

INSTITUTO AGRONÔMICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL

Construção de vetor para estudos funcionais de *Alternaria alternata*

NATÁLIA ROBERTA FERRO RODRIGUES

Orientador: Dr. Marco Aurélio Takita.

Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo Pires Boava.

Campinas, SP

2025

INSTITUTO AGRONÔMICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL

Construção de vetor para estudos funcionais de *Alternaria alternata*

NATÁLIA ROBERTA FERRO RODRIGUES

Orientador: Dr. Marco Aurélio Takita.

Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo Pires Boava.

IAC – Centro de Citricultura Sylvio Moreira

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título do Mestre em

Agricultura Tropical e Subtropical Área de
Concentração em Genética, Melhoramento Vegetal
e Biotecnologia.

Campinas, SP

2025

Ficha elaborada pelo Seção de Documentação Científica do Instituto Agrônômico

R696i Rodrigues, Natália Roberta Ferroi

Construção de vetor para estudos funcionais de *Alternaria alternata*

/ Natália Roberta Ferro Rodrigues. Campinas, 44 fls.

Orientador: Marco Aurélio Takita.

Co-orientador: Leonardo Pires Boava.

Dissertação (Mestrado) em Agricultura Tropical e Subtropical- IAC

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me conceder sabedoria, por me guiar em cada passo ao longo desses dois anos e por me sustentar até aqui. Foram muitos obstáculos enfrentados durante essa jornada, e a superação de cada um deles só foi possível por meio da minha fé e confiança em Deus.

Agradeço imensamente ao meu marido, Gilson, pelo apoio incondicional, pelo incentivo constante e pela força nos momentos em que pensei em desistir. Obrigada por assumir, com tanto amor e compreensão, os cuidados com nossos filhos, Heitor e Lizzie, para que eu pudesse concluir este trabalho, mesmo nos momentos em que precisei me ausentar e dedicar menos atenção à nossa família. A vocês, meu marido e meus filhos, deixo registrado todo o meu amor e gratidão.

Ao meu orientador, Dr. Marco Aurélio Takita, agradeço pela oportunidade, pela confiança e pela paciência ao longo de todo o período do mestrado. Seus ensinamentos e orientações foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Leonardo Pires Boava, agradeço pela ajuda, dedicação, atenção e valiosas contribuições durante a execução do projeto.

Agradeço a todos os docentes, servidores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação, pela paciência, apoio e auxílio prestados ao longo do período do mestrado, os quais foram essenciais para a condução e conclusão desta etapa acadêmica.

Aos amigos que sempre me apoiaram, oferecendo ajuda, conselhos e palavras de incentivo, em especial à Júlia Rocco, meu sincero agradecimento. De forma especial, agradeço à minha amiga Ana Beatriz Paes Forner, que foi essencial na etapa final deste trabalho. Obrigada pelo apoio constante, pelas risadas, por me ouvir nos momentos difíceis e também nas reclamações. Ao longo dessa jornada, construímos uma amizade de irmãs, baseada no companheirismo e na confiança, a qual levarei comigo para sempre. Estarei sempre na torcida por você.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos, fundamental para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	II
RESUMO.....	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Biologia, Patogenicidade e Impacto de <i>Alternaria alternata</i> na Mancha Marrom da <i>Alternaria</i> (MMA).....	4
1.1.1 Sintomas e modo de ação.....	5
1.2 Metabólitos secundários.....	5
1.2.1 P450.....	7
1.2.2 Fatores de transcrição.....	7
2. HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	8
2.1 Objetivo Geral.....	8
2.2. Objetivos Específicos.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1 Obtenção, manutenção e avaliação da patogenicidade do isolado de <i>A. alternata</i>	8
3.2 Teste de suscetibilidade à higromicina B.....	9
3.3 Obtenção de mutantes de <i>A. alternata</i> patótipo tangerina.....	10
3.3.1 Extração e Controle de Qualidade do DNA Genômico.....	11
3.3.2 Amplificação das regiões que flanqueiam os genes alvos.....	11
3.3.3 Purificação do gel.....	12
3.3.4 Construção do cassete de substituição gênica por clonagem Golden Gate.....	13
3.3.5 Transformação <i>E. coli</i>	14
3.3.6 Extração e Purificação de DNA Plasmidial por Miniprep Alcalino em Microplaca.....	14
3.3.7 Linearização do vetor.....	15
3.3.8 Preparação de protoplasto.....	16
3.3.9 Transformação genética de <i>A. alternata</i> mediada por PEG/Ca ²⁺	16
4. RESULTADOS.....	17
4.1 Crescimento, manutenção e esporulação de <i>Alternaria alternata</i>	17
4.2 Determinação da concentração de higromicina B para seleção de transformantes de <i>A. alternata</i>	18
4.3 Integridade do DNA genômico de <i>A. alternata</i>	21

