utilizada para a construção dos macroarranjos. Cada quadrante contém 15 colônias bacterianas, em arranjos 4 x 4. Todas as colônias contidas neste quadrante (destacado) são oriundas da posição A1 de suas respectivas placas de origem. Os números representam a placa à qual cada clone pertence

Em seguida, as membranas de náilon foram umedecidas em meio CG, suplementado com 0,5 % de ampicilina, e depositadas sobre papel *Whatman* 3M previamente umedecido neste meio. Os 384 pinos do robô foram submersos por 3 segundos na placa de 384 poços contendo as culturas bacterianas e então foram transferidos cerca de 20 nL de cada cultura sobre a membrana. Cada clone foi impresso, a uma distância de 900 µm um do outro, para os seis campos do filtro de 22,5 x 22,5 cm<sup>2</sup>. Anteriormente a cada transferência das culturas bacterianas de cada placa, os pinos foram submetidos à lavagem automática (solução comercial de NaClO a 3 %, seguida de água Milli-Q esterilizada e etanol absoluto) e secos com jato de ar. Realizada a transferência de todos os clones, as membranas de náilon foram colocadas em uma placa *QTray* (Genetix) contendo meio CG semi-sólido suplementado com 1 % de ampicilina. As membranas foram invertidas e incubadas a 37°C durante 8 horas, para o crescimento das colônias bacterianas.

Após este período, as membranas foram colocadas sobre papel *Whatman* 3M umedecido em solução desnaturante (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M) à temperatura ambiente (T.A.) por 4 minutos. Em seguida, o papel *Whatman* 3 M foi substituído por outro papel, *Whatman* 3 M, também umedecido com solução desnaturante, e as membranas foram colocadas em uma placa de vidro e incubadas em banho-maria durante 4 minutos. As membranas foram então transferidas para um novo papel *Whatman* 3M umedecido em solução neutralizante (NaCl 1,5 M e TRIS 1 M pH 7,0), por 4 minutos. Finalmente, as membranas foram transferidas para um papel *Whatman* 3 M seco, por 4 minutos. Realizadas a desnaturação e neutralização, as membranas foram transferidas para uma solução de proteinase K (NaCl 5 M; TRIS-HCl 1 M pH 8,0; EDTA 0,5 M, pH 8,0; Sarcosil 10 x; Proteinase K 1,5 %) e incubadas a 37°C em agitador orbital, 50 rpm, durante 1 hora. As amostras de DNA plasmidial foram fixadas às membranas pela exposição à radiação

ultravioleta, 120.000 microjoules por cm<sup>2</sup>, durante 30 segundos, no aparelho *Ultraviolet Crosslinker* (CL-508).

#### 4.2.3.2. Normalização das membranas pela sonda plasmidial - *Overgo*

A normalização, ou seja, o ajustamento sistemático das diferenças na intensidade relativa de cada ponto (*spot*) que não representam diferenças reais, foi realizada pelo método *overgo*. Este método consiste na utilização de oligonucleotídeos como sonda para hibridização a um fragmento de 36 pares de bases (5'...GTG GTC CTG CAA CTT TAT CCG CCT CCA TCC AGT CTA...3') do gene "β-lactamase", que confere resistência à ampicilina às células transformadas. Como o plasmídeo pSPORT1 utilizado para a construção desta biblioteca de cDNA contém este gene, quando a sonda marcada com <sup>33</sup>P hibridiza nesta região do gene ocorre a emissão do sinal radioativo de cada plasmídeo. Na Figura 4.3 estão representados os oligonucleotídeos utilizados para a síntese da sonda. A região sombreada indica o local de complementaridade de bases à "β-lactamase".

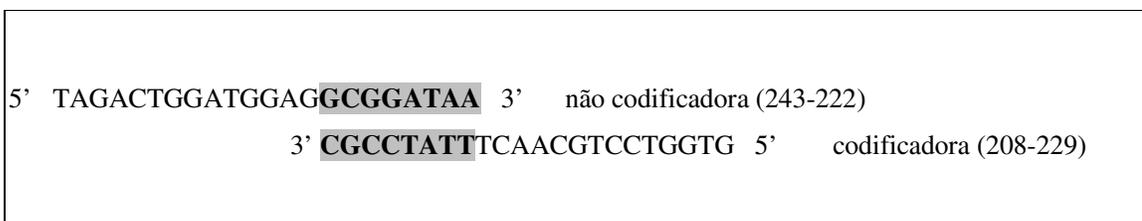


Figura 4.3 - Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na síntese da sonda plasmidial. Os oligos sintetizados se ligam por complementariedade de bases (região sombreada) no gene da β-lactamase presente no plasmídeo pSPORT1.

#### 4.2.3.3. Hibridização com a sonda plasmidial

Anteriormente à hibridização com a sonda plasmidial, as membranas contendo os clones foram colocadas em recipiente plástico hermeticamente fechado, permanecendo separadas por uma malha de filtro. A seguir, as membranas foram lavadas com solução

fervente de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,5 % por 5 minutos, sob agitação lenta, a fim de eliminar eventuais resíduos contaminantes (*background*). Em seguida, as membranas foram imersas em 100 mL de uma solução de pré-hibridização, constituída por 1 g de BSA; 200  $\mu$ L de EDTA 0,5 M pH 8,0; 7 g de SDS; 50 mL de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 M, e mantidas a 58°C em banho-maria *Maxi-shake* (HETO).

Paralelamente à pré-hibridização, foi preparada a sonda plasmidial. Para isso, o par de oligonucleotídeos usados como sonda plasmidial foi misturado em uma concentração final de 10  $\mu$ M para a reação de marcação com  $\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP (GE Healthcare). A suspensão de oligonucleotídeos foi primeiramente incubada a 80°C por 5 minutos, em seguida a 37°C por 10 minutos em bloco aquecedor (Boekel Scientific) e imediatamente transferida para gelo. A mistura de reação de marcação da sonda plasmidial com  $\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP foi preparada adicionando-se à suspensão de oligonucleotídeos 1  $\mu$ g de soro albumina bovina (BSA), 2  $\mu$ L de solução OLB [10 $\mu$ L de solução A (TRIS 1,25 M;  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM; 18 $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol; 15  $\mu$ L de d(ATG) 100  $\mu$ M); 25mL de solução B (Hepes-NaOH 2M); 15  $\mu$ L de solução C (TRIS 3 mM; EDTA 0,2 mM)]; 50 $\mu$ Ci de  $\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP e 2U de *Klenow* DNA polimerase I (Invitrogen). Esta mistura de reação foi ajustada para um volume final de 10  $\mu$ L com água Milli.Q esterilizada e incubada a T.A. durante 1 hora. Após ter sido realizada a reação de síntese e marcação da sonda plasmidial, o volume final da mistura de reação foi ajustado para 50  $\mu$ l e a sonda foi purificada em coluna *Sephadex* G-50 (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. A sonda purificada foi desnaturada a 94°C por 10 minutos e imediatamente transferida para gelo. Em seguida, a solução de pré-hibridização foi substituída pela solução de hibridização, de mesma composição, mas suplementada com a sonda plasmidial. As membranas foram incubadas na solução de hibridização durante 18 horas a 58°C, em banho-maria *Maxi-shake* (HETO), com agitação lenta (60 rpm). As membranas foram então lavadas duas vezes com SSC 2x (NaCl 1,8 % e ácido cítrico 1,5 %)

contendo SDS 0,1 %, por 15 minutos, à T.A., seguindo-se duas lavagens com SSC 1,5x e SDS 0,1 % por 15 minutos, a 58°C e uma com SSC 0,5x e SDS 0,1 % por 15 minutos, a 58°C

#### 4.2.3.4. Geração das imagens das membranas

As imagens das hibridizações dos macroarranjos foram obtidas após a exposição das membranas à placa de intensificação de imagem IP (*Imaging Plate* - Kodak), durante 72 horas. A revelação da IP (Kodak) foi realizada com o sistema de digitalização e análise de imagens STORM 860 (GE Healthcare). As imagens digitalizadas foram analisadas com o programa *ArrayVision* 8.0 (Copyright © Imaging Research Inc., 2003), que permite a modulação de diversos parâmetros e facilita a obtenção e análise do sinal emitido pelo *scanner*. O valor dos sinais da leitura foi corrigido pelo resíduo de fundo (*background*) e utilizados para a análise estatística. Após a revelação, a sonda foi removida das membranas lavando-as duas vezes com uma solução de NaOH 0,4 N e SDS 0,1 %, a 65°C, em banho-maria com agitador *Maxi-shake* (HETO) por 15 minutos, seguida por mais duas lavagens com TRIS 0,2 N; SDS 0,1 % e SSC 0,1x à T.A por 15 minutos. As membranas foram novamente expostas ao IP por 24 horas, para a completa remoção da sonda e armazenadas a 20°C para posterior hibridização com sondas específicas de *F. graminearum*.

#### 4.2.3.5. Extração do RNA total de *F. graminearum* e síntese da sonda de cDNA

A expressão diferencial de genes de *F. graminearum* foi obtida a partir de amostras do fungo cultivado *in vitro* na presença (Interação = FgI) ou ausência (Controle = FgC) da bactéria *P. agglomerans*. Discos de meio de cultura BDA de 5 mm de diâmetro e contendo *F. graminearum* foram transferidos individualmente para 48 placas de Petri contendo meio BDA ¼. As culturas foram então incubadas em câmara de crescimento a 28°C, fotoperíodo de 12 horas, por 4 dias. Após este período, 24 placas foram selecionadas

aleatoriamente e inoculadas com a bactéria *P. agglomerans* (tratamento FgI, Figura 4.4.a) e as demais placas contendo apenas *F. graminearum* foram utilizadas como controle (tratamento FgC, Figura 4.4a). Todas as culturas foram incubadas por mais 4 dias, nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo.

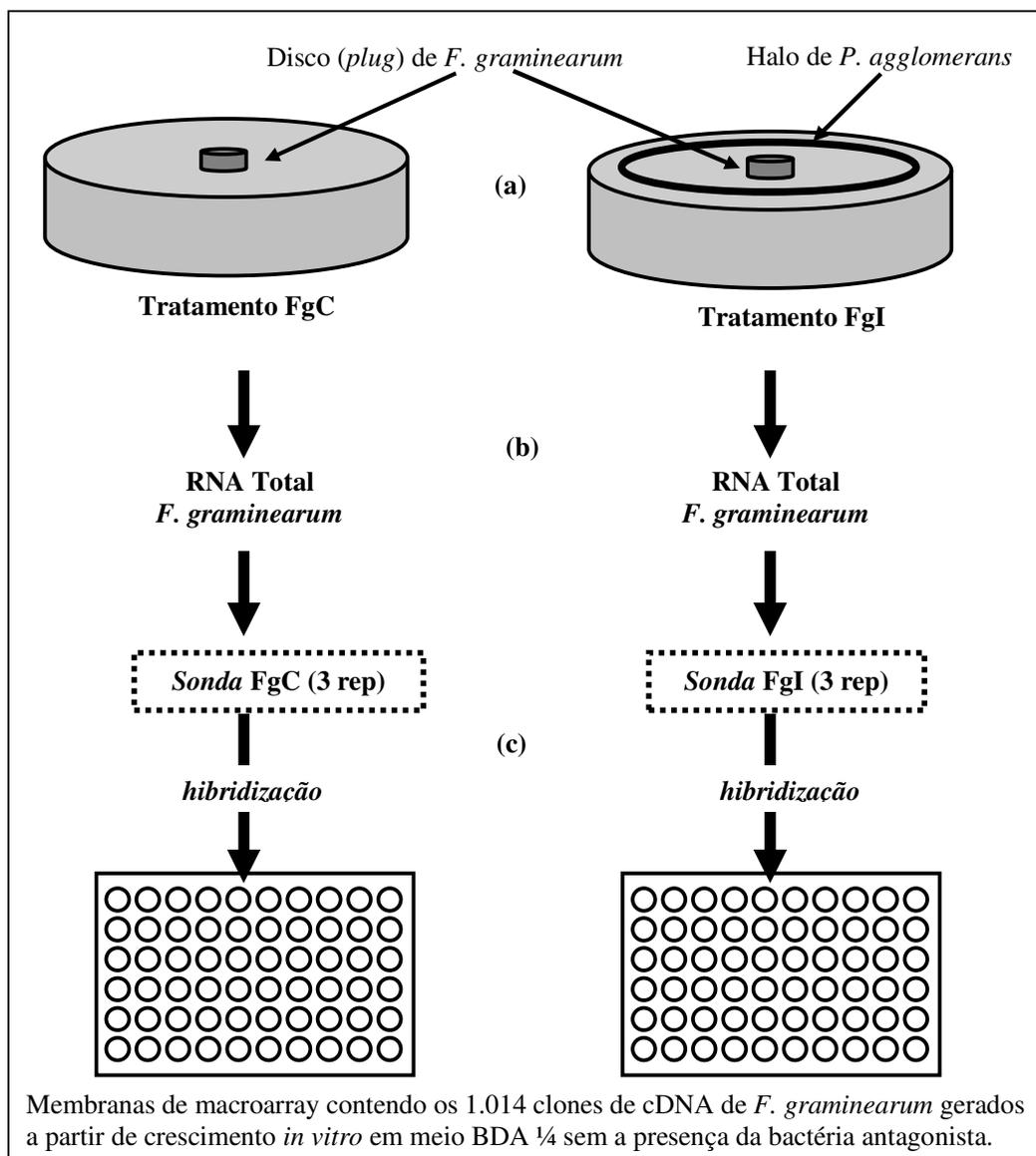


Figura 4.4 – Esquema da síntese da sonda de cDNA nos tratamentos FgC e FgI para hibridização nas membranas de macroarranjos

A massa micelial do fungo nos dois tratamentos: controle (FgC) e interação (FgI) foi coletada separadamente (Figura 4.4 b), macerada em N<sub>2</sub> líquido e submetida à extração do RNA total de acordo com o protocolo de Sokolovsky et al. (1990). Alíquotas de 400 µg do micélio foram ressuspensas em 750 µL de tampão de extração (NaCl 0,6 M; EDTA 10 mM; TRIS-HCl 100 mM, pH 8,0; SDS 4 %) e 750 µL de Fenol (saturado com TRIS-HCl, 0,1 M pH 8,0). Após agitação vigorosa por 15 segundos, as amostras foram centrifugadas a 10.600 x g (Eppendorf. 5.804-Rotor F45-30-11), à T.A. por 10 minutos. A fase superior foi transferida para um novo microtubo, onde se adicionou 0,75 volume de LiCl 8 M e a suspensão foi incubada durante uma noite a -20°C.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 10.600 x g, 4°C, por 10 minutos, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspendido em 300 µl de água-DEPC (água tratada com *diethylpyrocarbonate* 0.1 %), 1/10 do volume de NaOAc 3M pH 5,5 e 2,5 volumes de etanol absoluto (-20°C). Após permanecer a -70°C durante 1 hora, as amostras foram centrifugadas a 10.600 x g, 4°C, por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o RNA total foi precipitado em 1 mL de etanol 80 % (80 % de etanol absoluto:20 % água-DEPC). Após centrifugação a 10.600 x g, 4°C, por 5 minutos, o RNA sedimentado foi seco durante 10 minutos em estufa a 37°C e ressuspendido em 50 µL de água-DEPC. A concentração do RNA total foi determinada por espectrofotometria a 260 nm (1 OD<sub>260</sub> = 40µg de RNA mL<sup>-1</sup>) e a qualidade determinada através das razões A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> e A<sub>260</sub>/ A<sub>230nm</sub>. A integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (0,5 µg mL<sup>-1</sup>), para visualização das bandas de RNA (SAMBROOK et al., 1989), que foram fotografadas utilizando-se o software *1D Image Analysis Software* (Kodak Digital Science).

Para cada tratamento foram preparadas três sondas de cDNA para hibridização nos macroarranjos (Figura 4.4c). A síntese das sondas de cDNA foi realizada segundo metodologia adaptada descrita por Hervé et al. (1996). A reação de cada sonda foi iniciada

com 30 µg de RNA total em 6 µL de água-DEPC e 156 pmoles de oligo dT<sub>18V</sub>. O volume final foi ajustado para 7,5 µL com água-DEPC. As amostras foram incubadas durante 10 minutos em bloco aquecido a 75°C e imediatamente transferidas para o gelo. Em seguida, foram adicionados 5 µL de *First Strand Buffer 5x* (TRIS-HCl 250 mM pH8,3; KCl 375 mM; MgCl<sub>2</sub> 15 mM) (Invitrogen); 2,5 µL de ditioneitol (DTT) 100 mM (Invitrogen); 40 U de *RNaseOUT* (Invitrogen); 2µL de d(ATG) (10mM cada), e 500 µCi de α<sup>33</sup>P-dCTP (GE Healthcare). A mistura de reação foi incubada durante 5 minutos a 42°C, e então adicionou-se 260 U de *SuperScript™ II RT* (Invitrogen), seguindo-se pela incubação a 42°C por mais 20 minutos. A seguir, foram adicionados 1,25 µL de dCTP (10mM) à mistura de reação, que foi mantida por mais 1 hora a 42°C, quando então foram adicionados 2 µg de *polyadenylic acid Poly-A* (GE Healthcare). A suspensão foi desnaturada a 94°C por 5 minutos, seguida de adição de 1,12 µL de NaOH 4 M e incubação a 37°C por 15 minutos. Por fim, foram adicionados 1,8 µL de HCl 4 M e 7 µL de TRIS-HCl 1 M pH 7,5 e o volume final foi ajustado para 50 µL com água Milli-Q esterilizada. As sondas foram purificadas em coluna *Sephadex G-50* (GE Healthcare) e imediatamente utilizadas para hibridização das membranas.