4.4 Amplificação dos fragmentos gênicos por PCR.....	22
4.5 Construção do vetor para geração de mutantes por substituição gênica.....	23
4.6 Transformação da <i>E. coli</i>	25
4.7 Minipreparação de DNA plasmidial dos clones recombinantes.....	26
4.8 Linearização e confirmação do tamanho dos vetores recombinantes.....	26
4.9 Obtenção e avaliação de protoplastos de <i>A. alternata</i>	28
4.10 Regeneração micelial após transformação mediada por PEG/Ca ²⁺	29
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÕES.....	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - *Primers* utilizados para amplificação das regiões flanqueadoras dos genes AALTg5837, AALTg5454 e AALTg10699.

Tabela 2 – Soluções utilizadas no protocolo de miniprep alcalino em microplaca

Tabela 3 - Crescimento micelial de *A. alternata* em diferentes concentrações de higromicina B

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vetores utilizados para a obtenção de mutantes por substituição gênica.

(A) Vetor doador contendo o cassete de expressão composto pelo gene repórter *mCherry2* e pelo gene de resistência à higromicina B, sob controle de promotor bidirecional.

(B) Vetor receptor final da construção, destinado à inserção do cassete e das regiões flangeadoras homólogas, utilizado para a geração de mutantes em *A. alternata*

Figura 2 - Crescimento e manutenção de *A. alternata* em meio Citros.

(A) Estágio inicial de crescimento micelial; (B) Colônia em desenvolvimento e (C) Colônia completamente desenvolvida.

Figura 3 - Observação microscópica da esporulação de *A. alternata* cultivada em meio Citros.

Micrografia evidenciando a produção abundante de conídios com morfologia característica da espécie, confirmando a manutenção da capacidade reprodutiva do fungo nas condições de cultivo utilizadas.

Figura 4 - **Crescimento de *A. alternata* em meio Citros suplementado com diferentes concentrações de higromicina B.** (A) Controle, sem adição de higromicina B (0 mg L^{-1}); (B) 30 mg L^{-1} ; (C) 50 mg L^{-1} ; (D) 75 mg L^{-1} ; (E) 100 mg L^{-1} . As imagens foram obtidas após o período de incubação e evidenciam redução progressiva do crescimento micelial nas concentrações de 30 e 50 mg L^{-1} , bem como inibição completa do crescimento nas concentrações de 75 e 100 mg L^{-1} .

Figura 5 - **Efeito da higromicina B sobre o crescimento micelial de *A. alternata*.**

O gráfico representa o diâmetro micelial observado após o cultivo em meio suplementado com diferentes concentrações de higromicina B. Observa-se redução progressiva do crescimento com o aumento da concentração do antibiótico, com inibição completa a partir de 75 mg L^{-1} .

Figura 6 - Análise da integridade do DNA genômico de *A. alternata* por eletroforese em gel de agarose.

DNA genômico extraído de *A. alternata* patótipo tangerina analisado em gel de agarose a $0,7\%$, evidenciando a presença de uma banda única e intensa de **alto peso molecular**, com migração superior a **10 kb**, conforme comparação com o marcador de peso molecular de **1 kb**. A ausência

de smear ao longo do gel indica boa integridade do DNA e baixa degradação, demonstrando a adequação do material para análises moleculares subsequentes.

Figura 7 - Amplificação dos genes AALT_g5837, AALT_g5454 e AALT_g10699 por PCR. Produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos genes **AALT_g5837**, **AALT_g5454** e **AALT_g10699** (**ALTmutTF**), utilizando pares de *primers* específicos para as regiões direita (Rig) e esquerda (Left) de cada gene. As amostras foram amplificadas em diferentes temperaturas de anelamento (53 °C, 55 °C e 57 °C). As bandas correspondentes ao gene **AALT_g5454** apresentaram tamanho aproximado de **168 pb**, enquanto os fragmentos amplificados para o gene **AALT_g10699** migraram na região de **~117 pb**. Para o gene **AALT_g5837**, observaram-se fragmentos com migração entre **800 pb e 1 kb**, conforme estimado por comparação com o marcador de peso molecular (1 kb). O marcador de peso molecular está indicado à esquerda do gel. O controle negativo (CN) não apresentou amplificação, confirmando a ausência de contaminação nas reações.

Figura 8 - Esquema da construção do vetor pUC57-arms para substituição gênica em *A. alternata*. Representação esquemática do sistema de clonagem utilizando o vetor doador **pALTmut01**, contendo um cassete de expressão composto por promotor bidirecional, gene repórter **mCherry**, gene de resistência à **higromicina B** e dois terminadores, e o vetor receptor **pUC57-Kan_Bbs**, originalmente portador do gene *lacZ*. O cassete completo, flanqueado pelas regiões homólogas **Left** e **Right (arms)** correspondentes aos genes **AALT_g5837**, **AALT_g5454** e **AALT_g10699**, foi inserido **no sítio de clonagem BbsI**, substituindo o gene *lacZ* e resultando na geração do vetor recombinante **pUC57-arms**, destinado à substituição gênica por recombinação homóloga no genoma de *A. alternata*.

Figura 9 - Placas de transformação de *E. coli* submetidas ao ensaio de azul/branco. Placas de transformação de *E. coli* após incubação em meio suplementado com **X-gal** e **IPTG**, evidenciando colônias azuis e brancas. As **colônias brancas**, destacadas na imagem, indicam a **inativação do gene lacZ** em decorrência da inserção do cassete de interesse no vetor receptor.

Figura 10 - Análise da linearização dos vetores por eletroforese em gel de agarose. Eletroforese em gel de agarose a **0,7%** realizada para a confirmação da **linearização dos vetores recombinantes** após digestão enzimática com **XbaI**. **M**: marcador de peso molecular **1 kb Plus** (Thermo Fisher Scientific); **C1, C2, C3 e C4**: amostras de DNA plasmidial obtidas a partir de colônias transformadas de *E. coli*, evidenciando fragmentos

linearizados de aproximadamente **1,3 kb** (vetor **pALT**) e **2,0 kb** (vetor **pUC**), compatíveis com o **tamanho final estimado de ~3,3 kb** da construção recombinante.

Figura 11 - Formação de micélio de *A. alternata* após cultivo em meio líquido. Formação de micélio fúngico de *A. alternata* após a inoculação de hifas em meio **PD**, incubadas por **quatro dias** sob **agitação contínua**, evidenciando o crescimento vegetativo adequado para a etapa de protoplastização.

Figura 12 - Protoplastos de *A. alternata* obtidos por digestão enzimática.

Protoplastos de *A. alternata* obtidos após digestão enzimática das hifas com **Kitalase**, observados em **microscopia óptica**, apresentando morfologia esférica e integridade celular preservada, o que evidencia a eficiência do processo de remoção da parede celular.

Figura 13 - Estruturas miceliais observadas após transformação de *A. alternata* pelo método PEG/Ca²⁺.

Aspectos morfológicos observados após a transformação de protoplastos de *A. alternata* pelo método mediado por PEG/Ca²⁺ e incubação em meio seletivo contendo higromicina B por até **15 dias**. As imagens evidenciam a formação de massas celulares escuras e a presença de hifas finas, compatíveis com processos iniciais de regeneração micelial. A confirmação dos eventos de transformação requer análises moleculares e funcionais adicionais.

RESUMO

A mancha marrom de *Alternaria* (MMA), causada por *Alternaria alternata*, constitui uma das principais doenças fúngicas que afetam a cultura da tangerina e seus híbridos, resultando em impactos econômicos relevantes. A elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na interação patógeno-hospedeiro permanece como um dos principais desafios da fitopatologia. Estudos prévios demonstraram que, durante o reconhecimento de sinais do hospedeiro, diversos genes de *A. alternata* apresentam expressão diferencial, destacando-se *AALT_g5837* (citocromo P450), *AALT_g5454* (fator de transcrição) e *AALT_g10699* (proteína homeobox), sugerindo possível participação nos processos de patogenicidade. Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um vetor genético voltado a estudos de genômica funcional em fungos filamentosos, visando possibilitar análises funcionais desses e de outros genes associados à virulência. O vetor construído incorpora um promotor bidirecional, o gene *mCherry* como marcador fluorescente e um gene de resistência à higromicina B, permitindo a seleção de transformantes e o monitoramento da expressão gênica. O sistema foi projetado para aplicações em estratégias de substituição gênica em um isolado monospórico de *A. alternata* patótipo tangerina, utilizando protoplastos como sistema de transformação. Os resultados demonstraram a manutenção da viabilidade e das características fenotípicas do fungo, assegurando material biológico adequado para as análises. A higromicina B mostrou-se eficiente como agente seletivo, e os plasmídeos recombinantes obtidos em *E. coli* apresentaram qualidade compatível com as etapas subsequentes. Protoplastos transformados pelo método PEG/Ca²⁺ exibiram regeneração micelial sob pressão seletiva, indicando competência celular e funcionalidade inicial do sistema. Dessa forma, os protocolos estabelecidos constituem uma base metodológica consistente para futuros estudos de função gênica em *A. alternata*, contribuindo para o avanço do entendimento molecular da interação entre o patógeno e seus hospedeiros cítricos.