#### **4.2.3.6. Hibridização dos macroarranjos com as sondas FgC e FgI**

As seis membranas (3 para cada tratamento) foram colocadas em tubos individuais (20 cm x 3,5 cm) de hibridização (Wheaton) contendo 10 mL de solução de pré-hibridização, que consistiu de 2,5 mL de SSC 20x pH 7,0, 0,2 mL de TRIS-HCl 1 M pH 7,5; 5 mL de formamida deionizada (Gibco-BRL), 1 mL de *Denhardt's* 100 x (Invitrogen); 1 mL de SDS 10 % e 0,1 mL de esperma de salmão (10 mg/ mL) previamente desnaturado a 94°C por 10 minutos. As membranas permaneceram durante 2 horas nesta solução a 42°C, Após este período, a solução de pré-hibridização de cada tubo foi substituída por 5 mL de solução de hibridização, pré-aquecida a 42°C e preparada com 1,25 mL de SSC 20 x pH 7,0; 0,1 mL de

TRIS-HCl 1 M pH 7,5; 2,5 mL de formamida deionizada (Gibco-BRL); 0,1 mL de *Denhardt's* 100 x; 0,5 mL de SDS 10 % e 0,5 mL de sulfato de dextrano 50 % (GE Healthcare). Foram adicionados 0,1 mL de esperma de salmão (10 mg/ mL), previamente desnaturado a 94°C por 10 minutos, e também a sonda de cDNA, previamente desnaturada a 94°C por 3 minutos. As membranas permaneceram durante 18 horas nesta solução de hibridização, a 42°C. As etapas de lavagem e obtenção das imagens foram realizadas como descrito nos itens 4.2.3.3 e 4.2.3.4, respectivamente.

#### 4.2.3.7. Normalização dos dados e análise estatística

Os valores numéricos correspondentes às leituras dos sinais de hibridização foram analisados usando o modelo em dois estágios proposto por Wolfinger et al. (2001). No primeiro estágio, os dados de expressão gênica foram ajustados para o modelo de normalização com a correção para os efeitos a eles associados (membrana, tratamento e gene), utilizando o método de análise de variância (ANOVA) e o modelo de efeitos fixos (KERR; CHURCHILL, 2000, 2001; KERR et al., 2002). No segundo estágio, os resíduos gerados no modelo de normalização foram ajustados segundo o modelo gene-específico. Assim, em um primeiro estágio foi ajustado o modelo de normalização dos dados:

$$y_{ijklm} = \mu + G_i + T_j + M_k + Q_{(k)l} + r_{ijklm} \quad (1)$$

Em que:

$y_{ijklm}$  é o  $\log_2$  na da intensidade de sinal (expressão gênica);  $\mu$  é uma constante associada a cada observação;  $G_i$  é o efeito do gene  $i$  ( $i = 1, \dots, 4.534$ );  $T_j$  é o efeito do tratamento  $j$  ( $j = 1, \dots, 5$ );  $M_k$  é o efeito aleatório da membrana  $k$  ( $k = 1, \dots, 15$ );  $Q_{(k)l}$  é o efeito do quadrante  $l$  ( $l = 1, \dots, 384$ ) dentro da membrana  $k$ ,  $r_{ijklm}$  é o erro aleatório associado a cada

observação. O efeito  $Q_{(k)l}$  foi incluído para permitir o ajuste para efeito espacial na membrana. Neste modelo assume-se que  $M_k$ ,  $Q_{(k)l}$  e  $r_{ijklm}$  são iid  $N(0, \sigma_k^2)$ ,  $N(0, \sigma_Q^2)$ ,  $N(0, \sigma_r^2)$  respectivamente e que ambos são independentes um do outro.

Em um segundo estágio, um modelo de efeitos gene-específico foi ajustado a partir dos resíduos obtidos pelo ajuste do modelo de normalização:

$$r_{gijk} = G_g + T_{(g)i} + M_{(gi)j} + e_{gijk} \quad (2)$$

$r_{gijk}$  é o resíduo do modelo de normalização;  $G_g$  é o efeito médio do gene g;  $T_{(g)i}$  é o efeito do tratamento i dentro do gene g;  $M_{(gi)j}$  é o efeito da membrana j dentro do tratamento i e gene g e,  $e_{gijk}$  erro aleatório associado a cada observação. Neste modelo assume-se que  $M_k$  e  $e_{ijklm}$  são iid  $N(0, \sigma_Q^2)$ ,  $N(0, \sigma_e^2)$  respectivamente e que  $M_k$  e  $e_{ijklm}$  são independentes entre si. Os dados foram submetidos à análise estatística, utilizando o teste t ao nível de 5 % de probabilidade.

#### 4.2.4. Validação dos dados do macroarranjo por RT-PCRq

Os dados obtidos pelos macroarranjos foram validados pela transcrição reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq), que é um método rápido e sensível para a quantificação dos produtos na fase exponencial da reação. Anteriormente às reações de RT-PCRq, as condições de amplificação foram estabelecidas e otimizadas em PCR convencional.

#### 4.2.4.1. Seleção dos genes e obtenção dos *primers*

Dos 29 unigenes diferencialmente expressos, a 5 % de significância ( $\alpha=0,05$ ) no experimento de hibridização dos macroarranjos, foram selecionados 8 unigenes para validação por RT-PCR: 5 genes super-expressos, 2 genes reprimidos e o gene gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), utilizado como controle.

As seqüências dos RNAm dos respectivos unigenes foram utilizadas para a síntese dos *primers* da reação de amplificação. Através do banco *Gene*, do *GenBank*, foi possível obter a seqüência precisa dos pares de bases, assim como a posição dos íntrons e dos éxons das seqüências de nucleotídeos dos genes selecionados.

Os *primers* específicos para cada uma dessas seqüências foram desenhados utilizando o programa *Primer3* (ROZEN; SKALETSKY, 2000; [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). Os *primers* sugeridos por este programa foram confirmados parrear em exons diferentes de cada gene, para garantir que somente o cDNA fosse amplificado na reação de PCR.

Por fim, os *primers* foram validados pelo programa *NetPrimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>) e submetidos ao *GenBank* pelo *Blast short* (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) para assegurar que cada seqüência de *primer* era única para o gene alvo. Na Tabela 4.2 estão listados os genes selecionados para validação, a seqüência dos pares de *primers*, bem como tamanho dos respectivos produtos amplificados.

Tabela 4.2 - Relação dos genes, *primers* e tamanho em pares de bases (pb) dos fragmentos amplificados por PCR comum, para posterior amplificação em RT-PCRq de *F. graminearum*.

| <b>Genes</b>                                       | <b>Seqüência do primer</b>                                     | <b>Produto</b> |
|--|--|----------------|
| <b>Genes induzidos (<i>super-expressos</i>)</b>    |  |                |
| Fg 02321: 6-hidroxi-d-nicotina-oxidase             | F-5' CAAGTTCACGAGCGACACC- 3'<br>R- 5' GCTTCCACACCATCAACCA- 3'  | 240 pb         |
| Fg 02326: esterigmatocistina-7-O-metil transferase | F-5' CCAAAGCAGCCCACGAAG- 3'<br>R-5' GGAACCATCAAGCGGAATGT- 3'   | 176 pb         |
| Fg 02327: monoxigenase contendo flavina            | F-5' AGGTCTCTGGCATTGAGG- 3'<br>R-5' GGAAGGGAAAGTCTGTGAA- 3'    | 102 pb         |
| Fg 09374: repressor do ciclo do glioxilato         | F-5' GCTTTCGCTCTCACCCTTT- 3'<br>R-5' AACAGCCATTTCCCACATTC- 3'  | 141 pb         |
| Fg 02323: proteína hipotética                      | F-5' ACAGATGCCGAGTGTCGTAG- 3'<br>R-5' GATGTGACGGAGTGAAAGCA- 3' | 165 pb         |
| <b>Genes reprimidos</b>                            |  |                |
| Fg 01470: proteína do tipo dedo de zinco           | F-5' GGGACAAGAGACACGAAAGG-3'<br>R-5' GACACGGAAGGGGAATGAG- 3'   | 109 pb         |
| Fg 05133: proteína do tipo "DNAJ"                  | F-5' GACCTCTTCTCTGACCCTTG- 3'<br>R-5' TTGGCGACCTCCCTCTACTT- 3' | 200 pb         |
| <b>Gene controle</b>                               |  |                |
| GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase       | F-5' ACCACCGTCCACTCCTACAC- 3'<br>R-5' GGCGAACAGTCAAGTCAACA- 3' | 220 pb         |

#### 4.2.4.2. Síntese de cDNA fita simples

Para a síntese do cDNA fita simples foi utilizado o RNA total isolado da massa micelial de *F. graminearum* nos tratamentos interação (FgI) e controle (FgC), conforme descrito no item 4.2.3.5.

A conversão do RNA total em cDNA fita simples foi realizada com o Kit *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)*. Partiu-se de 5 µg de RNA total ressuspendido em 8 µL de água Milli.Q. À esta suspensão foram adicionados 1µL de *primer* oligo-dT (0,5 µg/ µL) e 1 µL de dNTP mix (10 mM cada). A mistura de reação foi incubada a 65° C por 5 minutos e imediatamente transferida para o gelo. Em seguida, foram adicionados 2 µL de *RT Buffer* 10 x (TRIS-HCl 200 mM pH 8,4; KCl 500 mM); 4 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 2 µL de DTT 0,1 M e 40 U de *RNase out*. O volume desta suspensão foi

ajustado para 20  $\mu\text{L}$  e a mistura de reação foi incubada a 42° C por 2 minutos. A seguir, foram adicionados 50 U da enzima *SuperScript II RT* (Invitrogen) e a transcrição reversa foi realizada a 42°C durante 50 minutos. A reação de transcrição foi inativada por incubação a 70°C durante 20 minutos. O RNA molde da molécula híbrida cDNA/ RNA foi removido pela adição de 2 U de *RNase H* com incubação a 37°C por 20 minutos.

#### 4.2.4.3. PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-PCRq)

A etapa de quantificação por RT-PCRq foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Animal, do Depto. de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/ USP).

As reações de amplificação foram realizadas no equipamento *Light Cycler* (Roche), com a utilização do fluoróforo *SYBR-green*. Para cada reação foi preparada uma mistura de reação contendo 0,4  $\mu\text{L}$  (10 pmoles/  $\mu\text{L}$ ) de dNTP *mix*; 1,25  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM; 0,25  $\mu\text{L}$  de BSA (20 mg/ mL); 0,8  $\mu\text{L}$  (2 pmoles/  $\mu\text{L}$ ) de cada *primer* direto e reverso; 4  $\mu\text{L}$  de *Sybr Green 5 x* (25  $\mu\text{L}$  de *buffer* de diluição de *Syber*; 6.25  $\mu\text{L}$  de *Dimethyl sulfoxide* - DMSO; 0,5 $\mu\text{L}$  de *Syber 100 x* e 18,25  $\mu\text{L}$  de água Milli.Q esterilizada) e 1,5 U de *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). O volume foi ajustado para 19  $\mu\text{L}$  com água-Milli-Q e, por último, foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de cDNA fita simples (125 ng/  $\mu\text{L}$ ). O volume final (20  $\mu\text{L}$ ) foi transferido para os capilares e estes foram colocados no equipamento de PCR *LightCycler* (Roche). Todas as reações foram estabelecidas a uma temperatura de pré-incubação de 95°C por 10 minutos, desnaturação a 95° C por 10 segundos, por 40 ciclos em que as condições de pareamento e extensão foram determinadas de acordo com o *primer* testado (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Condições de pareamento e extensão das reações de RT-PCRq (*LightCycler*) para os 7 genes diferencialmente expressos (5 super-expressos e 2 reprimidos) e para o gene usado como referência (GAPDH) de *F. graminearum* nos tratamentos interação (FgI), controle (FgC).

| Gene            | Pareamento | Extensão | Curva de dissociação ( <i>melting</i> ) |
|-----------------|------------|----------|---|
| <i>Fg 02321</i> | 60°C/ 5 s  | 10/18s   | 70°C                                    |
| <i>Fg 02326</i> | 62°C/ 5s   | 7/ 18s   | 72°C                                    |
| <i>Fg 02327</i> | 59°C/ 5s   | 4/ 18s   | 69°C                                    |
| <i>Fg 09374</i> | 55°C/ 5s   | 6/18s    | 65°C                                    |
| <i>Fg 02323</i> | 55°C/ 5s   | 7/18s    | 65°C                                    |
| <i>Fg 01470</i> | 60°C/5s    | 5/18s    | 70°C                                    |
| <i>Fg 05133</i> | 60°C/5s    | 8/18s    | 70°C                                    |
| <i>GAPDH</i>    | 60°C/5s    | 9/18s    | 70°C                                    |

Foram realizadas duas repetições para cada reação de amplificação (par de *primers* + cDNA) e controle negativo (água em substituição ao cDNA). A especificidade dos *primers* foi avaliada pela visualização dos produtos amplificados em gel de agarose 1,2 %. O método escolhido para quantificação dos resultados foi o de quantificação relativa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  proposto por Livak; Schmittgen (2001), o qual envolve a quantificação do gene de interesse em relação a um gene controle “constitutivo”, que neste estudo foi o GAPDH. Para este tipo de quantificação, o valor médio obtido do ciclo limite (*Ct*, *cycle threshold*) de cada amostra é utilizado para se determinar o  $\Delta Ct$  (*Ct* alvo – *Ct* GAPDH). A quantificação relativa é obtida através do cálculo da  $\Delta\Delta Ct$  ( $\Delta Ct$  FgI -  $\Delta Ct$  FgC), obtendo-se assim, a razão de expressão um gene em relação ao outro (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1. Análise do antagonismo da bactéria *P. agglomerans* frente ao fungo *F. graminearum*

Dois isolados da bactéria *P. agglomerans* (9789.TL.31A e 1494.4.2A) foram testados *in vitro* para verificar a eficiência de antagonismo contra o fitopatógeno *F.*

*graminearum*. Os resultados do crescimento do fungo, avaliado no sexto dia de incubação na presença ou ausência dos isolados da bactéria, estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Crescimento radial do fitopatógeno *F. graminearum* na ausência (controle) e presença de dois isolados da bactéria *P. agglomerans*: 9789.TL.31A (Tratamento A) e 1494.4.2A (Tratamento B).

| Pré-incubação com<br><i>P. agglomerans</i> | Crescimento do <i>F. graminearum</i> (cm) |             |             |       |
|--|---|-------------|-------------|-------|
|  | Repetição 1                               | Repetição 2 | Repetição 3 | MÉDIA |
| <b>24 horas</b>                            |   |             |             |       |
| Controle                                   | 3,29                                      | 3,46        | 2,84        | 3,20  |
| Tratamento A                               | 0,41                                      | 0,56        | 0,78        | 0,46  |
| Tratamento B                               | 0,53                                      | 0,80        | 0,78        | 0,70  |
| <b>48 horas</b>                            |   |             |             |       |
| Controle                                   | 3,61                                      | 3,40        | 3,90        | 3,64  |
| Tratamento A                               | 0,56                                      | 0,22        | 0,23        | 0,34  |
| Tratamento B                               | 0,24                                      | 0,25        | 0,23        | 0,24  |

Os dados de crescimento do fungo, medido em centímetros, foram submetidos à análise estatística pelo teste de Duncan ( $p=0,05$ ). Não foram detectadas diferenças significativas para o crescimento de *F. graminearum* entre os tratamentos de 24 e 48 horas de pré-incubação com *P. agglomerans*. Além disso, dentro de cada um dos dois tempos de pré-incubação os isolados 9789.TL.31A e 1494.4.2A inibiram de modo semelhante o crescimento do fungo, como indicado pelo resultado de ausência de diferenças significativas entre os tratamentos A e B (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 – Médias do crescimento de *F. graminearum* na ausência (controle) e presença de *P. agglomerans*, isolados 9789.TL.31A (Tratamento A) e 1494.4.2A (Tratamento B), após 24 e 48 horas de pré-incubação com a bactéria.

| Pré-Incubação   | Controle             | Tratamento A         | Tratamento B         | Média               |
|-----------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| <b>24 horas</b> | 3.1967 <sup>Ab</sup> | 0.4633 <sup>Ba</sup> | 0.7033 <sup>Ba</sup> | 1.4544 <sup>a</sup> |
| <b>48 horas</b> | 3.6367 <sup>Ab</sup> | 0.3367 <sup>Ba</sup> | 0.2400 <sup>Ba</sup> | 1.4044 <sup>a</sup> |
| <b>Média</b>    | 3.4167 <sup>A</sup>  | 0.4000 <sup>B</sup>  | 0.4717 <sup>B</sup>  |                     |

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, nas colunas, e minúsculas, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P=0,05$ ).

Entretanto, as diferenças de resposta de crescimento do fungo foram altamente significativas entre a presença de qualquer dos isolados de *P. agglomerans* (tratamentos A e B) e a ausência da bactéria no meio de cultura (controle). Os resultados demonstraram alta inibição do crescimento do fungo quando em contato com os isolados antagonistas 9789.TL.31A e 1494.4.2A. Em avaliação visual, foi bastante óbvio o maior crescimento de *F. graminearum* no centro das placas de Petri contendo meio de cultura sem *P. agglomerans* (controle) (Figura 4.5a), comparando-se com os tratamentos de pré-incubação (24 ou 48 horas) com a bactéria (Figura 4.5b).

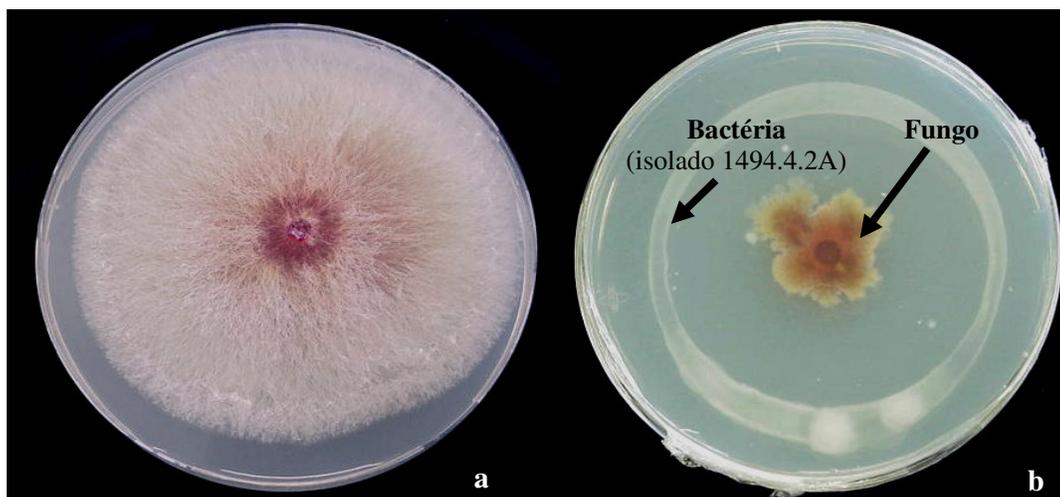


Figura 4.5 – Ilustração do teste de antagonismo *in vitro* de *P. agglomerans* contra *F. graminearum*: a) placa contendo somente o fungo *F. graminearum* (controle) e b) Isolado 9789.TL.31A da bactéria *P. agglomerans* (circunferência), pré incubada 24 horas antes da inoculação do fungo (centro).

Embora não tenham sido detectadas diferenças significativas na eficiência de antagonismo entre os dois isolados de *P. agglomerans*, o isolado 1494.4.2A foi escolhido para a continuidade dos experimentos e análises, uma vez que sua propriedade antagonista já foi confirmada e patenteada (Embr. 1494, acesso ATCC PTA 3460).

No experimento visando avaliar a necessidade da presença da bactéria *P. agglomerans* no meio de cultura para manter o efeito de antagonismo contra *F.*

*graminearum*, foi observado que o crescimento do fungo deixou de ser inibido após a retirada da porção do meio contendo a bactéria. Por outro lado, nas placas onde a cultura da bactéria foi mantida até o final do experimento (6 dias de incubação a 28°C) foi observada a inibição total do crescimento do fungo (Figura 4.6).

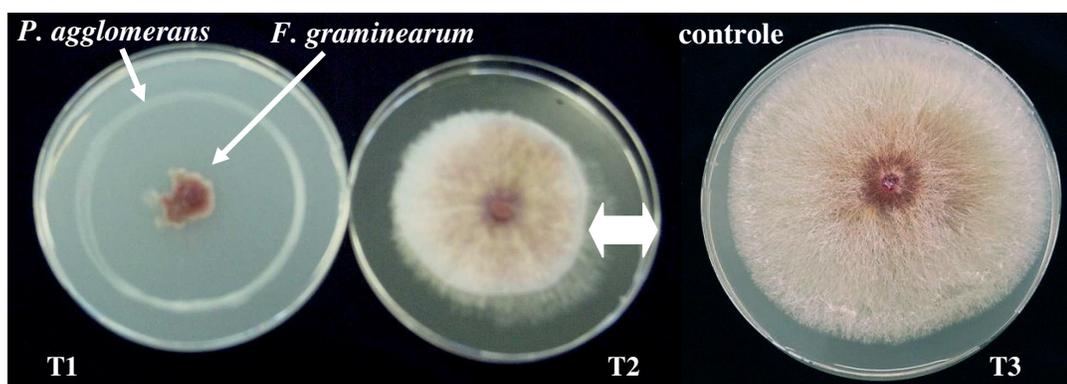


Figura 4.6 - Resultado do teste *in vitro* para verificar se há necessidade da presença de *P. agglomerans* no meio de cultura para continuar manter o antagonismo contra o fungo *F. graminearum*. T1) placa com a bactéria + fungo; T2) crescimento do fungo após 2 dias da retirada da bactéria do meio (seta larga) e T3) placa somente com fungo (controle).

Estes resultados mostram a necessidade de se manter a *P. agglomerans* no meio de cultura para que ocorra antagonismo contra *F. graminearum*. Segundo Gray (1997) estudos *in vitro* têm revelado que uma grande variedade de sinalizadores, incluindo o estado nutricional e a densidade populacional da bactéria são fundamentais para a indução de compostos frente a alguma condição de estresse.

Em muitas bactérias, o mecanismo de sinalização celular é realizado através da secreção de moléculas sinais. Estas são detectadas por receptores específicos, permitindo assim que cada célula bacteriana “determine” o tamanho de sua população. Quando um nível populacional crítico é atingido, as moléculas sinalizadoras passam a agir em grupo (“*quorum*”), como um único organismo multicelular (RUMJANEK; FONSECA; XAVIER, 2004). O acúmulo destes sinais funciona como indutor na transcrição de genes envolvidos na

síntese de substâncias antagonistas, reduzindo as chances de aparecimento de formas de resistência do patógeno (HU et al., 2003; RUMJANEK; FONSECA; XAVIER, 2004). Este sistema tem sido relatado em algumas espécies dos gêneros *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Ralstoni*, entre outras (HU et al., 2003; TELFORD et al., 1998).

#### 4.3.2. Análise qualitativa dos produtos secundários produzidos por *P. agglomerans* no antagonismo contra alguns fungos fitopatogênicos

Após constatar a capacidade da bactéria *P. agglomerans* inibir o crescimento do fungo *F. graminearum*, foi testado se o processo de inibição ocorria somente em função da liberação de componentes solúveis no meio ou se a inibição também era devida à produção de compostos voláteis. Além disso, foi verificado se, além do fungo *F. graminearum*, o efeito antagonista de *P. agglomerans* também era eficaz contra o crescimento de outros dois fitopatógenos que causam duas das principais manchas foliares do trigo: a mancha amarela da folha, causada por *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoem e a mancha marrom, causada pela por *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorok.) (REIS, 1994).

Os resultados do teste de inibição por compostos solúveis no meio de cultura, produzidos por *P. agglomerans*, mostraram uma redução de mais de 50 % do crescimento de todos os fungos testados (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 – Antagonismo resultante da produção de compostos solúveis por *P. agglomerans* em meio de cultura. Medida dos diâmetros (cm) do crescimento dos fungos *D. tritici-repentis*, *B. sorokiniana* e *F. graminearum* na ausência (controle) e presença da bactéria.

| Tratamentos | <i>D. tritici-repentis</i> <sup>1</sup> <i>B. sorokiniana</i> <sup>2</sup> <i>F. graminearum</i> <sup>3</sup> |        |        | inibição (%) |
|-------------|---|--------|--------|--------------|
|             | Diâmetro do crescimento do fungo (cm)   |        |        |              |
| Controle    | 8,40 a  | 8,50 a | 8,30 a | 46           |
| Antagonismo | 4,60 b  | 3,84 b | 4,28 b | 54           |
| Diferença   | 3,80  | 4,66   | 4,04   | 52           |

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p=5 %); <sup>1</sup>CV: 12,46; DMS: 0,987; <sup>2</sup>CV: 20,18; DMS: 1,527; <sup>3</sup>CV: 15,60; DMS: 1,281

Da mesma forma, foi verificado que o processo de inibição também é favorecido pela produção de compostos voláteis por esta bactéria. A ação destes componentes sobre os fungos testados foi capaz de inibir em mais de 40 % o crescimento destes fitopatógenos (Tabela 4.7). A Figura 4.7 ilustra a eficiência da ação antagonista *in vitro*, resultante de compostos sóveis e voláteis. .

Tabela 4.7 – Antagonismo resultante da produção de compostos voláteis por *P. agglomerans* em meio de cultura. Medida dos diâmetros (cm) de crescimento dos fungos *D.tritici-repentis*, *B.sorokiniana* e *F. graminearum* na ausência (controle) e presença da bactéria.

|                    | <i>D. tritici-repentis</i> <sup>1</sup>      | <i>B. sorokiniana</i> <sup>2</sup> | <i>F. graminearum</i> <sup>3</sup> | Inibição   |
|--------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|------------|
| <b>Tratamentos</b> | <b>Diâmetro do crescimento do fungo (cm)</b> |                                    |                                    | <b>(%)</b> |
| Controle           | 8,68 a                                       | 8,59 a                             | 8,70 a                             | 41,47      |
| Antagonismo        | 3,60 b                                       | 3,55 b                             | 3,20 b                             | 41,33      |
| <b>Diferença</b>   | 5,08   | 5,04                               | 5,50                               | 36,78      |

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p=5 %) <sup>1</sup>CV: 14,50; DMS: 1,34; <sup>2</sup>CV: 18,32; DMS: 1,27; <sup>3</sup>CV: 16,21; DMS: 1,58

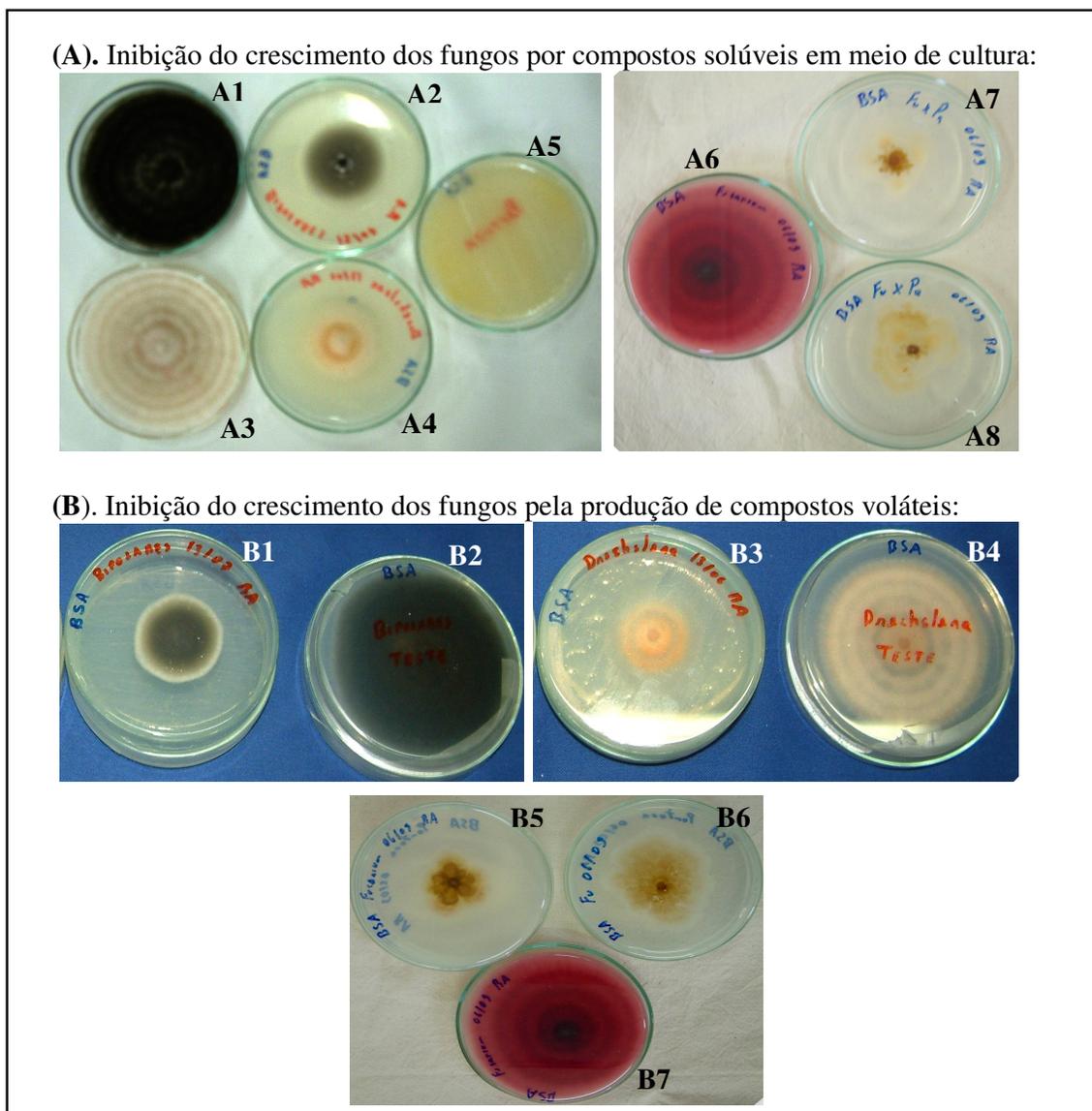


Figura 4.7 - Teste de antagonismo pela bactéria *P. agglomerans* frente aos fungos fitopatogênicos. (A) Inibição pela liberação de compostos solúveis: A1, *B. sorokiniana* (controle); A2) *B. sorokiniana* + *P. agglomerans*; A3) *D. tritici-epentis* (controle); A4) *D. tritici-epentis* + *P. agglomerans*; A5) *P. agglomerans* (controle); A6) *F. graminearum* (controle); A7 e A8) *F. graminearum* + *P. agglomerans*. (B) Inibição pela liberação de compostos voláteis: B1) *B. sorokiniana* + *P. agglomerans*; B2) *B. sorokiniana* (controle); B3) *D. tritici-epentis* + *P. agglomerans*; B4) *D. tritici-epentis* (controle); B5 e B6) *F. graminearum* + *P. agglomerans*; B7) *F. graminearum* (controle).

Os resultados do teste de antagonismo mostraram-se promissores, uma vez que houve efeito sobre todos os fungos testados, com a indicação de que a inibição está associada a compostos produzidos pela bactéria, tanto solúveis como voláteis no meio de cultura. Estes resultados mostraram que o efeito de antagonismo não requer contato físico entre a bactéria e

os fungos. Por outro lado, o efeito antagônico desaparece com a retirada da cultura de *P. agglomerans*. Portanto, o antagonismo parece ser dependente de uma produção continuada de compostos pela bactéria. Também deveria ser aqui considerada a hipótese de que a inibição possa ter sido uma consequência da carência de nutrientes no meio devido à competição estabelecida pelos microrganismos. Esta suposição torna-se menos consistente se considerarmos que a inibição é estabelecida num período curto de tempo, quando os nutrientes ainda estão disponíveis no meio.

Segundo Gregoletti Jr., Santos e Auer (2004) os testes de seleção de microrganismos com potencial antagonista podem ser realizados *in vitro* e *in vivo* e ambos os métodos são complementares. Os métodos *in vitro*, além de serem práticos, servem como uma seleção preliminar para avaliar a capacidade antagonista, verificar o comportamento do microrganismo com relação à sua capacidade de adaptação, crescimento etc. Estudos bem sucedidos envolvendo a interação *in vitro* e *in situ* de microrganismos no controle de diversos fungos e bactérias fitopatogênicos têm sido relatados (LINHARES; MATSUMURA; LUZ, 1995; LUZ, 1990a, 1990b; SANTOS; MATSUMURA; LUZ, 1991). De modo semelhante a outros antagonistas, *P. agglomerans* tem sido reportada como eficaz no controle de fitopatógenos como *Erwinia amylovora*, *Penicillium expansum*, *Xanthomonas campestris*, *Fusarium* spp, entre outros (BEER et al., 1987; NICHOLSON et al., 1990; NUNES et al., 2000; THIND; JINDAL, 1988; WODZINSKI et al., 1990; WRIGHT, et al., 2001).

Como o controle biológico não se restringe apenas a doenças do fitoplano, mas também àquelas da espermosfera, rizosfera e a patógenos pós-colheita (GRIGOLETTI Jr; SANTOS; AUER, 2004), uma estratégia que tem mostrado ser promissora no controle de muitas espécies fitopatogênicas é a utilização de agentes microbianos na microbiolização de sementes, cujo efeito pode ser, muitas vezes, superior ao tratamento químico com fungicidas (GRIGOLETTI Jr; SANTOS; AUER, 2004; LUZ, 1998, 2003).

Com o objetivo de avaliar o efeito de tratamento de sementes de trigo com rizobactérias sobre o controle de fitopatógenos de trigo e crescimento de plantas, foi verificado que dentre os 8 biotipos de bactérias testados, *P. agglomerans* e *Pseudomonas putida*, apresentaram os melhores resultados (LUZ, 2001c). A eficiência do uso da bactéria *P. agglomerans* como um bioprotetor na pulverização sobre espigas de trigo ou de cevada durante seu florescimento, também foi comprovada como forma de controle de alguns fungos fitopatogênicos destas culturas, cuja patente foi registrada em 2003, por Wilmar C. da Luz, pesquisador da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS (registro no. Embr. 1494 ATCC PTA).

Entretanto, ainda são necessários estudos de caracterização molecular e bioquímica de componentes envolvidos nestes processos, para que possam ser utilizados como mais uma alternativa no controle de fitopatógenos. Similarmente, estes microrganismos podem ser utilizados como fontes de compostos importantes de interesse biotecnológico, principalmente na utilização de enzimas e metabólitos secundários na formulação de substâncias antifúngicas ou antimicrobianas (AZEVEDO et al., 2000).

#### **4.3.3. Confirmação da classificação taxonômica do isolado *P. agglomerans* 1494.4.2A pela análise do gene rDNA 16S**

A análise do gene rDNA 16S por sequenciamento vem sendo muito utilizada para estudos de diversidade filogenética e taxonômica de isolados bacterianos. Este gene possui regiões altamente conservadas, até mesmo entre os táxons Bactéria, Archaea e Eucaria, assim como regiões que variam dentro do mesmo grupo taxonômico. Esta propriedade permite inferir sobre a identificação e classificação de microrganismos em diferentes níveis taxonômicos (LIESACK et al., 1997).

A escolha desta técnica dentro do presente trabalho baseou-se na rapidez, facilidade, necessidade de poucos *primers* e por permitir que os produtos sejam diretamente

seqüenciados (WEISBURG et al. 1991). A amplificação via PCR resultou em um fragmento de 1.500 pb, que era o tamanho esperado para o gene 16S rDNA (Figura 4.8).