ABSTRACT

Alternaria brown spot (ABS), caused by *Alternaria alternata*, is one of the most important fungal diseases affecting tangerine and its hybrids, resulting in significant economic losses. Understanding the molecular mechanisms underlying the interaction between the pathogen and its host remains a major challenge in plant pathology. Previous studies have demonstrated that, during host signal recognition, several *A. alternata* genes are differentially expressed, including *AALT_g5837* (cytochrome P450), *AALT_g5454* (transcription factor), and *AALT_g10699* (homeobox protein), suggesting their potential involvement in fungal pathogenicity. In this context, the present study aimed to develop a genetic vector for functional genomics studies in filamentous fungi, enabling the functional characterization of these and other virulence-associated genes. The constructed vector contains a bidirectional promoter, the mCherry gene as a fluorescent reporter, and a hygromycin B resistance gene, allowing both transformant selection and monitoring of gene expression. The system was designed for gene replacement strategies in a monosporic isolate of *A. alternata* tangerine pathotype, using fungal protoplasts as the transformation system. The results demonstrated the maintenance of fungal viability and phenotypic characteristics, ensuring suitable biological material for molecular analyses. Hygromycin B proved to be an effective selective agent, and recombinant plasmids obtained in *E. coli* exhibited appropriate quality for downstream applications. Protoplasts transformed via the PEG/Ca²⁺-mediated method showed mycelial regeneration under selective conditions, indicating cellular competence and initial functionality of the system. Therefore, the protocols established in this study provide a robust methodological framework for future functional gene studies in *A. alternata*, contributing to a deeper understanding of the molecular basis of pathogen–host interactions in citrus.

1. INTRODUÇÃO

A citricultura desempenha papel fundamental na agricultura brasileira, destacando-se tanto pela expressiva área plantada quanto pela relevância econômica de seus principais produtos. Entre eles, as tangerinas têm apresentado crescimento consistente nas últimas décadas, sustentadas por ampla aceitação comercial e expansão produtiva. Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO, 2022), o Brasil ocupa a quarta posição mundial na produção de tangerinas, ficando atrás apenas da China, Espanha e Turquia. Dados mais recentes da Produção Agrícola Municipal (IBGE, 2024), referentes à safra de 2023, indicam que o país mantém aproximadamente 55 mil hectares dedicados à cultura, com uma produção estimada de 1,05 milhão de toneladas. Esses números reforçam a importância estratégica da tangerinicultura e a necessidade de constante monitoramento dos fatores que limitam sua produtividade.

Entre as tangerinas mais exploradas e de maior relevância está o híbrido tangor Murcott (*C. reticulada Blanco* x *C. sinensis*), reconhecido tanto pela aceitação comercial quanto pelo elevado valor nutricional, incluindo compostos antioxidantes como ácido ascórbico uma das formas ativas de vitamina C, responsável pela produção de colágeno, absorção de ferro, os carotenoides e polifenóis (BASTIANEL et al., 2014). Entretanto, apesar do potencial produtivo e comercial dessa cultura, os pomares de tangerinas e seus híbridos enfrenta desafios expressivos, sendo um dos principais a ocorrência da doença mancha marrom da alternaria (MMA), causada pelo fungo *Alternaria alternata* patótipo tangerina, considerada a doenças fúngica mais séria dessa cultura (PERES et al., 2003). A MMA foi detectada pela primeira vez no Brasil no Estado do Rio de Janeiro, em 2001, em pomares de tangerina ‘Dancy’ (*Citrus reticulata Blanco*) (GOES et al., 2001). Em São Paulo a doença foi constatada em 2003, em pomares de tangor ‘Murcott’ (SOUZA et al., 2009).

Diversos estudos têm demonstrado que as tangerinas, como Dancy e Ponkan, e seus híbridos (Murcott, Nova, Fairchild, Lee e Sunburst), assim como os tangelos *Minneola* e *Orlando*, são suscetíveis a MMA (REIS et al., 2007). As tangerinas ‘Clementina’, ‘Satsuma’, ‘Fremont’ e ‘Thomas’, apresentam alto grau de resistência em condições de campo, mas essas variedades têm pouca expressão comercial no Brasil (PORCINO et al., 2017).

Dessa forma, produtores de tangerinas apresentam dificuldades em obter safras produtivas e de boa qualidade, devido à incidência dessa doença (GOES et al., 2001; PERES et al., 2003; SPÓSITO, 2003).