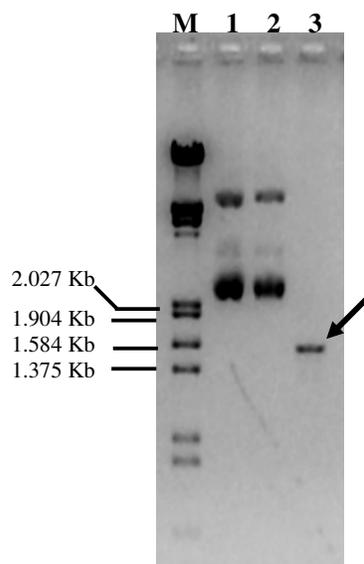


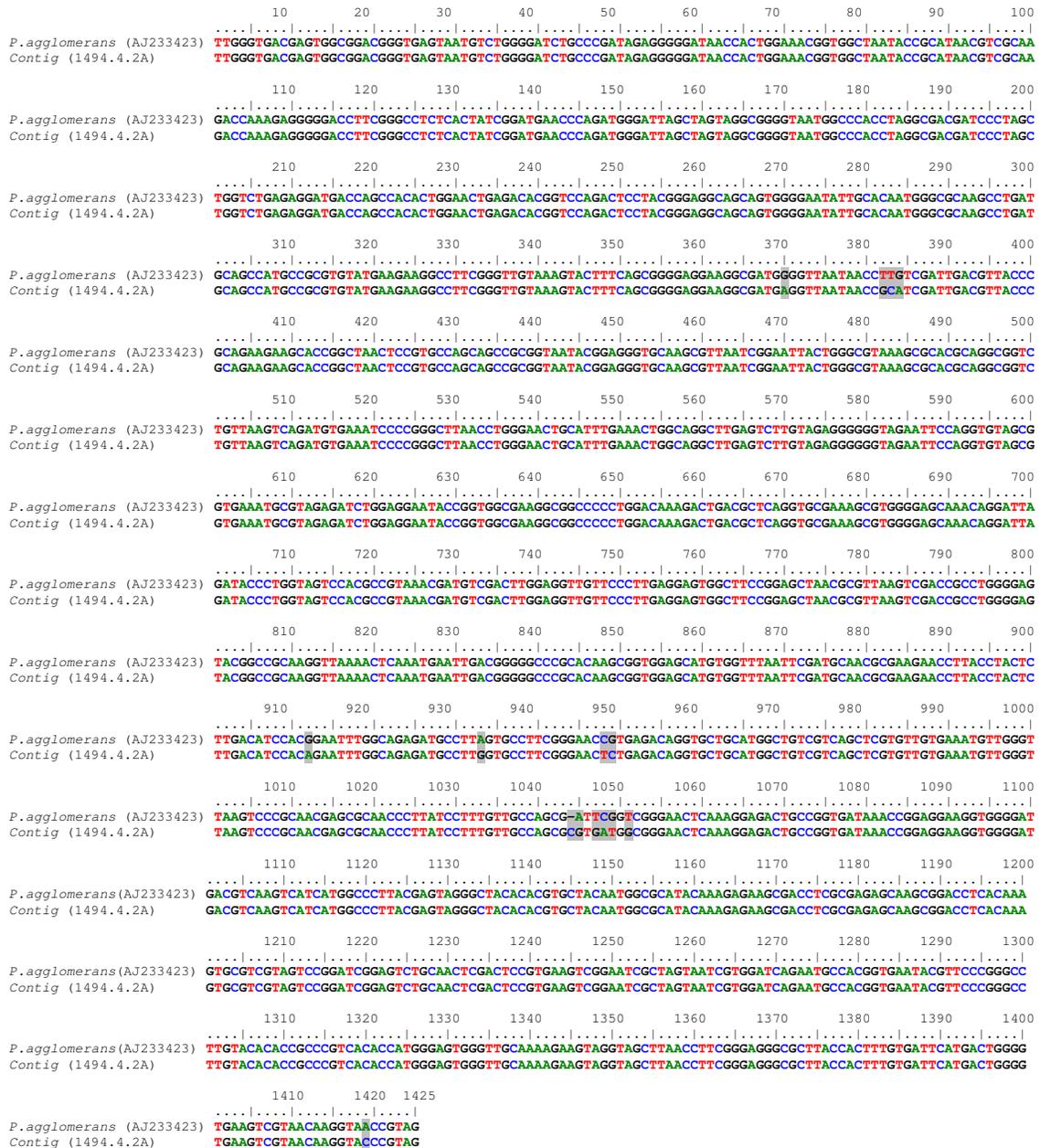
Figura 4.8 - Visualização em gel de agarose do fragmento de DNA correspondente ao gene rDNA 16S amplificado via PCR. (M) ladder  $\lambda$  *EcoRI/Hind III* 1Kb; (1 e 2) pGEM 200 e 100 ng, respectivamente. (3) fragmento de 1.500 pb (seta) do gene rDNA 16S do isolado 1494.4.2A.

A seqüência de nucleotídeos do fragmento de DNA (1.500 pb) amplificado com os *primers* externos e internos formou dois *contigs* mediante a análise pelo algoritmo *Phred/Phrap*. Um *contig* apresentou 671 pb e outro 1.408 pb, com qualidade  $\geq 20$ . O alinhamento destes *contigs*, utilizando o programa CLUSTALW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) gerou a formação de uma seqüência consenso de 1.425 pb.

Como apresentado na Figura 4.9, a seqüência consenso do isolado 1494.4.2A utilizado neste trabalho, analisada pelo algoritmo BlastN, resultou em 99 % de identidade com a seqüência rDNA 16S da bactéria *Pantoea agglomerans* (DSM 3493; gi|4582193|emb|AJ233423.1|PAG233423). Este resultado foi suficiente para se concluir que o isolado 1494.4.2A realmente pertence à espécie *Pantoea agglomerans*, uma vez que

identidade a partir de 99 % é considerada alta e 1 % de polimorfismo nucleotídico é aceitável dentro da mesma espécie (DRANCOURT et al., 2000; STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994).

Figura 4.9 - Alinhamento do *contig* (isolado 1494.4 2A) com a seqüência do rDNA 16S de *P. agglomerans* (DSM 3493: AJ233423), pelo programa CLUSTALW. Regiões sombreadas representam polimorfismo entre as duas seqüências.



#### 4.3.4. Análise estatística dos dados obtidos no experimento com macroarranjos

Dos 1.282 unigenes obtidos na biblioteca de ESTs de *F. graminearum*, 1.012 unigenes e mais 2 genes controles, foram avaliados pela técnica de macroarranjos de DNA. Esses unigenes e controles foram analisados quanto ao padrão de expressão gênica do fungo cultivado *in vitro* na presença (FgI) e ausência (FgC) da bactéria antagonista *P. agglomerans*. Foi realizado o ajuste sistemático das diferenças na intensidade relativas de cada ponto (*spot*) que não representam variação biológica real entre as amostras (BOWTELL; SAMBROOK, 2003). Dos 1.014 genes impressos no experimento de macroarranjo, 913 genes apresentaram sinal de hibridização, correspondendo a 90 % do total de genes impressos nas membranas.

A análise estatística dos dados de expressão gênica obtidos nos experimentos de hibridização permitiu estimar o grau de reprodutibilidade das membranas de macroarranjos. O resultado desta análise indicou a capacidade do macroarranjo em repetir os dados de intensidade de sinal em hibridizações diferentes para as triplicatas de sondas de cDNAs.

Os gráficos de *Box plot* (Figura 4.10) revelam a distribuição gráfica dos genes nas diferentes membranas. Segundo esta análise, pôde-se verificar que a intensidade de sinal de um dado gene, entre as repetições técnicas, membranas, foi em geral semelhante.

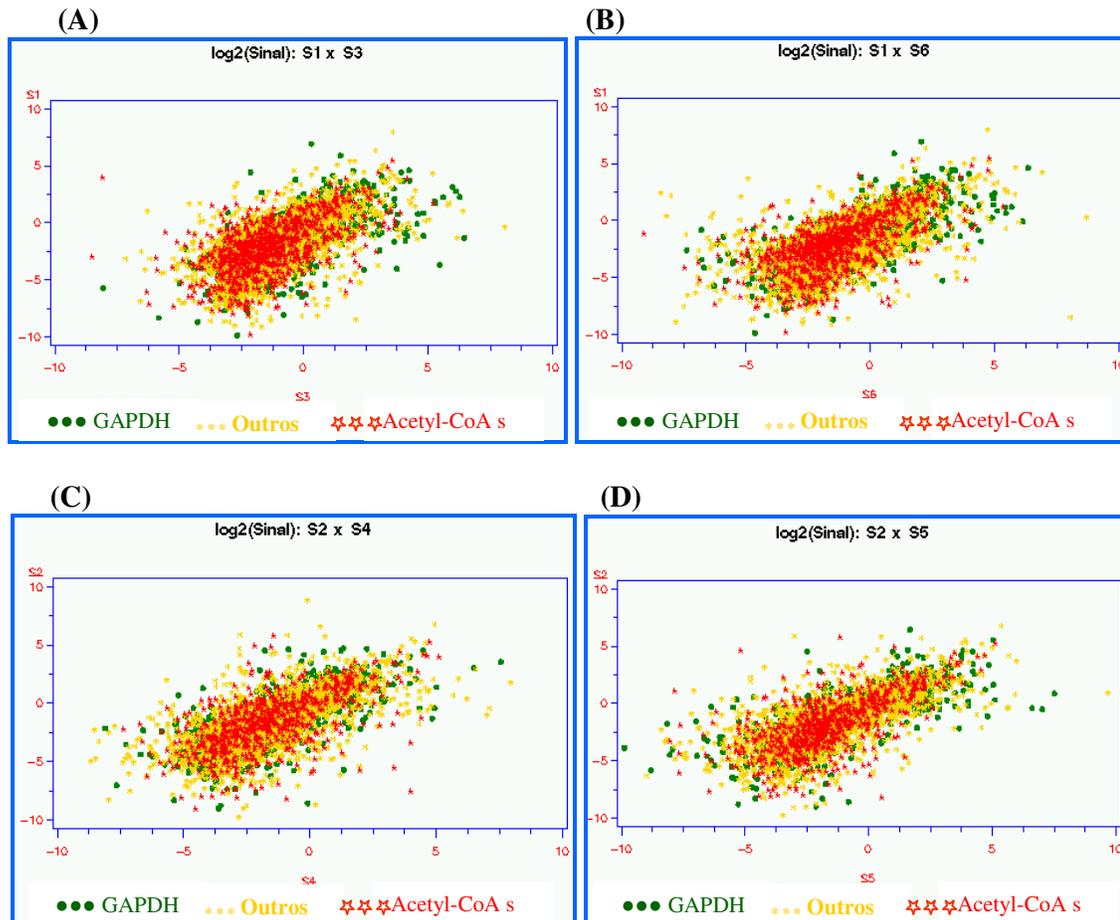


Figura 4.10 - Intensidade de sinal de hibridização dos transcritos de *F. graminearum*, na escala logarítmica na base 2 ( $\log_2$ ) de diferentes membranas para os tratamentos. A e B, membranas da interação (S1 x S3, primeira e segunda membranas e S1 x S6, primeira e terceira membranas); C e D, membranas do controle (S2 x S4, primeira e segunda membrana e S2 x S5, primeira e terceira membranas).

Para determinar quais os genes de *F. graminearum* diferiram significativamente na expressão entre os dois tratamentos (FgC e FgI), os dados do macroarranjo foram analisados usando o modelo em dois estágios proposto por Wolfinger et al. (2001). A análise estatística (pelo teste t) revelou que 29 genes (3 %) foram diferencialmente expressos de modo significativo entre os dois tratamentos (FgC e FgI), a 5 % de probabilidade. Na Figura 4.11 estão representados os valores de probabilidade que superaram o valor crítico de 5 %. Neste gráfico, o eixo x é  $\log_2$  das diferenças estimadas (médias de quadrado mínimo) entre os dois

tratamentos (FgC e FgI) e no eixo y é  $-\log_{10}$  do valor de probabilidade (p-valor) pelo teste t, correspondente.

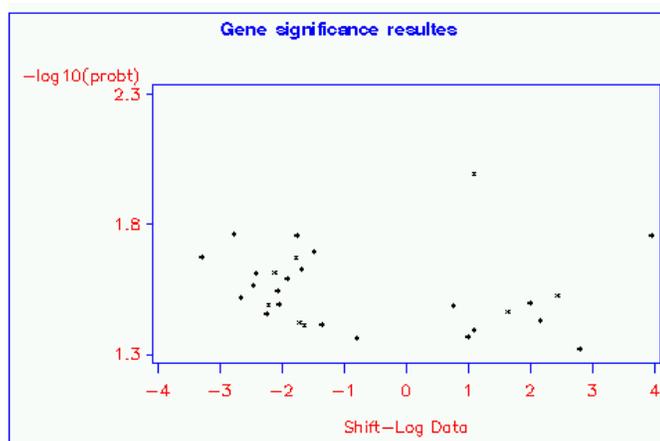


Figura 4.11 - Genes de *F. graminearum* que apresentaram expressão diferencial na presença (FgI) e ausência (FgC) da bactéria antagonista *P. agglomerans*, ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste t.

Uma observação interessante neste gráfico é que mais genes foram induzidos do que reprimidos durante o processo de interação fungo fitopatogênico x bactéria antagonista (FgI). Na interação, 19 genes, à esquerda do gráfico, foram super-expressos e 10 genes, à direita do gráfico, foram reprimidos.

Na Figura 4.12 está representado o valor de probabilidade ( $-\log_{10}$  do valor p) *versus* a diferença estimada entre os dois contrastes. Esta figura mostra a importância dos testes de significância para os experimentos de micro e macroarranjos em relação ao limite de corte (*cut-off*) com base estritamente nas diferenças de expressão entre dois tratamentos, por exemplo, genes quatro vezes mais expressos. As linhas de referência dividem o gráfico em seis seções: as duas linhas verticais indicam o ponto de corte com base em diferenças quatro vezes entre contrastes e a linha horizontal indica o ponto de corte com base em um valor p inferior a 5 %.

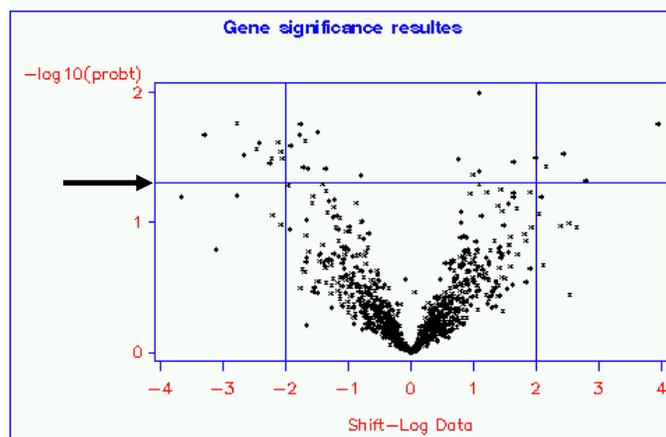


Figura 4.12 - Diferenças entre contrastes versus valor de probabilidade para os genes de *F. graminearum*. Cada ponto representa um único gene analisado pelo modelo em dois estágios proposto por Wolfinger et al. (2001). Valores significativos estão localizados acima da linha horizontal indicado pela seta.

De acordo com este gráfico, tem-se que os genes abaixo da linha horizontal (984), os genes da na secção central (872), os da seção à direita (7) e à esquerda (5) são pontos não significativos, de baixo valor-p e baixa diferença. Já, os 29 genes acima da linha horizontal: genes na secção superior à direita (4), na secção à esquerda (10) e seção central (15), têm alto valor-p e determinando estas diferenças como significativas. Assim, o método em dois estágios proposto por Wolfinger et al. (2001) mostrou ser eficiente na discriminação das diferenças reais de expressão gênica de *F. graminearum* durante a interação com a bactéria antagonista *P. agglomerans*. Por ser um método sensível e seletivo, tem sido aplicado em análise de expressão em experimentos de micro e macroarranjos (AHRÉN et al., 2005; WOLFINGER et al., 2001).

#### 4.3.5. Genes de *F. graminearum* diferencialmente expressos na interação com *P. agglomerans*

O uso de macroarranjos na análise transcricional de determinados organismos e ou condições biológicas contrastantes tem sido uma ferramenta vantajosa em relação a outras

metodologias utilizadas para monitorar o perfil de expressão gênica. Neste estudo a utilização de macroarranjos de cDNA de *F. graminearum* mostrou ser eficiente para gerar um alto número de informações sobre a magnitude e espectro de expressão de genes deste fitopatógeno frente ao microrganismo antagonista *P. agglomerans*.