A MMA é de difícil controle, sendo recomendado o manejo integrado, com a combinação de práticas culturais e aplicações de fungicidas (FERREIRA et al., 2016). De acordo com a

revisão publicada recentemente pela MDPI (2025) demonstrou que, embora inúmeros produtos fitossanitários apresentem eficácia em ensaios *in vitro*, o desempenho *in vivo* tende a ser limitado. Entre os principais fatores envolvidos nessa redução estão a elevada quantidade e dispersão do inóculo, a rapidez do processo infeccioso, o longo período de suscetibilidade dos frutos, a emergência de populações resistentes a fungicidas e a baixa persistência das aplicações em campo (GARMENDIA; FERRIOL; BELTRÁN; GARCÍA-BREIJO; RAIGÓN; PARRA; MERLE, 2025).

Devido a suscetibilidade dos materiais genéticos de interesse econômico, o produtor realiza muitas aplicações de fungicidas para o controle, em torno de 12 a 18 aplicações ao ano, cada vez mais aumentando o custo de produção (AZEVEDO et al., 2010). Assim, a crescente preocupação com seleção de patógenos resistentes e a toxicidade de fungicidas tem levantado a necessidade de buscar estudos alternativos de manejo a doença, bem como, o aprofundamento do entendimento da interação patógeno x hospedeiro, visando o melhoramento dessas variedades.

Apesar dessas dificuldades, há progressos importantes na compreensão molecular do patossistema. Por exemplo, a cepa-tipo do patótipo tangerina de *A. alternata* teve seu genoma sequenciado recentemente em nível de cromossomos — identificando 12.067 genes codificadores e mostrando que o patógeno possui cromossomos essenciais e cromossomos dispensáveis que contêm os clusters de genes para a biossíntese da toxina específica para citros (ACT) (GAI; MA; CHEN; LI; CAO; WANG; SUN; JIAO; RIELY; LI, 2021). Além disso, evidências recentes destacam a função de enzimas do tipo Cytochrome P450 como determinantes para a produção de conídios, síntese da toxina ACT, resposta ao estresse oxidativo e virulência total em *A. alternata* patótipo tangerina. A deleção do gene *Aacp1* — codificante de uma monooxigenase P450 — resultou em cepas com produção muito reduzida de esporos, incapazes de causar lesões necróticas e com menor biossíntese da toxina ACT (FU; LI; TANG, 2025).

Além dos avanços proporcionados pelos estudos genômicos, investigações anteriores já apontavam para a complexidade da interação entre o patógeno e seu hospedeiro. Tarallo (2018), ao avaliar um isolado monospórico patogênico de *A. alternata* na presença de extratos de folhas de tangor 'Murcott', identificou a expressão diferencial de um amplo conjunto de genes associados à patogenicidade. Entre esses genes, destacam-se não apenas aqueles relacionados à síntese de enzimas degradadoras de parede celular vegetal, transportadores de membrana, fatores de transcrição e elementos envolvidos na produção de toxinas e metabólitos secundários, mas também candidatos específicos que podem exercer papel central na virulência do patótipo

tangerina. Dentre eles, o estudo apontou o gene AALTg5454, responsável por codificar um fator de transcrição; o gene AALTg5837, que codifica uma citocromo P450 possivelmente envolvida na biossíntese de metabólitos secundários; e o gene AALT_g10699, que codifica uma proteína homeobox, usualmente associada à regulação do desenvolvimento e diferenciação celular.

Esses achados reforçam que a virulência do fungo não se limita à ação da toxina ACT, mas resulta da atuação coordenada de múltiplos processos moleculares que sustentam o estabelecimento da infecção. Assim, mesmo antes da disponibilidade de dados genômicos completos, já era evidente a necessidade de ferramentas funcionais que permitissem investigar, de maneira direta, o papel desses genes na biologia e patogenicidade do organismo.

Essas descobertas demonstram que, embora existam dados genômicos e transcriptômicos, grandes lacunas permanecem na caracterização funcional dos genes envolvidos na patogenicidade, especialmente no que diz respeito à regulação, expressão, metabolismo secundário, esporulação e virulência. Portanto, o simples sequenciamento ou identificação de genes não é suficiente para elucidar os mecanismos de infecção e permitir o desenvolvimento de estratégias inovadoras de controle.

Dessa forma, justifica-se a construção de um novo vetor molecular para *A. alternata* capaz de permitir manipulações genéticas direcionadas, como *knockout*, complementação ou superexpressão de genes específicos. Tal ferramenta possibilita investigações funcionais diretas sobre o papel de genes individuais — como aqueles da família P450 — em processos de virulência, adaptação ao hospedeiro, produção de toxina ACT, esporulação e resposta a estresses. Trata-se, portanto, de um avanço que conecta o conhecimento básico (genômico e transcriptômico) a aplicações práticas, com potencial impacto no manejo integrado da doença e no desenvolvimento de cultivares mais tolerantes.

Ainda, mesmo diante de avanços recentes no estudo de patógenos de citros, permanece essencial concentrar esforços em *A. alternata* patótipo tangerina devido a três fatores principais. Primeiro, o patossistema apresenta especificidade marcada: a toxina ACT é determinante de hospedeiro, afetando tangerinas e seus híbridos, mas não necessariamente outras espécies de citros (Citrus Research & Technology, 2023). Segundo, há considerável variabilidade genética intraespécie, com isolados diferindo quanto à virulência, capacidade de esporulação, produção de toxinas e resistência a fungicidas (LI et al., 2018). Terceiro, as estratégias tradicionais de controle — majoritariamente químicas — apresentam custo elevado e eficácia limitada, agravadas pela ocorrência de resistência a fungicidas, como estrobilurinas, e pela persistência de inóculo em campo (Defesa Agropecuária SP, 2023).

Diante desse cenário, estabeleceu-se como hipótese central de que seria possível desenvolver um vetor compacto, estável e funcional que possibilitasse a transformação genética de *A. alternata* patótipo tangerina. Para atender a esse propósito, optou-se pela construção do vetor por meio do método Golden Gate, uma estratégia de clonagem modular que maximiza a eficiência e reduz significativamente erros de montagem. Essa abordagem permite ainda a clonagem simultânea de múltiplos fragmentos, sem a geração de cicatrizes nas junções, garantindo uma arquitetura gênica mais limpa, precisa e adequada às necessidades de manipulação genética da espécie.

A adoção de um sistema molecular desse tipo permitiria avançar do conhecimento descritivo para a investigação funcional de genes associados à patogenicidade, contribuindo para elucidar processos essenciais, como virulência, síntese de toxinas, esporulação e respostas ao estresse. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi construir um vetor molecular adequado para manipulação genética da espécie e validar sua aplicabilidade para a geração de mutantes, oferecendo novas ferramentas para o estudo do patossistema e abrindo caminho para estratégias de controle mais eficazes, sustentáveis e fundamentadas em princípios biotecnológicos.

1.1 Biologia, Patogenicidade e Impacto de *Alternaria alternata* na Mancha Marrom da *Alternaria* (MMA)

O gênero *Alternaria*, pertencente ao filo *Ascomycota*, é um fungo filamentosos fitopatogênico e está profusamente distribuído pelo mundo podendo estar no ar, solos e em materiais vegetais em decomposição, indicando, dessa forma diversos estilos de vida variando de saprofíticos a endofíticos e patogênicos (CHUNG, 2012). Espécies do gênero *Alternaria* tem habilidade de causar doenças em aproximadamente 400 espécies de plantas. Entre as diversas doenças que acometem espécies vegetais, *A. alternata* se destaca por sua ampla capacidade de infecção, sendo capaz de acometer mais de 100 espécies de plantas distintas (THOMMA, 2003). Dentro desse grupo, o patótipo tangerina de *A. alternata* é o agente etiológico da mancha marrom de alternária (MMA) em tangerinas e seus híbridos, reconhecida como a doença fúngica de maior relevância para essas culturas (PERES et al., 2003). Essa patologia assume especial importância no contexto brasileiro, sobretudo devido ao impacto direto sobre o mercado de frutos in natura, que depende fortemente da qualidade visual e sanitária dos frutos destinados ao consumo (BASTIANEL, 2005).

Esse fungo tem a capacidade de se reproduzir assexuadamente sobre material vegetal morto através da formação conídios, ou seja, esporos assexuais (TIMMER et al., 2000), os quais são dispersos pelo ar e liberado na presença de chuvas ou bruscas mudanças na umidade relativa

(TIMMER et al., 2000), no qual germinam sobre tecido suscetível de frutos, folhas jovens e ramos, liberando uma toxina específica ao hospedeiro levando há rápida necrose dos tecidos (KOHMOTO et al., 1993).

1.1.1 Sintomas e modo de ação

Para que a infecção da MMA tenha sucesso são necessárias temperaturas em torno de 27°C exigindo 12 horas de molhamento contínuo das folhas, podendo aparecer sintomas após 3 dias, com relatos de surgimento de necrose com menos de 24 horas com incidência no verão sendo também a época de novas brotações da planta (TIMMER et al., 2000). O principal sintoma da MMA são lesões causadas por uma toxina hospedeiro-seletiva (host-selective toxin - HST), conhecida como ACT (Alternaria Citri Toxin), que é liberada pelo fungo nos primeiros estágios de infecção afetando folhas, frutos e ramos (AKIMITSU et al., 2003). Em folhas jovens, os sintomas englobam pequenas manchas necróticas marrons ou pretas, que podem estar acompanhadas de halo amarelo. A clorose e necrose se expandem devido à propagação da toxina ACT produzida pelo fungo provocando a curvatura lateral das folhas (KOHMOTO et al., 1993). O avanço das lesões seguindo as nervuras das folhas é um dos sintomas diferenciais da doença. As brotações novas apresentam aspecto de requeima no caule, já nos ramos finos ocorrem pequenas lesões corticosas, com ou sem halo clorótico (AKIMZITSU et al., 2003). Os sintomas visuais em frutos incluem lesões que podem variar bastante em relação ao tamanho, alcançando grandes porções da casca com manchas escuras corticosas, levando a depreciação do fruto.