Nesta análise foram identificados 29 genes de *F. graminearum* que mostraram diferença significativa de expressão ( $p < 0,05$ ) durante a interação entre estes microrganismos. Os transcritos foram analisados pelo banco específico de proteínas (BlastX) de *F. graminearum* FGDB-MIIPS e pelo *GenBank* do NCBI. A relação dos 19 genes super-expressos, bem como os 10 genes reprimidos está descrita na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Genes de *F. graminearum* diferencialmente expressos pelo teste t, com significância ao nível de 5 % de probabilidade, e a correspondente anotação presumível (FGDB-MIPS).

| Unigene <sup>1</sup>   | BlastX contra banco de FGDB-MIPS <sup>2</sup>             | ID <sup>3</sup> | E-value <sup>4</sup> | DAE <sup>5</sup> |
|------------------------|---|-----------------|----------------------|------------------|
| <i>Genes induzidos</i> |   |                 |                      |                  |
| <i>Contig_56</i>       | 6-hidroxi-d-nicotina-oxidase                              | Fg02321         | 2e-221               | 9,79             |
| FGEQBDA004_B10         | Precursor de uma esterigmatocistina 7-O-metil-transferase | Fg02326         | 1e-69                | 6,81             |
| FGEQBDA006_F02         | Aminoácido permease NAAP1                                 | Fg04637         | 4e-31                | 6,34             |
| FGEQBDA002_F07         | Proteína hipotética                                       | Fg01409         | 1e-49                | 5,52             |
| FGEQBDA009_G10         | Proteína hipotética                                       | Fg06594         | 3e-13                | 5,33             |
| <i>Contig_8</i>        | Proteína de choque térmico (heat shock -DDR48)            | Fg06692         | 1e-69                | 4,76             |
| <i>Contig_120</i>      | Monooxigenase contendo flavina (FMO)                      | Fg02327         | 2e-63                | 4,63             |
| FGEQBDA023_H03         | Regulador do ciclo do glioxilato (GPR1)                   | Fg09374         | 3e-29                | 4,34             |
| FGEQBDA009_G07         | Proteína hipotética                                       | Fg09650         | 2e-70                | 4,19             |
| FGEQBDA023_F11         | Glutathione S-transferase (GST)                           | Fg00762         | 2e-93                | 4,13             |
| FGEQBDA005_F05         | Proteína transmembrana                                    | Fg05224         | 1e-106               | 3,76             |
| FGEQBDA011_B07         | Ferroxidase   | Fg02328         | 7e-8                 | 3,41             |
| <i>Contig_15</i>       | Proteína hipotética                                       | Fg06188         | 2e-29                | 3,38             |
| <i>Contig_265</i>      | Proteína hipotética                                       | Fg02323         | 0,0                  | 3,27             |
| FGEQBDA001_E03         | Transportador de peptídeos                                | Fg03427         | 2e-80                | 3,21             |
| FGEQBDA015_B05         | Monooxigenase contendo flavina (FMO)                      | Fg02327         | 1e-102               | 3,11             |
| <i>Contig_36</i>       | Permease (com função desconhecida)                        | Fg04876         | 2e-21                | 2,8              |
| FGEQBDA023_E10         | Ativador transcricional (CuP2)                            | Fg08393         | 7e-75                | 2,57             |
| FGEQBDA011_B09         | Transportador de aminoácido                               | Fg00620         | 3e-26                | 1,73             |

*continua*

conclusão

| Unigene <sup>1</sup>    | BlastX contra banco de FGDB-MIPS <sup>2</sup> | ID <sup>3</sup> | E-value <sup>4</sup> | DAE <sup>5</sup> |
|-------------------------|---|-----------------|----------------------|------------------|
| <i>Genes reprimidos</i> |   |                 |                      |                  |
| FGEQBDA013_E02          | Proteína do tipo “zinc finger”(ZPR1)          | Fg01470         | 3e-36                | 15,35            |
| <i>Contig_263</i>       | Proteína hipotética                           | Fg00857         | 1e-16                | 6,89             |
| FGEQBDA023_A02          | Proteína hipotética                           | Fg10603         | 5e-63                | 5,42             |
| FGEQBDA015_G09          | Sem similaridade ( <i>no hit</i> )            | -               | -                    | 4,47             |
| FGEQBDA015_G10          | Proteína hipotética                           | Fg00184         | 3e-90                | 3,96             |
| FGEQBDA003_D01          | Proteína do tipo DNAJ                         | Fg05133         | 4e-45                | 3,09             |
| <i>Contig_165</i>       | Precursor de citocromo c oxidase -VIa         | Fg08888         | 3e-69                | 2,13             |
| FGEQBDA014_E04          | Proteína hipotética                           | Fg01555         | 6e-45                | 2,12             |
| FGEQBDA008_A04          | Peptidase III                                 | Fg11021         | 9e-98                | 1,99             |
| FGEQBDA008_F06          | Sem similaridade ( <i>no hit</i> )            | -               | -                    | 1,69             |

<sup>1</sup> Nome do unigene gerado na biblioteca de ESTs de *F. graminearum* (Lab. de Biologia Molecular e genômica (ESALQ/ USP))

<sup>2</sup> Resultado do BlastX no banco de dados de *Fusarium graminearum* : FGDB -MIPS

<sup>3</sup> ID: identificação do gene no banco FGDB-MIPS

<sup>4</sup> E-value: indica o grau de "confiabilidade" de um alinhamento

<sup>5</sup> DAE: diferença absoluta de expressão dos respectivos unigenes revelada na análise de macroarranjo.

#### 4.3.5.1. Transcritos de *F. graminearum* super-expressos

Entre os transcritos de *F. graminearum* de maior expressão durante a interação com bactéria antagonista, destacam-se os que apresentaram similaridade com uma 6-hidroxi-d-nicotina-oxidase (*contig* 56) e uma proteína precursora de uma metil transferase, esterigmatocistina-7-O-metiltransferase (FGEQBDA004\_ B10).

Embora a 6-hidroxi-d-nicotina-oxidase tenha sido um dos transcritos mais expressos pelo fungo em condições de cultura *in vitro* (ver capítulo 1), interessantemente também foi diferencialmente expresso no experimento de macroarranjo, com expressão quase 10 vezes mais alta no tratamento interação em relação ao controle. Em *F. graminearum*, esta proteína está associada na catálise da conversão de 6-hidroxirubrofusarina à aurofusarina, produzindo uma pigmentação avermelhada em espécies de *Fusarium*, como *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. pseudograminearum*. Estes componentes são produzidos pelo metabolismo secundário do fungo, cuja síntese está associada à fase de diminuição do crescimento e transição para fase estacionária (MALTZ et al., 2005; MEDENTSEV; ARINBASAROVA;

AKIMENKO, 2005), principalmente em resposta a fatores de estresses como deficiência de nitrogênio ou fósforo, em decorrência de estresses oxidativo e inibição da respiração celular (MEDENTSEV; ARINBASAROVA; AKIMENKO, 2005).

A super-expressão do transcrito esterigmatocistina-7-O-metiltransferase durante o processo de interação poderia ser atribuída ao mecanismo de defesa do fungo quando em contato com a bactéria antagonista. Segundo Cleveland e Bhatnagar (1990), muitas espécies de fungos filamentosos produzem, através do metabolismo secundário, metil-transferases que estão envolvidas na biossíntese de toxinas associadas a mecanismos de defesa e virulência do fungo. Estes compostos são sintetizados em resposta a estímulos ambientais e são frequentemente produzidos nas etapas finais de desenvolvimento; além disso, apresentam sistema biossintético controlado por vários genes (CALVO et al., 2002). Entretanto, fatores nutricionais também podem influenciar na biossíntese destes compostos (CHEN; McCORMICK; HOHN, 2000). A produção da micotoxina Desoxinivalenol (DON) e seus derivados foi estimulada quando *F. graminearum* foi cultivado em meio com baixa disponibilidade de carbono e nitrogênio mas, principalmente, em condição de anaerobiose (MILLER; TAYLOR; GRENHALGH, 2003). Isto poderia explicar a superexpressão de genes relacionados a uma proteína precursora de toxina em fungo. Entretanto, no presente estudo, ambos os tratamentos (FgC e FgI) foram estabelecidos em meio semi-sólido (BDA ¼) sem aeração, e mesmo assim, houve diferença de expressão. Este resultado pode ser atribuído à presença do antagonista bacteriano no meio o qual, provavelmente, pode ter influenciado sobre a produção desta micotoxina.

A relação entre a produção de toxina por *F. graminearum* e a defesa contra a ação do antagonista *Trichoderma atroviride* foi confirmada por Lutz et al.(2003). Estes autores reportaram que na interação entre estes dois microrganismos existe uma relação entre a biossíntese de toxina pelo fungo e a modulação de genes do antagonista envolvidos na síntese

de quitinases, caracterizando um mecanismo de autodefesa contra a ação desta enzima degradativa da parede celular. A partir deste pressuposto, a indução destas proteínas pode ter ocorrido em resposta ao estresse provocado pela falta de algum nutriente, consumido pelas bactérias presentes no meio de cultura, e/ ou em resposta à ação de algum produto secretado pelas bactérias no meio de cultura, provocando a indução de genes envolvidos na defesa e virulência deste fitopatógeno.

Outro transcrito que também foi superexpresso na condição *in vitro* (capítulo 1), e que revelou diferença significativa de expressão no macroarranjo, foi uma proteína produzida em resposta à danos no DNA “*DNA-damage-responsive - DDR48*” (*contig 8*). O gene *DDR48* de *Saccharomyces cerevisiae* pertence a um conjunto de genes cuja indução é ativada em resposta a algum tipo de estresse sobre a célula, provocando alterações no DNA (McCLANAHAN; McENTEE, 1986; TREGGER; McENTEE, 1990). Neste fungo, por exemplo, são conhecidos mais de 30 genes que atuam na indução de proteínas envolvidas na construção e manutenção da parede celular, o primeiro alvo de condições de estresse (BOORSMA et al., 2004). Boorsma et al. (2004) avaliaram a resposta transcricional de células de *S. cerevisiae* após a exposição a duas substâncias químicas, uma que interfere na constituição da parede celular e outra que atua na degradação da parede celular. Ambos os tratamentos foram eficientes para a identificação de vários genes induzidos por estresse, entretanto, a transcrição de genes como *DDR2* e *DDR48* foi mais expressiva após o tratamento com a enzima que degrada a parede celular. Outra forma de alteração na expressão deste gene está associada a deficiência em nitrogênio. Em *Gibberella fujikuroi*, um gene homólogo ao *DDR48* de *S. cerevisiae* foi um dos mais expressos quando este fungo foi cultivado em meio com deficiência deste componente nutricional, confirmando seu papel em diferentes condições de estresse (TEICHERT et al., 2004).

Novamente foram encontradas indicações de que deficiência nutricional pode ser um fator potencial para a indução destes transcritos. Entretanto, outras evidências têm sugerido a ação de agentes microbianos contrários à sobrevivência deste fitopatógeno (BOORSMA et al., 2004). Esta suposição é reforçada pelo efeito de inibição da bactéria *P. agglomerans* sobre crescimento dos fungos fitopatogênicos testados no experimento de antagonismo *in vitro* realizado neste estudo. Segundo Sheng e Schuster (1993), esta complexidade de fatores associados para a regulação do gene *DDR48* ou seus homólogos em outros microrganismos torna-se uma característica positiva, principalmente em relação à adaptação deste fungo em condições ambientais adversas. Estes resultados revelam grandes perspectivas na descoberta de possíveis agentes antifúngicos que podem ser caracterizados e cujo mecanismo de ação merece melhor elucidação.

Um transcrito com similaridade a uma *glutathione-S-transferase* - GST (FGEQBDA023\_F11) foi identificado e teve sua expressão aumentada em cerca de quatro vezes no processo de interação. Estas proteínas estão localizadas no citosol ou ligadas às membranas de todas as células de eucariotos, cada qual desempenha propriedades catalíticas distintas (HAYES; PULFORD, 1995). As GSTs pertencem a um grupo de isoenzimas envolvidas no processo de proteção contra espécies reativas de oxigênio, muitas vezes produzidas por intermediários do metabolismo aeróbico, e que agem como substâncias tóxicas à célula ou como moléculas sinalizadoras na regulação do desenvolvimento e na defesa contra estresses externos (APEL; HIRT, 2004; WANG; BALLATORI, 1998).

Relativamente poucas informações são disponíveis sobre a presença e a função de GSTs em fungos antes da última década, porém mais recentemente as GSTs têm sido identificadas e isoladas em várias espécies, tais como *Saccharomyces pombe*, *Mucor circinelloides*, *Botrytis cinérea*, *Streptomyces griseus* e *Saccharomyces cerevisiae* (KIM et al, 2004; DOWD; SHEEHAN, 1999; PRINS, 2000; DHAR; DHAR; ROSAZZA, 2003; CHOI et

al, 1998). Estudos têm revelado que existe uma relação entre o nível de expressão de genes que codificam GSTs em fungos e o sistema de defesa celular contra estes produtos tóxicos para célula (BURNS et al., 2005; KIM et al., 2004). Acredita-se que aproximadamente 10 % do transcriptoma de fungos é afetado por estes tipos de espécies reativas de oxigênio, cuja regulação parece ser dependente da expressão de transcritos como GSTs, que atuam na desintoxicação destes compostos neutralizando-os, ou facilitando o transporte para fora da célula (APEL; HIRT, 2004). Além disso, a síntese de GST por *F. graminearum* na presença bactéria antagonista revela a importância de estudos de expressão gênica na interação entre microrganismos, uma vez que este tipo de transcrito também tem sido associado ao sistema de defesa vegetal contra substâncias tóxicas liberadas por fitopatógenos durante o processo de infecção (ALLAMEH et al, 2001; KRUGER et al., 2002).

Transcritos de *F. graminearum* com similaridade a proteínas transportadoras e permeases também estão entre os diferencialmente expressos durante a interação com a bactéria antagonista. Estas permeases fazem parte de um grupo de proteínas integrantes da membrana celular que estão envolvidas na transferência de substâncias para o interior celular (WALKER, 1998). Foram identificadas duas permeases, uma envolvida no transporte de aminoácidos (FGEQBDA006\_F02) e outra com função desconhecida (*Contig\_36*).

O transcrito com similaridade a proteína transportadora de oligopeptídeos (OPT) foi três vezes mais expresso na interação. A família OPT tem sido bem documentada tanto em bactérias, como plantas, fungos e animais (BEKER; NAIDER, 1995), e têm sido associada ao transporte de oligopeptídeos que, após a sua entrada na célula, são rapidamente hidrolisados como fonte de aminoácido e nitrogênio (LUBKOWITZ et al., 1997). DIVON et al. (2005) avaliaram o perfil transtricional de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici (Fol) sob crescimento *in vitro*, com baixa disponibilidade de nitrogênio, e sob o crescimento *in vivo* durante a colonização em plantas de tomate. Foram identificados três genes

transcricionalmente ativados: um gene com similaridade com uma aminoácido permease, o outro com um transportador de peptídeos e terceiro com uma uricase. Segundo estes autores, estes três genes foram ativados para incorporação de N<sub>2</sub> orgânico, refletindo o perfil transcricional do fungo em resposta à pouca disponibilidade nutricional, semelhantes às obtidas pelo fungo durante a colonização no seu hospedeiro.

#### 4.3.5.2. Transcritos de *F. graminearum* reprimidos

A análise por macroarranjo revelou que dez transcritos de *F. graminearum* foram reprimidos durante o processo de interação com a bactéria antagonista. Dentre esses transcritos que apresentaram uma função presumível, destaca-se uma proteína com domínio do tipo dedo de zinco (*zinc finger*) ZPR1, (FGEQBDA013\_E02) com alto nível de repressão, ou seja quinze vezes menos expressa em comparação ao tratamento controle. Este resultado representa uma grande perspectiva para a elucidação do mecanismo de controle deste fitopatógeno, uma vez que se trata de uma proteína de ligação a fatores de transcrição, importante no processo de divisão e viabilidade celular (GALCHEVA-GARGOVA et al., 1996; GANGWANI, 1998).

A proteína ZPR1 é caracterizada pela presença de dois átomos de zinco em sua molécula, os quais estão associados à ligação desta proteína a fatores de transcrição envolvidos na divisão celular (THIELE; WINGENDER, 2000). Embora tenham sido primeiramente identificadas em células animais, proteínas do tipo dedo de zinco apresentam uma estrutura conservada em diversas espécies, desempenhando funções semelhantes tanto em eucariotos superiores como inferiores (GALCHEVA-GARGOVA et al., 1996). Durante a fase estacionária do ciclo celular, a proteína ZPR1 permanece associada a receptores específicos presentes no citoplasma. Durante a divisão celular (mitose) são sintetizados agentes mitóticos, que por sua vez promovem a ligação da ZPR1 aos fatores de alongação

celular (eEF-1 $\alpha$ ). Este complexo ZPR1/ eEF-1 $\alpha$  é imediatamente translocado para o núcleo, e age como moléculas sinalizadoras para o início da divisão celular (GALCHEVA-GARGOVA et al., 1996; GALCHEVA-GARGOVA et al., 1998). A função do complexo ZPR1/eEF-1 $\alpha$  na contribuição da divisão normal de células eucarióticas foi elucidada em *S. cerevisiae* por Gangwani et al. (1998). Segundo estes autores, quando o gene *zpr1* foi alterado, não houve a ligação da proteína ZPR1 ao fator de alongação eEF-1 $\alpha$ , provocando efeitos como deformações morfológicas e permanência das células na fase G2 (fase entre o final da síntese de DNA e início da mitose) do ciclo celular.

Outros transcritos reprimidos no tratamento interação *F. graminearum* x *P. agglomerans* estão associados a proteínas com similaridade à citocromo *c* oxidase (*Contig\_165*) e a uma proteína homóloga a uma chaperona com um domínio do tipo DNAJ (FGEQBDA003\_D01). A enzima citocromo *c* oxidase faz parte de um complexo enzimático da cadeia respiratória. Está localizada na membrana mitocondrial interna e participa da via de convergência do metabolismo aeróbico da célula, através da transferência de elétrons até o oxigênio molecular, para formação de água e energia. As proteínas do tipo chaperonas, pertencem a uma família protéica encontradas em bactérias, fungos, plantas e animais, atuando no mecanismo de “inspeção” da conformação protéica por meio da modelação, reparo ou eliminação daquelas proteínas erroneamente estruturadas (ALBERTS et al, 1997; KELLEY, 1998). Proteínas com domínio “J” têm um papel regulatório específico de agregar outros membros protéicos do tipo hsp70 (*heat shock protein*) acelerando o processo de hidrólise de ATP (KELLEY, 1998).

Entre os transcritos reprimidos, identificados como hipotéticos, alguns apresentam domínios conservados em sua estrutura, como domínios associados ao processo de sinalização intracelular (*Contig\_263*) e domínios de hidrolases (FGEQBDA015\_G10) específicas de ligações glicosídicas de diferentes polissacarídeos e essenciais para a vitalidade de fungos

fitopatogênicos (WU et al., 2006). Estes transcritos representam um grupo importante na identificação de novos genes na condição de interação patógeno x antagonista, uma vez que reúnem seqüências identificadas em outras espécies, mas sem função biológica descrita.

Embora a maioria dos genes presumíveis que foram induzidos durante a interação com a bactéria antagonista tenha revelado similaridade a proteínas relacionadas a processos de defesa e/ou virulência de fungos, pouco é conhecido sobre os fatores que atuam sobre a regulação destes mecanismos. Sabe-se que representam uma forma de defesa desses organismos quando expostos a condições de estresse e geralmente envolvem a ativação de determinados genes ou conjunto deles, associados à estabilidade e à integridade celular, como forma de defesa (BOORSMA et al., 2004; TREGGER; McENTEE, 1990).

#### **4.3.6. Validação dos dados de Macroarranjo por RT-PCRq**

Embora a tecnologia de macroarranjos seja uma das mais úteis no estabelecimento de padrões de expressão gênica e identificação de genes diferencialmente expressos, a comparação de dados digitais pode não representar, com precisão, o perfil de expressão real dos genes estudados. Desta forma, técnicas como PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-PCRq) ou *northern blot* têm sido empregadas como ferramentas complementares para validar análises de expressão gênica (REUE, 1998). Por ser um método quantitativo rápido, acurado e eficiente (RAGEEVAN et al., 2001), a técnica de qPCR-RT foi escolhida para ser utilizada neste estudo com o intuito de validar os dados obtidos no experimento de macroarranjo.

A especificidade dos *primers* utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real foi confirmada pela visualização da eletroforese em gel de agarose 1,2 %. Como representado na Figura 4.13, todas as reações apresentaram amplificação de apenas um fragmento de DNA, com tamanho específico para cada par de *primer* testado: 240 pb

(Fg02321); 176 pb (Fg02326); 102 pb (Fg02327); 141 pb (Fg0937); 165 pb (Fg02323); 109 pb (Fg01470); 200 pb (Fg05133) e 220 pb (GAPDH).

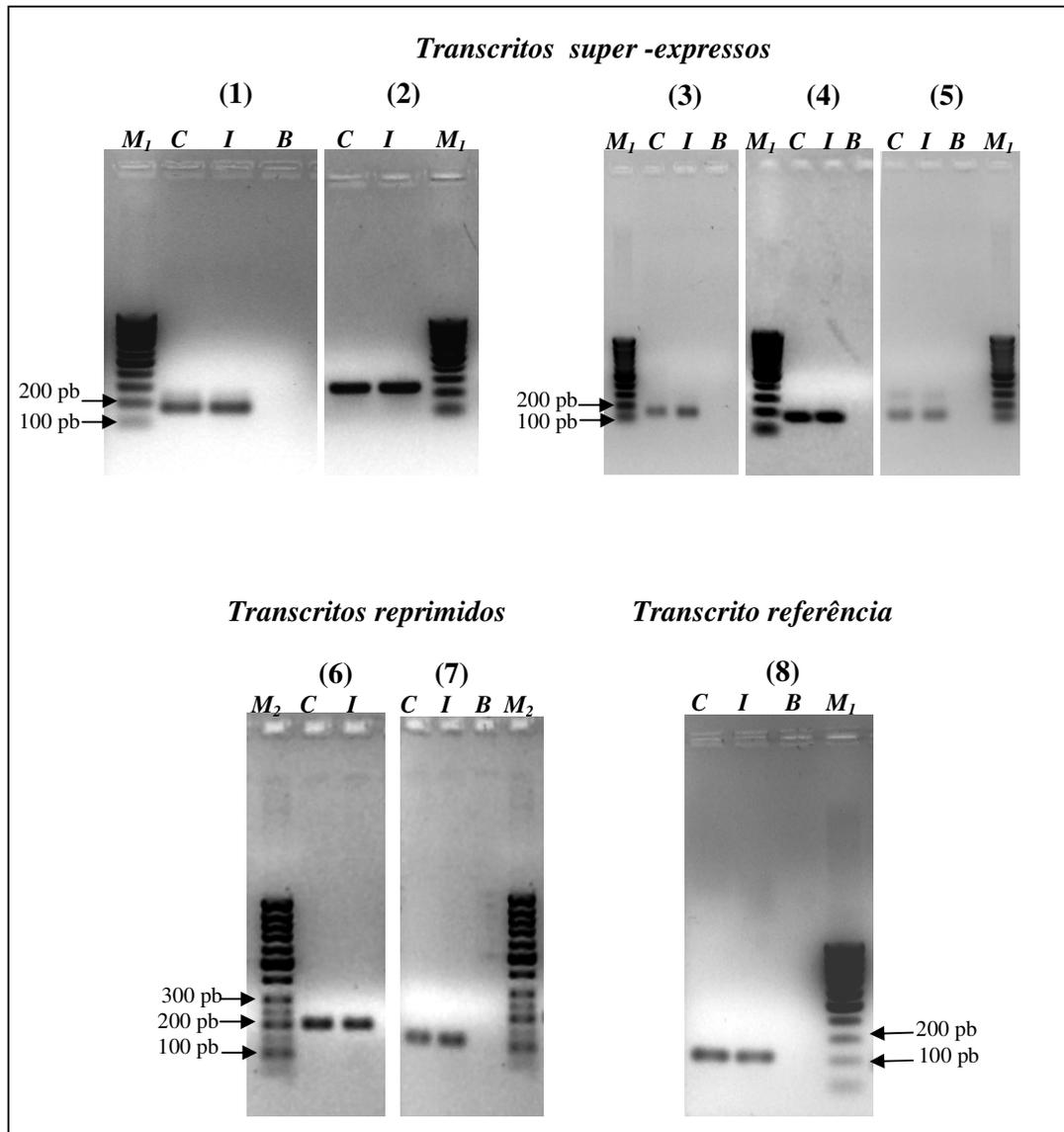


Figura 4.13 - Confirmação da especificidade dos primers com base na visualização dos produtos de qPCR-RT esperados.  $M_1$  e  $M_2$ : mardores moleculares (100 pb -Invitrogen e  $1Kb \lambda Hind III/ Ecr I$ , respectivamente). As letras  $C$ ,  $I$  e  $B$ , referem-se às amostras: FgC, FgI e Branco. Os números referem-se aos *primers* dos seguintes transcritos:(1): Fg02326, 176 pb; (2): Fg02321,240 pb; (3): Fg09374, 141 pb; (4): Fg02323,165 pb; (5): Fg02327, 102 pb; (6): Fg05133, 200 pb; (7): Fg01470, 109 pb e (8): GAPDH, 220 pb.

Também foi avaliada a temperatura de desnaturação (curva de *melting*) de cada produto da reação de qPCR-RT, cuja finalidade foi diferenciar os produtos amplificados dos possíveis dímeros de *primers* e/ou produtos inespecíficos (Figura 4.14).

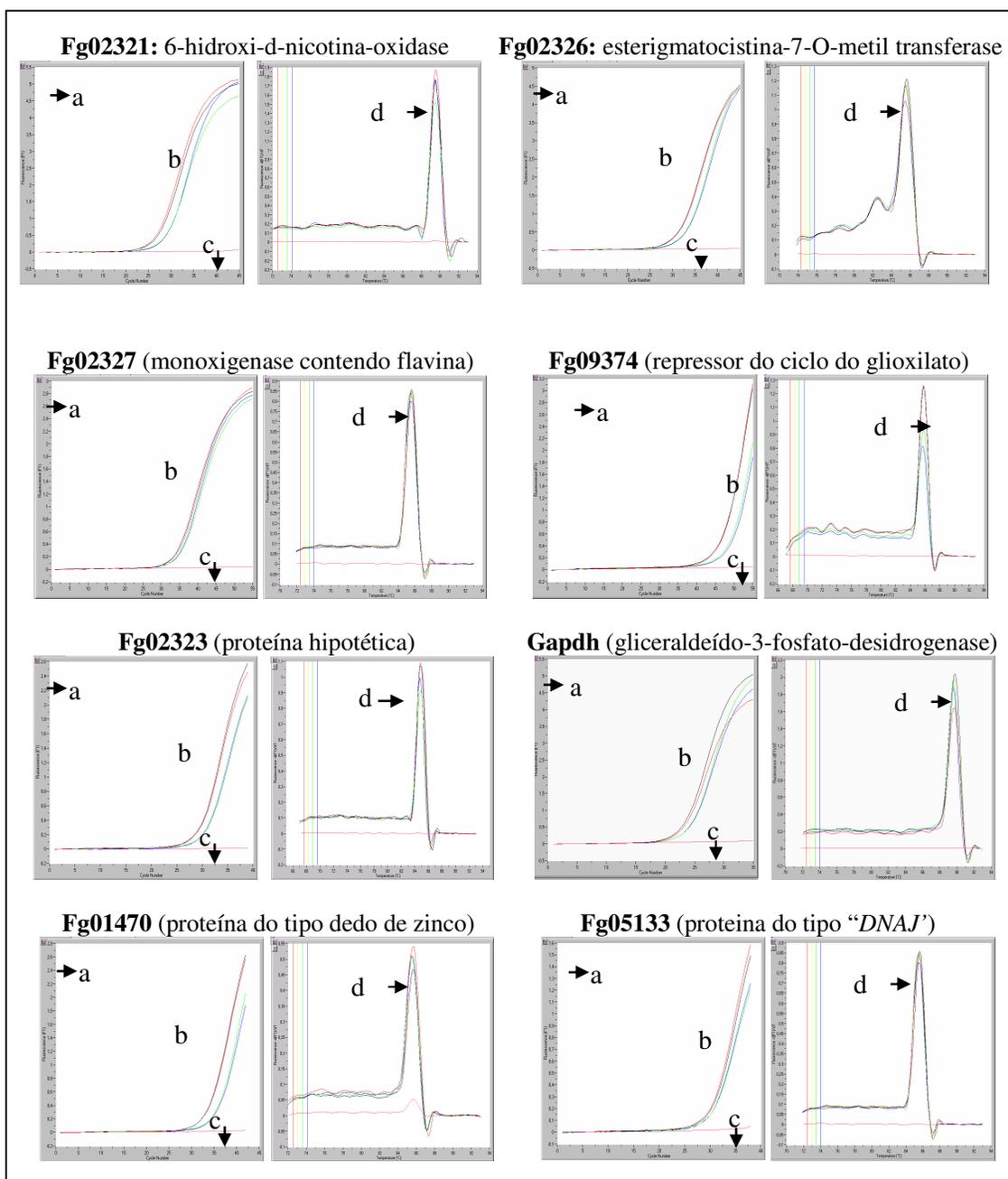


Figura 4.14 - Resultado das amplificações em RT-PCRq de *F. graminearum* para cada par de *primer*: (a) curva de detecção da fluorescência emitida durante o ciclo da amplificação; (b), observar os genes diferencialmente expressos em cada amostra representada por uma cor: vermelho/ preto e verde/ azul; (c) número de ciclos; (d) curva de dissociação (*melting*) dos *primers*, na qual pode-se observar a especificidade de pareamento e a ausência de dímeros, fatores relevantes na eficiência de amplificação

Para os genes analisados, os resultados da curva de *melting* mostraram que a desnaturação dos produtos amplificados para cada experimento foi: Fg02321 = 88,6°C; Fg02326 = 88,6°C; Fg02327 = 82,4°C; Fg09374 = 85,8°C; Fg02323 = 84,9°C; Fg01470 = 85,5°C; Fg05133 = 85,7°C e GAPDH = 89,8°C. Ainda na Figura 4.14, é possível verificar as curvas de detecção da fluorescência (Ct) emitida em cada experimento. Não foram detectadas ampliações inespecíficas e nem formação de dímeros de *primers* durante os 40 ciclos de amplificação.

Uma vez que o objetivo deste trabalho não consistiu na determinação absoluta do número de cópias de cada RNAm diferencialmente expresso, mas na validação ou não dos resultados obtidos via macroarranjos em cada tratamento, o método escolhido foi o de quantificação relativa de expressão gênica, por se tratar de um método que permite quantificar transcritos pouco abundantes de uma forma rápida e acurada (GIULIETTI et al., 2001; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001, PFAFFL, 2001). A quantificação é relativa porque os valores de expressão dos genes analisados são previamente normalizados em relação ao valor de expressão do gene de referência na mesma amostra de cDNA, evitando-se a o uso de controles prévios para calibração do equipamento (PFAFFL, 2001).

O gene GAPDH foi escolhido para ser a referência neste estudo por ser um gene “constitutivo” que codifica para uma enzima glicolítica presente na maioria das células e por participar de diferentes processos celulares (GIULIETTI et al., 2001). Da mesma forma que o GAPDH, outros genes têm sido utilizados como referência, a exemplo dos genes que codificam para:  *$\beta$ -Actin*, *hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase* (HPRT), rRNA, *cyclophilin*; *albumin*, *actins*, etc., principalmente porque seus RNAs respectivos apresentam altos níveis de expressão e estão presentes em todas as células nucleadas (GIULIETTI et al., 2001; HUGGENT et al., 2005; PFAFFL, 2001). Entretanto, para uso como referência em análises através de PCR quantitativo é necessária uma prévia validação, uma vez que pode

ocorrer variação de expressão conforme o experimento, tipo de tecido e/ou organismo (HUGGETT et al., 2005).

Com base nisso, o GAPDH mostrou ser um gene controle (referência) eficiente neste estudo, uma vez que sua expressão foi maior em comparação aos demais genes usados, entretanto foi observado uma variação de expressão entre os dois tratamentos: na interação (FgI) para este gene o sinal de amplificação iniciou-se no ciclo 19 e no controle (FgC) a emissão de sinal de amplificação iniciou no ciclo 20 (Figura 4.15).

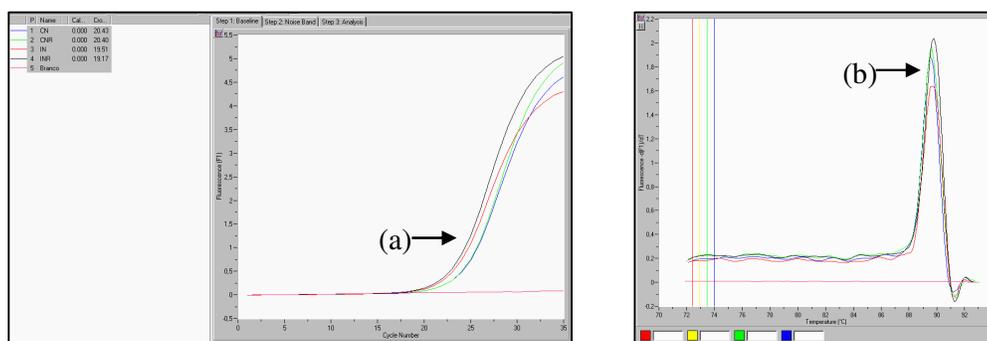


Figura 4.15 - Resultado da reação de RT-PCRq para o gene referência GAPDH nos tratamentos FgI, interação e FgC, controle: (a) reação de amplificação e (b) curva de dissociação (*melting*) do GAPDH nos dois tratamentos.

As quantificações relativas realizadas entre as repetições de amostras de cDNA em cada tratamento (FgC e FgI) revelaram poucas diferenças no Ct, significando que as réplicas foram homogêneas e diferenças de expressão foram realmente identificadas. Todos os cálculos de  $\Delta\Delta Ct$  foram realizados tendo a média de Ct determinada no controle (FgC) como referência, de forma que, valores negativos indicam maior expressão na interação FgI.

Como mostrado na Tabela 4.9 e (Figura 4.16), os dados obtidos através da equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) indicam que a técnica de RT-PCRq confirmou aqueles genes que apresentaram super-expressão em macroarranjo e somente um gene reprimido (Fg05133) não confirmou a expressão diferencial por esta metodologia.

Tabela 4.9 - Análise dos dados de RT-PCRq dos genes de *F. graminearum* nos dois tratamentos (FgI e FgC), utilizando o método estatístico  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

| <b>Tratamento</b>       | <b>VMCt<sup>1</sup></b> | <b><math>\Delta Ct^2</math></b> | <b><math>\Delta\Delta Ct^3</math></b> | <b>Razão (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b> |
|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|--|
| <b>Genes induzidos</b>  |                         |                                 |                                       |  |
| 9374 (Controle)         | 42,56                   | 22,14                           |                                       |  |
| 9374 (Interação)        | 39,98                   | 20,64                           | -1,50                                 | <b>2,83</b>                                      |
| 2321 (Controle)         | 24,87                   | 4,45                            |                                       |  |
| 2321 (Interação)        | 22,83                   | 3,49                            | -0,92                                 | <b>1,89</b>                                      |
| 2323 (Controle)         | 28,48                   | 8,06                            |                                       |  |
| 2323 (Interação)        | 26,99                   | 7,65                            | -0,41                                 | <b>1,33</b>                                      |
| 2326 (Controle)         | 28,24                   | 7,82                            |                                       |  |
| 2326 (Interação)        | 26,77                   | 7,43                            | -0,39                                 | <b>1,31</b>                                      |
| 2327 (Controle)         | 32,25                   | 11,83                           |                                       |  |
| 2327 (Interação)        | 31,47                   | 12,13                           | 0,30                                  | <b>1,23</b>                                      |
| <b>Genes reprimidos</b> |                         |                                 |                                       |  |
| 1470 (Controle)         | 30,52                   | 10,01                           |                                       |  |
| 1470 (Interação)        | 32,56                   | 13,22                           | 3,21                                  | <b>9,09</b>                                      |
| 5133 (Controle)         | 29,04                   | 8,62                            |                                       |  |
| 5133 (Interação)        | 28,35                   | 9,01                            | 0,39                                  | <b>1,35</b>                                      |
| <b>Gene controle</b>    |                         |                                 |                                       |  |
| GAPDH (Controle)        | 20,42                   |                                 |                                       |  |
| GAPDH (Interação)       | 19,34                   |                                 |                                       |  |

1: VMCt: valor médio do Ct; 2:  $\Delta Ct$  (VMCt do gene alvo - VMCt do gene GAPDH); 3:  $\Delta\Delta Ct$  ( $\Delta Ct$  gene alvo (FgI) -  $\Delta Ct$  gene controle (FgC))

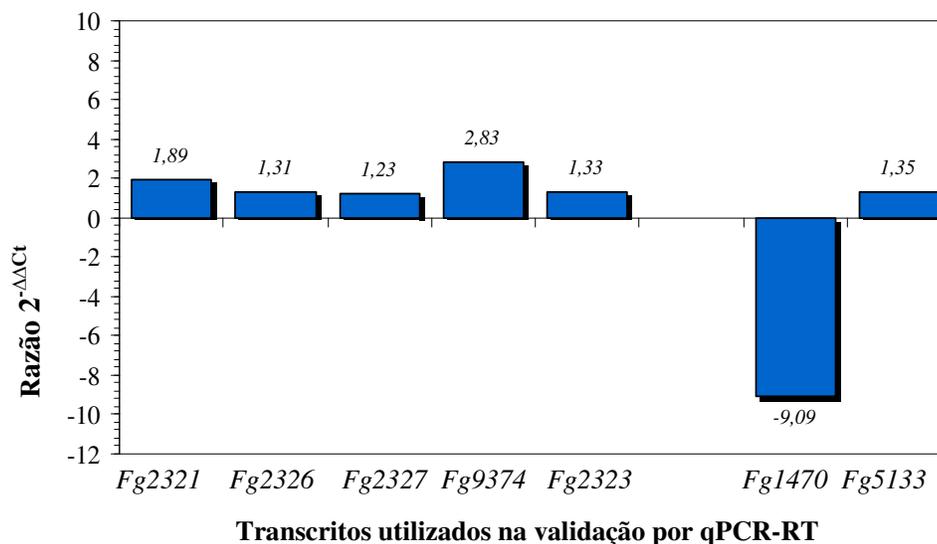


Figura 4.16 - Análise dos dados de RT-PCRq utilizando o método estatístico  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os números positivos representam a quantificação relativa (razão) dos genes de *F. graminearum* que apresentaram maior expressão no tratamento interação (FgI) e os números negativos representam maior expressão no tratamento controle (FgC).