Não se conhece exatamente as estratégias do fungo *A. alternata* patótipo tangerina para penetrar no tecido do hospedeiro, porém acredita-se que essa possa se dar através da formação de apressórios (SOLEL E KIMCHI, 1997). Assim sendo, deve haver uma ação conjunta entre a formação deste apressório e a toxina ACT, permitindo que a *A. alternata* penetre nas células das plantas sensíveis à toxina, levando à formação de lesões necróticas (TSUGE et al., 2012).

1.2 Metabólitos secundários

Metabólitos secundários são compostos de baixo peso molecular que, apesar de não serem essenciais aos processos vitais básicos, exercem funções importantes relacionadas à adaptação ambiental, defesa e interação ecológica dos organismos que os produzem (SCHARF et al., 2014).

Em fungos, esses metabólitos incluem uma ampla variedade de moléculas bioativas, entre elas os pigmentos melanínicos, responsáveis pela coloração escura de esporos, apressórios

e outras estruturas relacionadas ao desenvolvimento fúngico (YU; KELLER, 2005). A melanina tem sido amplamente associada à virulência e à proteção contra estresses abióticos, atuando como barreira contra radiação UV (KLITTICH; BRONSON, 1986; LEONARD, 1977) e como detoxificadora de espécies reativas de oxigênio (COCCIA et al., 2001).

Além dos pigmentos, fitotoxinas e micotoxinas representam classes importantes de metabólitos secundários envolvidos na patogenicidade e agressividade de fungos fitopatogênicos, interferindo diretamente nos mecanismos de defesa das plantas hospedeiras (YODER, 1980; HARIMOTO et al., 2008; TSUGE et al., 2012). Estudos recentes reforçam essa relevância, demonstrando que novos compostos fúngicos continuam sendo identificados em grande número — mais de 900 novos metabólitos foram relatados somente em 2024 (ZHOU et al., 2024).

A biossíntese desses metabólitos depende da ação coordenada de diversas enzimas específicas. No patógeno de milho *Fusarium verticillioides*, por exemplo, a produção de fumonisinas envolve a atuação de duas proteínas P450 (BOJJA et al., 2002). De maneira similar, em *F. fujikuroi*, quatro enzimas P450 multifuncionais catalisam dez das quinze etapas da via biossintética de giberelinas (TUDZYNSKI et al., 2002). Além de sua participação em vias biossintéticas, proteínas da família P450 também desempenham funções essenciais em processos de detoxificação de compostos tóxicos em diversos fungos filamentosos (ČREŠNAR; PETRIČ, 2011).

Pesquisas recentes mostram que a regulação dessas vias biossintéticas é altamente complexa e depende de fatores ambientais, como luz, temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes, bem como de reguladores globais e específicos de clusters gênicos (KELLNER et al., 2023; ALMATROUDI et al., 2023). Entre esses reguladores, destaca-se o Velvet complex, constituído por VeA, VelB e LaeA, reconhecido como um dos principais moduladores da expressão de genes de metabólitos secundários e do desenvolvimento fúngico (JIN et al., 2024). A importância desse complexo foi recentemente demonstrada em *Parastagonospora nodorum*, onde a deleção de *VeA* resultou em perda de esporulação, redução de virulência e desregulação da produção de metabólitos como o alternariol (LI et al., 2024).

Assim, os metabólitos secundários constituem um componente essencial da biologia e da ecologia fúngica, influenciando diretamente sua capacidade de causar doença, resistir a estresses e competir em diferentes ambientes. A compreensão desses mecanismos, especialmente à luz de evidências recentes, tem implicações diretas tanto para o manejo de doenças de plantas quanto para o aproveitamento biotecnológico desses compostos.

1.2.1 P450

As proteínas citocromo P450 são monooxigenases que têm um papel essencial na biossíntese de metabólitos secundários e na detoxificação de compostos tóxicos.

Tarallo (2018) observou 25 genes codificando proteínas P450 induzidos *A. alternata* patótipo tangerina, quando na presença de extrato de folhas de tangor Murcott, sendo que alguns desses genes são similares a genes que codificam proteínas envolvidas na patogenicidade de outros fungos.