Um fato interessante é que, embora a maioria dos genes identificados pelo macroarranjo como diferentemente expressos e confirmados pela técnica de RT-PCRq, houve uma diferença na intensidade de expressão revelada por estas duas técnicas. Estas diferenças podem ser visualizadas na Figura 4.17. Por exemplo, o transcrito Fg02321 (6-hidroxi-d-nicotina-oxidase) foi o mais expresso em macroarranjo, mas não foi o mais expresso na técnica de RT-PCRq, ou seja, o gene de maior expressão pelo RT-PCRq foi o gene Fg09374 (Regulador do ciclo do glioxilato -GPR1). O único gene que mostrou uma correlação de expressão foi o Fg01470 (Proteína do tipo dedo de zinco “zinc finger”- ZPR1), que foi o gene identificado como o mais expresso nas duas técnicas utilizadas.

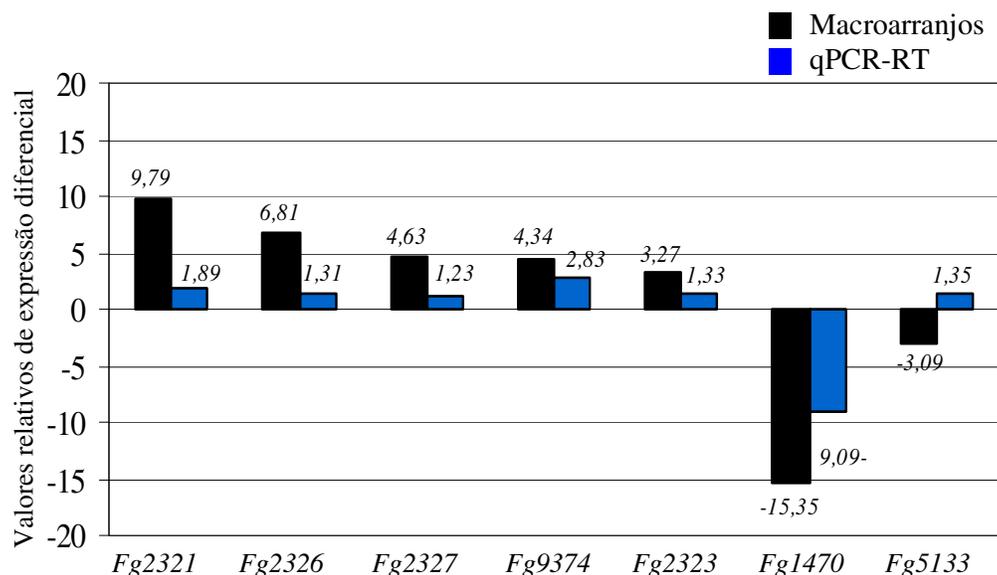


Figura 4.17 - Comparação dos valores obtidos na expressão diferencial de genes de *F. graminearum* na presença e ausência da bactéria *P. agglomerans*, analisada por macroarranjo e por RT-PCRq. Notar que o gene Fg05133 foi o único a apresentar resultados contrastantes para a expressão medida por macroarranjo e RT-PCR .

Os resultados revelaram que, embora foi obtida uma diferença de estimativa da intensidade de expressão entre os genes avaliados pelas duas metodologias, o que era de se esperar, uma vez que se trata de duas técnicas diferentes, ambas foram eficientemente aplicadas neste estudo. Dos 7 genes utilizados para confirmação da expressão do macroarranjo, 6 genes tiveram sua expressão diferencial confirmada por PCR quantitativo em tempo Real. As informações sobre o seqüenciamento dos transcritos, juntamente com a quantificação do nível de expressão na interação foram fundamentais para compreender o padrão de resposta do fungo *F. graminearum* na interação com a bactéria *P. agglomerans*. Estas informações permitiram visualizar o perfil molecular global dos genes envolvidos nas principais vias metabólicas deste fungo. Deve também ser enfatizado que o experimento de macroarranjos foi a etapa inicial para a construção de um banco de dados de expressão de um fungo fitopatogênico na interação com uma bactéria potencialmente antagonista. Desta forma,

os genes identificados como diferencialmente expressos constituem fortes candidatos para estudos futuros, uma vez que a diferença de expressão foi confirmada por macroarranjo e validada por RT-PCRq.

#### 4.4. CONCLUSÕES

A bactéria *P. agglomerans* mostrou efeito antagonista sobre *F. graminearum* e também sobre *Drechslera tritici-repentis* e *Bipolaris sorokiniana*, que são fungos fitopatogênicos de alta importância agrônômica. A inibição foi caracterizada como associada a compostos solúveis e/ ou compostos voláteis produzidos pela bactéria. Foi determinado que o efeito antagônico não é dependente de interação física entre os organismos estudados;

A continuidade e manutenção do processo de antagonismo *P. agglomerans* x *F. graminearum* requerem a permanência da bactéria no meio de cultura, para que haja um progresso na inibição do crescimento do fungo.

A técnica de macroarranjo, bem como o modelo estatístico utilizado mostraram ser sensíveis e seletivos o suficiente para a identificação de 29 genes de *F. graminearum* diferencialmente expressos durante a interação com a bactéria antagonista.

As variações na expressão gênica de *F. graminearum* na interação com *P. agglomerans* detectadas por macroarranjo foram proporcionalmente confirmadas por PCR quantitativo em tempo real (RT-PCRq), aumentando a confiabilidade dos dados do macroarranjo

Sob o efeito antagônico de *P. agglomerans* um maior número de genes de *F. graminearum* são induzidos do que reprimidos, sugerindo que o sistema de defesa do fungo é ativamente acionado durante o processo de antagonismo e que este mecanismo possivelmente seja semelhante ao obtido durante o processo de infecção do fungo em plantas hospedeiras.

## 5. CONCLUSÕES

Os clones gerados na biblioteca de cDNA de *F. graminearum* sob cultivo *in vitro* possibilitou a geração de 1.983 seqüências válidas e 1.282 possíveis genes (unigenes) que poderão ser disponibilizados para programas de melhoramento genético vegetal, visando a obtenção de cultivares com maior tolerância a este tipo de fitopatógeno, principalmente por se tratar de um isolado patogênico específico de culturas nacionais.

A condição de crescimento do *F. graminearum in vitro* favoreceu a identificação de transcritos que participam em vias metabólicas importantes do metabolismo, principalmente integrantes do metabolismo de carboidratos, como também a identificação de componentes do metabolismo secundário produzidos em resposta às condições de estresse biótico e abióticos.

A bactéria *P. agglomerans* mostrou efeito antagonista sobre *F. graminearum* e também sobre *Drechslera tritici-repentis* e *Bipolaris sorokiniana*, que são fungos fitopatogênicos de grande importância agrônômica. Embora esta inibição tenha sido associada à presença de compostos solúveis e/ ou voláteis produzidos pela bactéria, sugere-se a necessidade de estudos futuros envolvendo a caracterização bioquímica destes componentes.

A metodologia de macroarranjo foi eficientemente aplicada neste estudo, permitindo identificar a variação na expressão gênica de *F. graminearum* durante a interação com a bactéria antagonista. Esta variação na expressão foi proporcionalmente confirmada por PCR quantitativo em tempo real (RT-PCRq), aumentando a confiabilidade dos dados do macroarranjo

## REFERÊNCIAS

- ABU, S. M.; LI, G.; ASIEGBU, F. O. Identification of *Heterobasidion annosum* (S-type) genes expressed during initial stages of conidiospore germination and under varying culture conditions. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 233, p. 205-213, 2004.
- ADAMS, M. D. et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**, Washington, v. 252, p. 1651-1656, 1991.
- ADAMS, M. D. et al. Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. **Nature**, London, v. 377, p. 3-174, 1995.
- AHRÉN, D. et al. Comparison of gene expression in trap cells and vegetative hyphae of the nematophagous fungus *Monacrosporium haptotylum*. **Microbiology**, Reading, v. 151, p. 789-803, 2005.
- AIGN, V.; HOHEISEL, J. D. Analysis of nutrient-dependent transcript variations in *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 40, p. 225-233, 2003.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 3. ed. New York: Garland, 1994. 1294 p.
- ALLAMEH, A. et al. Effects of neem leaf extract on production of aflatoxins and activities of fatty acid synthetase, isocitrate dehydrogenase and glutathione S-transferase in *Aspergillus parasiticus*. **Mycopathologia**, The Hague, v. 154, p. 79-84, 2001.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 74, p. 5350-5354, 1977.
- AMPE, F. et al. Transcriptome analysis of *Sinorhizobium meliloti* during symbiosis. **Genome Biology**, London, v. 4, n. 2, 2003. Disponível em: <<http://genomebiology.com/2003/4/2/R15>>. Acesso em: 05 jul. 2006.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-99, 2004.
- ARRAYVISION. **Array vision evaluation 8.0**. Ontario, 2003. Disponível em: <<http://www.imagingresearch.com>>. Acesso em: 05 jul. 2006.
- AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, p. 40-65, 2000. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/full/4/4.pdf>>. Acesso em: 05 jul. 2006.

- BALDWIN, D.; CRANE, V.; RICE, D. A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 2, p. 96-103, 1999.
- BATZOGLOU, S. et al. ARACHNE: A Whole-Genome Shotgun Assembler. **Genome Research**, Woodbury, v. 12, p. 177-189, 2002.
- BECKER, J. M.; NAIDER, F. Fungal peptide transport as a drug delivery system. In: TAYLOR, M.; AMIDON, G. (Ed.). **Peptide based drug design: Controlling transport and metabolism**. Washington, DC: American Chemical Society, 1995. p. 369-384.
- BEER, S. V.; RUNDLE, J. R.; NORELLI, J. L. Orchard evaluation of five strains of *Erwinia herbicola* for control of blossom infection. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 217, p. 217-219, 1987.
- BERTUCCI, F. et al. Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 8, p. 1715-1722, 1999.
- BOORSMA, A. et al. Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Chichester, v. 21, p. 413-427, 2004.
- BORMANN, C. et al. Characterization of a novel, antifungal, chitin-binding protein from *Streptomyces tendae* Tü901 that interferes with growth polarity. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 181, n. 24, p. 7421-7429, 1999.
- BOWTELL, D.; SAMBROOK, J. **DNA microarrays: a molecular cloning manual**. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 2003. 712 p.
- BROWN, D. W. et al. Comparative analysis of 87,000 expressed sequence tags from the fumonisin-producing fungus *Fusarium verticillioides*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 848-861, 2005.
- BURNS, C. et al. Identification, cloning, and functional expression of three glutathione transferase genes from *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 319-327, 2005.
- CALVO, A. M. et al. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, n. 3, p. 447-459, 2002.
- CAMON, E. et al. The Gene Ontology Annotation (GOA) Project: Implementation of GO in SWISS-PROT, TrEMBL, and InterPro. **Genome Research**, Woodbury, v. 13, p. 662-672, 2003.
- CARTER, J. P. et al. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, p. 573-583, 2002.
- CARULLI, J. P. et al. High Throughput Analysis of Differential Gene Expression. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 72, p. 286-296, 1998.

- CHEN, L.; MCCORMICK, S. P.; HOHN, T. M. Altered Regulation of 15-Acetyldeoxynivalenol Production in *Fusarium graminearum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 2062-2065, 2000.
- CHOI, G. H. et al. Sti35, a stress-responsive gene in *Fusarium* spp. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 172, p. 4522-4528, 1990.
- CIRERA, S.; WINTER, A. K.; FREDHOLM, M. Why do we still find anonymous ESTs? **Mammalian Genome**, New York, v. 11, p. 689-693, 2000.
- CLEVELAND, T. E.; BHATNAGAR, D. Evidence for de novo synthesis of an aflatoxin pathway methyltransferase near the cessation of active growth and the onset of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* mycelia. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, p. 1-5, 1990.
- COLLINGE, A. J.; MARKHAM, P. Woronin bodies rapidly plug septal pores of severed *Penicillium chrysogenum* hyphae. **Experimental Mycology**, San Diego, v. 9, p. 80-85, 1985.
- COOMBS, J. T.; MICHELSEN, P. P.; FRANCO, C. M. M. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici in wheat. **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 359-366, 2004.
- COX, J. M. Applications of nylon membrane arrays to gene expression analysis. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 250, p. 3-13, 2001.
- DERISI, J. Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 470, p. 156-160, 2000.
- DEXTER, J. E. et al. Effect of fusarium head blight on semolina milling and pasta-making quality of durum wheat. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 74, p. 519-525, 1997.
- DIVON, H.H. et al. Nitrogen-responsive genes are differentially regulated in plant during *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici infection. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 459- 470, 2005.
- DOPAZO, J. et al. Methods and approaches in the analysis of gene expression data. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 250, p. 93-112, 2001.
- DOWDA, C. A.; SHEEHANA, D. Variable expression of glutathione S-transferase isoenzymes in the fungus *Mucor circinelloides*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 170, p. 13-17, 1999.
- DRANCOURT, M. et al. 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 10, p. 3623-3630, 2000.
- DURHAM, A. M. et al. EGene: a configurable pipeline generation system for automated sequence analysis. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, p. 2812-2813, 2005.

- EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 175–185, 1998.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, n. 3, p. 186–194, 1998.
- FARIA-CAMPOS, A. C. et al. Mining microorganism EST databases in the quest for new proteins. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 2, p. 169-177, 2003.
- FELIX, J. M. Uso de arranjos de DNA em nylon para a análise da expressão gênica em larga escala. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 24, p. 60-67, 2002.
- FLEISCHMANN, R. D. et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, Washington, v. 269, p. 5223-496-512, 1995.
- FRADIN, E. F.; THOMMA, B. P. H. J. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 7, p. 71-86, 2006.
- FREEMAN, W. M.; ROBERTSON, D. J.; VRANA, K. E. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. **Biotechniques**, Natick, v. 29, p. 1042-1055, 2000.
- FRISHMAN, D. et al. The PEDANT genome database. **Nucleic Acids Research**, London, v. 31, p. 207–211, 2003.
- FUKUCHI, S.; OTSUKA, J. Evolution of metabolic pathways by chance assembly of enzyme proteins generated from sense and antisense strands of preexisting genes. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 158, p. 271-291, 1992.
- GAFFOOR, I. et al. Functional analysis of the polyketide synthase genes in the filamentous fungus *Gibberella zeae* (Anamorph *Fusarium graminearum*). **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 4, n. 11, p. 1926–1933, 2005.
- GALAGAN, J. E. et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature**, London, v. 422, n. 6934, p. 859-868, 2003.
- GALCHEVA-GARGOVA, Z. et al. Binding of zinc finger protein ZPR1 to the epidermal growth factor receptor. **Science**, Washington, v. 272, p. 1797–1802, 1996.
- GALCHEVA-GARGOVA, Z. et al. The Cytoplasmic Zinc Finger Protein ZPR1 accumulates in the nucleolus of proliferating cells. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 9, p. 2963–2971, 1998.
- GANG, G. et al. Deoxynivalenol and Nivalenol production by *Fusarium culmorum* isolates differing in aggressiveness toward winter rye. **Phytopathology**, Lancaster, v. 88, p. 879-884, 1998.
- GANGWANI, L. et al. Interaction of ZPR1 with Translation Elongation Factor-1A in Proliferating Cells. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 143, p. 1471-1484, 1998.

- GAVINI, F. et al. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife, 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 39, p. 337-345, 1989.
- GHANNOUM, M.A.; RICE, L. B. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms for resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.
- GIULIETTI, A., et al. An overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, Orlando, v. 25, p. 386-401, 2001.
- GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 Genes. **Science**, Washington, v. 274, p. 546-567, 1996.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 195-202, 1998.
- GOSWAMI, R. S.; KISTLER, H. C. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 6, p. 515-525, 2004.
- GRAY, K.M. Intercellular communication and group behavior in bacteria. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 5, p. 184-188, 1997.
- GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, Á, dos.; AUER, C. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 30, p. 155-165, 2004.
- GÜLDENER, U. et al. FGDB: a comprehensive fungal genome resource on the plant pathogen *Fusarium graminearum*. **Nucleic Acids Research**, London, v. 34, p. 456-458, 2006.
- HARRINGTON, C. A.; ROSENOW, C.; RETIEF, J. Monitoring gene expression using DNA microarrays. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 3, p. 285-291, 2000.
- HAYES, A. et al. Hybridization array technology coupled with chemostat culture: Tools in interrogate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods**, Orlando, v. 26, p. 281-290, 2002.
- HERVÉ, C. et al. Differential screening using high density filters reveals a dramatic change in gene expression at different growth phase in *Arabidopsis* cell suspension cultures. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 34, p. 425-430, 1996.
- HU, J.Y. et al. Microbial diversity and prevalence of virulent pathogens in biofilms developed in water reclamation system. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, p. 623-629, 2003.
- HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: a DNA sequence assembly program. **Genome Research**, Woodbury, v. 9, p. 868-877, 1999.

HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. **Genes and Immunity**, London, v. 6, p. 279-284, 2005.

IDNURM, A.; HOWLETT, B. J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 2, p. 241-255, 2001

IIDA, Y.; OHARA, T.; TSUGE, T. Identification of genes up-regulated during conidiation of *Fusarium oxysporum* through expressed sequence tag analysis. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 43, p. 179-189, 2006.

JEDD, G.; CHUA, N. H. A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. **Nature Cell Biology**, London, v. 2, p. 226-231, 2000.

JOHNSTON, M. Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. **Trends in Genetics**, London, v. 15, p. 29-33, 1999.

JURECIC, R.; BELMONT, J.W. Long-distance DD-PCR and cDNA microarrays. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 3, p. 316-321, 2000.

KAMOUN, S. et al. Initial Assessment of Gene Diversity for the Oomycete Pathogen *Phytophthora infestans* Based on Expressed Sequences. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 28, p. 94-106, 1999.

KARLSSON, M.; OLSON, A.; STENLID, J. Expressed sequences from the basidiomycetous tree pathogen *Heterobasidion annosum* during early infection of scots pine. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 39, p. 51-59, 2003.

KELLEY, W. L. The J-domain family and the recruitment of chaperone power. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 23, p. 222-227, 1998.

KELLY, J. M. et al. Alcohol dehydrogenase III in *Aspergillus nidulans* is anaerobically induced and post-transcriptionally regulated. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 222, p. 323-328, 1990.

KEMPF, H. J.; WOLF, G. *Erwinia herbicola* as a biocontrol agent of *Fusarium culmorum* and *Puccinia reconditai* f. sp. *tritici* on wheat. **Phytopathology**, Lancaster, v. 79, p. 990-994, 1989.

KEON, J. et al. Analysis of expressed sequence tags from the wheat leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 376-389, 2005.

KERR, M. K. et al. Statistical analysis of a gene expression microarray experiment with replication. **Statistica Sinica**, Taipei, v. 12, p. 203-217, 2002. Disponível em: <<http://www3.stat.sinica.edu.tw/statistica/>. Acesso em: 05 jul. 2006

KERR, M. K.; CHURCHILL, G. A. Statistical design and the analysis of gene expression microarray data. **Genetical Research**, London, v. 77, p. 123-128, 2001.

- KERR, M. K.; CHURCHILL, G.A. Analysis of variance for gene expression microarray data. **Journal of Computational Biology**, New York, v. 7, p. 819-837, 2000.
- KIM, H. G. et al. Differential regulation of three genes encoding Glutathione S-Transferases in *Schizosaccharomyces pombe*. **Molecules and Cells**, Seoul, v. 18, p. 332-339, 2004.
- KROKEN, S. et al. Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 100, p. 15670–15675, 2003.
- KRUGER, W. M. et al. Functional and comparative bioinformatics analysis of expressed genes from wheat spikes infected with *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 15, p. 445-455, 2002.
- KUHN, K. M. et al. Global and specific translational regulation in the genomic response of *Saccharomyces cerevisiae* to a rapid transfer from a fermentable to a nonfermentable carbon source. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 21, p. 916–927, 2001.
- KUNOH, H. Endophytic actinomycetes: attractive biocontrol agents. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 68, p. 249-252, 2000.
- LENNON, G. G.; LEHRACH, H. Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 7, p. 314-317, 1991.
- LIESACK et al. Microbial diversity in soil: The need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In: Van ELSAS, J. D.; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. (Ed.). **Modern soil microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1997. cap. 13, p. 375-439.
- LIMA, M. I. P. M. **Métodos de amostragem e avaliação de giberela usados na Embrapa Trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. 17 p. (Documentos On-line, 27). Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_do27.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do27.htm)>. Acesso em: 05 jul. 2006.
- LIMA, M. I. P. M. **Giberela ou brusone?** Orientações para a identificação correta dessas enfermidades em trigo e em cevada. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2004. 56 p. (Documentos On-line, 40). Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do40.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do40.htm)>. Acesso em: 05 jul. 2006.
- LINHARES, A. I.; MATSUMURA, A. T. S.; LUZ, W. C. da. Avaliação da amplitude de ação antagonística de microrganismos epifitas do trigo sobre o crescimento radial de *Drechslera tritici-repentis*. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 1, p. 119-126, 1995.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. **Methods**, Orlando, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LODEWYCKX, C. et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 21, p. 583-606, 2002.
- LUCCHINI, S.; THOMPSON, A.; HINTON, J. C. D. Microarrays for microbiologists.

**Microbiology**, Reading, v. 147, p. 1403-1414, 2001.

LUTZ, M. P. et al. Mycotoxigenic *Fusarium* and Deoxynivalenol production repress chitinase gene expression in the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* P1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 3077–3084, 2003.

LUZ, W.C. da. Controle microbiano de *Pyricularia oryzae* em sementes de trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 2, p. 134, 1990a.

LUZ, W. C. da. Microbiological control of *Bipolaris sorokiniana* “in vitro”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 246-247, 1990b

LUZ, W. C. da. Microbiolização das sementes: uma comparação com o tratamento químico no controle dos principais patógenos das sementes de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. especial, 1998.

LUZ, W.C. da. Controle das doenças fúngicas da parte aérea de milho. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. 3 p. (Comunicado Técnico On-line, 40). Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_co40.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co40.htm)>. Acesso em: 05 jul. 2006

LUZ, W.C. da. Biocontrol of Fusarium Head Blight in Brazil. In: NATIONAL FUSARIUM HEAD BLIGHT FORUM, 2000, Erlanger. **Proceedings...** Erlanger, KY: USWBSI, 2000. p. 77-81

LUZ, W. C. da. Biodiversity of microbial antagonists to *Gibberella zeae* in Brazil. In: NATIONAL FUSARIUM HEAD BLIGHT FORUM, 2001, Erlanger. **Proceedings...** Erlanger, KY: USWBSI, 2001a. p. 46-47

LUZ, W.C. da. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 16-20, 2001b.

LUZ, W.C. da. Evaluation of plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 597-600, 2001c.

LUZ, W. C. da. Biological and chemical treatment combinations for corn seeds. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 37-40, 2003.

LUZ, W. C.; STOCKWELL, C. A.; BERGSTROM, G. C. Biological control of *Fusarium graminearum*. In: LEONARD, K. J.; BUSHENELL, W. R. (Org.). **Fusarium head blight of wheat and barley**. St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society, 2003. p. 381-394.

MALZ, S. et al. Identification of a gene cluster responsible for the biosynthesis of aurofusarin in the *Fusarium graminearum* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 420-433, 2005.

MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Elicidores bióticos: Proteção Natural. **Cultivar**, Pelotas, n. 36, p. 20-22, 2002.

McCLANAHAN, T; McENTEE, K. DNA Damage and Heat Shock Dually Regulate Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 6, p. 90-96, 1986.

MEDENTSEV, A. G.; ARINBASAROVA, A. Y.; AKIMENKO, V. K. Biosynthesis of naphthoquinone pigments by fungi of the genus *Fusarium*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 41, p. 573–577, 2005.

MESTERHAZY, A. Breeding of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. In: DUBIN, H. J. et al. **Fusarium head blight: global status and future prospects**. Mexico: CIMMYT, 1997.

MEWES, H. W. et al. MIPS: a database for genomes and protein sequences. **Nucleic Acids Research**, London, v. 28, p. 37-40, 2000.

MIEDANER, T.; SCHILLING, A. Genetic variation of aggressiveness in individual field populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* tested on young plants of winter rye. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 102, p. 823-830, 1996.

MILLER, J. D.; TAYLOR, A.; GREENHAL, G. H. Production of deoxy-nivalenol and related compounds in liquid culture by *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 1171-1178, 1983.

MOFFITT, M. C.; NEILAN, B. A. The expansion of mechanistic and organismic diversity associated with non-ribosomal peptides. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 191, p. 159-167, 2000.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* species, an illustrated manual for identification**. University Park: Pennsylvania State University, 1993. 193 p.

NELSON, M. A. Expressed Sequences from Conidial, Mycelial, and Sexual Stages of *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 21, p. 348–363, 1997.

NEUMANN, M. J.; DOBINSON, K. F. Sequence tag analysis of gene expression during pathogenic growth and microsclerotia development in the vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, p. 54-62, 2003.

NG, T. B. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. **Peptides**, Fayetteville, v. 25, p. 1215-1222, 2004.

NICHOLSON, S. L.; SIGEE, D. C.; EPTON, H. A. S. Biological control of fire blight of perry pear: comparative evaluation of antagonists on immature fruit slices, micropropagated shoots and orchard blossom. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 273, p. 397-404, 1990.

NUGENT, K. G.; CHOFFE, K.; SAVILLE, B. J. Gene expression during *Ustilago maydis* diploid filamentous growth: EST library creation and analyses. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, p. 349-360, 2004.

NUNES, C. et al. Control biológico de *Penicillium expansum* en pera "Rocha" com el antagonista *Pantoea agglomerans*. In: SIMPOSIO NACIONAL Y IBÉRICO DE POST-RECOLECCIÓN DE FRUTOS Y HORTALIZAS, 5., 2000, Santa Cruz de Tenerife. **Sesión 3, Patología**. Madrid: CSIC, 2000. Póster n. 2, p. 35.

O'DONNELL, K. et al. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineage of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 97, p. 7905-7910, 2000.

OHLROGGE, J.; BENNING, C. Unraveling plant metabolism by EST analysis. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 224-228, 2000.

PAN, M. J. et al. Ultrastructural studies on the colonization of banana tissue and *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* race 4 by endophytic bacterium *Burkholderia cepacia*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 145, p. 479-486, 1997.

PANAGIOTOU, G. et al. Intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum*. converting glucose to ethanol. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 115, p.425-434, 2005.

PANISSON, E.; REIS, E. M.; BOLLER, W. Quantificação de Danos Causados pela Giberela em Cereais de Inverno, na Safra 2000, em Passo Fundo, RS. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p. 189-192, 2003

PASSOS, G. A.; NGUYEN, C.; JORDAN, B. Projeto Transcriptoma: Análise da expressão gênica em larga escala usando DNA-Arrays. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, p. 34-37, 1999.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, n. 9, p. E45-E49, 2001.

PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. A importância do controle químico das doenças do trigo. **ANUÁRIO Brasileiro do Trigo**. Passo Fundo: O Nacional, 2001. p. 30-31.

PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. C. Controle químico de *Gibberella zeae* em trigo pelo uso de fungicidas inibidores da biossíntese do ergosterol. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 273, 1994. Suplemento.

PINTO, N. F. J. A. **Qualidade sanitária de grãos**. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. (Comunicado Técnico). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/dsanitaria.htm>> Acesso em: 05 jul. 2006.

PLACINTA, C. M.; D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with fusarium mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 78, p. 21-37, 1999.

PLEBAN, S.; CHERNIN, L.; CHET, I. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, p. 284-288, 1997.

POSADA-BUITRAGO, M. L.; FREDERICK, R. D. Expressed sequence tag analysis of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 12, p. 949-962, 2005.

PRIMER3. **Primer3 Input**. Chevy Chase, 2001. Disponível em: <[http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)>. Acesso em: 05 jul. 2006.

PRINS, T. W. et al. Cloning and characterization of a glutathione S-transferase homologue from the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 1, p. 169-178, 2000.

PROSDOCIMI, F. et al. Bioinformática: Manual do usuário. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 5, n. 29, p. 12-25, 2002.

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**. University Park, PA: Pennsylvania State University Press, 1981. p. 291-305.

QUEITSCH, C. et al. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Baltimore, v. 12, p. 479-492, 2000.

RAJEEVAN, M. S. et al. Validation of array-based gene expression profiles by Real-Time (Kinetic) RT-PCR. **Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, v. 3, p. 26-31, 2001.

REIS, E. M. Caracterização da população de *Fusarium graminearum* ocorrentes no sul do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 527-533, 1986.

REIS, E. M. et al. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 2004. 141 p.

REIS, E. M. **Manual de identificação e de quantificação de doenças do trigo**. Passo Fundo: Agroalpha, 1994. 59 p.

REIS, E.M.; CASA, R.T. **Patologia de sementes de cereais de inverno**. 1. ed. Passo Fundo: Aldeia Norte Editora, 1998.

REUE, K. mRNA quantitation techniques: considerations for experimental design and applications. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 128, p. 2038-2044, 1998.

RIGDEN, D. J.; MELLO, L. V. Anotação funcional computacional de proteínas: novos métodos computacionais poderão preencher lacunas do sistema de anotação atual. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 25, p. 63-70, 2002.

RILEY, M. L. et al. The PEDANT genome database in 2005. **Nucleic Acids Research**, London, v. 33, p. 308-310, 2005.

ROZEN, S.; SKALETSKY, J. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Ed.). **Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology**. Totowa: Humana Press, 2000. p. 365-386.

RUEPP, A. et al. The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 32, p. 5539-5545, 2004.

RUMJANEK, N. G.; FONSECA, M. C. C.; XAVIER, G. R. Quorum sensing em sistemas agrícolas. Comportamento multicelular em procarioto via comunicação intercelular.

**Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 33, p. 34-49, 2004.

RUPPEL, S. et al. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: An investigation using ELISA and transmission electron microscopy. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 145, p. 261-273, 1992.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1890 p.

SANTOS, I. dos; MATSUMURA, A. T. S.; LUZ, W. C. da. Biocontrole “in vitro” de *Bipolaris sorokiniana*. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DAS DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 1991, Campinas. **Anais...** Jaguariúna: EMBRAPA, CNPDA, 1991. p. 12.

SAS INSTITUTE INC. **SAS On-line DOC®**. Disponível em: <<http://www.id.unish.ch/software/unix/statmath/sas/sasdoc/stat/index.htm>> Acesso em: 05 jul. 2006.

SCHISLER, D. A.; KHAN, N. I.; BOEHM, M. J. Application of naturally occurring yeasts and bacteria to reduce the severity of Fusarium Head Blight. Corvallis: Oregon State University, 2000. Disponível em: <<http://www.css.orst.edu/nawg/2000/schisler.htm>>. Acesso em: 05 jul. 2006.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, n. 7, p. 2883-2894, 2001.

SHENG, S.; SCHUSTER, S. M. Purification and Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* DNA Damage-responsive Protein 48 (*DDRP 48*). **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, p. 4752-4158, 1993.

SIMPSON, T. J. Polyketide biosynthesis. **Chemistry and Industry**, London, v. 5, p. 407-415, 1995.

SIMS, A. H. et al. Use of expressed sequence tag analysis and cDNA microarrays of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, p. 199-212, 2004.

SNIJDERS, C. H. A. Systemic fungal growth of *Fusarium culmorum* in stems of winter wheat. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 129, p. 133-140, 1990.

SOKOLOVSKY, V. et al. A Fast and rentable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics Newsletter**, Kansas City, v. 37, 1990. Disponível em: <http://www.fgsc.net/fgn37/sokol.html>. Acesso em: 05 jul. 2006.

SOUNDARARAJAN, S. et al. Woronin Body function in magnaporthe grisea is essential for efficient pathogenesis and for survival during nitrogen starvation stress. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. 1564-1574, 2004.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in

- bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, p. 846-849, 1994.
- STOCKWELL, C. A.; LUZ, W. C. da.; BERGSTROM, G. C. Biocontrol of wheat fusariosis with microbial antagonists. **Phytopathology**, Lancaster, v. 87, p. 94, 1997. Abstract.
- SUTTON, J. C. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 4, p. 195-209, 1982.
- TEICHERT, S. et al. Deletion of the *Gibberella fujikuroi* glutamine synthetase gene has significant impact on transcriptional control of primary and secondary metabolism. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 53, p. 1661-1675, 2004.
- TEKAUZ, A.; McCALLUM, B.; GILBERT, J. Review: Fusarium head blight of barley in western Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 22, p. 9-16, 2000.
- TELFORD, G. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-sensing signal molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine lactone has immunomodulatory activity. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 66, p. 36-42, 1998.
- TENNEY, K. et al. *Hex-1*, a gene unique to filamentous fungi, encodes the major protein of the woronin body and functions as a plug for septal pores. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 31, p. 205-217, 2000.
- THIELE, S.; WINGENDER, E. Fungal metabolic regulators with zinc fingers. In: TRANSFAC BIOBASE. Biological Databases GmbH, Mascheroder Wegb, D-38124 Braunschweig. Disponível em: <<http://www.gene-regulation.com/info/funghi.html>>. Acesso em: 05 jul. 2006.
- THIND, B. S.; JINDAL, K. K. Evaluation of green gram seed microflora for the eradication of *Xanthomonas campestris* pv. *vignaeradiatae* from green gram seeds. In: NATIONAL SYMPOSIUM ON PHYTOBACTERIOLOGY, 1988, Madras, India. **Advances in research on plant pathogenic bacteria; proceedings...** Madras: University of Madras, 1988. p. 119-127.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 33, p. 4673-4680, 1994.
- TRAIL, F. et al. Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, p. 187-197, 2003.
- TREGER, J. M.; McENTEE, K. Structure of the DNA Damage-Inducible Gene DDR48 and Evidence for Its Role in Mutagenesis in *Sacharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 10, p. 3174-3184, 1990.
- VAN GINKEL, M. et al. Inheritance of resistance to fusariosis in two wheat cultivars from Brazil and China. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, p. 863-967, 1996.

- VAN HAL, N. L. W. et al. The application of DNA microarrays in gene expression analysis. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 78, p. 271-280, 2000.
- VELCULESCU, V. E. et al. Serial analysis of gene expression. **Science**, Washington, v. 270, p. 484-487, 1995.
- WANG, C.; HU, G. H.; LEGER, R. J. S. T. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 704-718, 2005.
- WANG, W.; BALLATORI, N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 50, p. 335-355, 1998.
- WATANABE, A. et al. Similarity and variation in gene expression among human cerebral cortical subregions revealed by DNA macroarrays: technical consideration of RNA expression profiling from postmortem simples. **Molecular Brain Research**, Amsterdam, v. 88, p. 74-82, 2002.
- WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 173, p. 697-703, 1991.
- WIESE, M. V. **Compendium of wheat diseases**. 2. ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1987.
- WODZINSKI, R. S. et al. Antibiotics produced by strains of *Erwinia herbicola* that are highly effective in suppressing fire blight. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 273, p. 411-412, 1990.
- WOLFINGER, R. D. et al. Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models. **Journal of Computational Biology**, New York, v. 8, p. 625-637, 2001.
- WRIGHT, S. A. I. et al. *Pantoea agglomerans* strain Eh318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora in vitro*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 284-292, 2001.
- WU, S. C. et al. Identification of an endo- $\beta$ -1,4-D-Xylanase from *Magnaporthe grisea* by gene knockout analysis, purification, and heterologous expression. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 72, p. 986-993, 2006.
- YE, R. W. et al. Applications of DNA microarrays in microbial systems. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 47, p. 257-272, 2001.
- ZHANG, L. et al. Expression profiling of the response of *Saccharomyces cerevisiae* to 5-fluorocytosine using a DNA microarray. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 20, p. 444-450, 2002.