O gene AALTg5837 que codifica uma P450, proteína pertencente a uma superfamília de monooxigenases desempenha funções essenciais em diversos processos fisiológicos de fungos. Além disso, proteínas P450 são frequentemente associadas ao metabolismo secundário e à detoxificação de compostos tóxicos, destacando sua relevância para a adaptação e sobrevivência desses organismos (ČREŠNAR; PETRIČ, 2011). Esse gene apresentou maior indução de expressão e demonstrou similaridade com o gene PKS2 de *Cochliobolus heterostrophus*, conhecido por participar da síntese de uma toxina seletiva ao hospedeiro (BAKER et al., 2006).

1.2.2 Fatores de transcrição

A expressão de genes relacionados a patogenicidade do fungo podem ser controlada por diversos fatores de transcrição.

De acordo com Tarallo (2018), 57 genes foram identificados expressando fatores de transcrição após a adição do extrato de folhas de tangor Murcot.

O gene AALTg5454 é similar a KLAP1 que codifica uma proteína contendo uma sequência alvo nuclear e vários sítios de ligação a DNA. O gene KLAP1 é essencial para a patogenicidade de *Colletotrichum acutatum*, uma vez que os mutantes desse gene foram incapazes de penetrar nas folhas de lima e, portanto, não produzem lesões necróticas (CHEN et al., 2005), isto sugere uma importância na ativação de genes que possam estar também envolvidos com a patogenicidade de *A. alternata* patótipo tangerina (TARALLO et al., 2018).

Já o gene AALTg10699, apresentou similaridade com o gene *MoHOX7* de *M. grisea*. Em *M. grisea*, o gene *MoHOX7*, codifica um fator de transcrição homeobox do tipo *DNA-binding* e se mostrou essencial para formação de apressório e crescimento vegetativo de *M. grisea*, uma vez que os mutantes apresentaram incapacidade de formar apressório e uma significativa redução em crescimento (KIM et al., 2009). De acordo com Tarallo (2018), a detecção dos transcritos do gene AALTg10699 em *A. alternata* logo no começo da infecção pode indicar que o gene esteja relacionado com a formação do apressório e crescimento vegetativo do fungo.

2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

Considerando que Tarallo (2018), identificou a expressão diferencial de genes associados à patogenicidade em *A. alternata* — incluindo proteínas P450, HSPs, transportadores e fatores de transcrição envolvidos na formação de apressórios, bem como na síntese de toxinas e metabólitos secundários — pressupõe-se que a construção de um vetor compacto, modular e funcional permitirá o avanço dos estudos de genômica funcional na espécie. Assim, a hipótese central deste trabalho é que o desenvolvimento desse vetor torne possível a manipulação genética eficiente de *A. alternata*, viabilizando a geração de mutantes dirigidos e possibilitando a investigação de genes essenciais para a patogenicidade e para os processos biológicos previamente identificados.

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho, foi construir um vetor de transformação genética e validar sua aplicabilidade na geração de mutantes, visando fornecer base para estudos funcionais em *A. alternata*.

2.2. Objetivos Específicos

- Testar a susceptibilidade de *A. alternata* a higromicina B para determinar o agente seletivo ideal;
- Construir um vetor compacto contendo promotor bidirecional, gene repórter mCherry, gene de resistência à higromicina B e dois terminadores;
- Obter protoplastos viáveis de *A. alternata*;
- Transformação genética de *A. alternata* sob condições de seleção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção, manutenção e avaliação da patogenicidade do isolado de *A. alternata*

Para o início dos experimentos, foi disponibilizada, por outro grupo de pesquisa, uma placa contendo o isolado de *A. alternata*. A partir desse material, realizou-se o repique do fungo para uma nova placa preparada com meio citros (28g de folhas de laranja pera, 20g de glicose, 15g de ágar), a fim de promover o crescimento ativo da cultura. Paralelamente, conduziram-se

testes de patogenicidade do isolado. Para essa avaliação, folhas de tangor ‘Murcott’ foram inoculadas por meio da pulverização de uma suspensão de esporos na concentração de 10^5 esporos/mL.

As plantas de tangor ‘Murcott’ foram podadas mensalmente antes da inoculação, com o objetivo de estimular o desenvolvimento de folhas jovens. Essas folhas, por serem fisiologicamente mais suscetíveis e representarem o tecido ideal para a avaliação da infecção, foram utilizadas nos ensaios de inoculação com *A. alternata*.

Após a inoculação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação. Cada planta foi individualmente envolvida em saco plástico, com a finalidade de aumentar e manter a umidade relativa, condição indispensável ao estabelecimento da infecção. A avaliação da patogenicidade baseou-se no monitoramento do tempo de aparecimento dos sintomas e na severidade das lesões observadas ao longo do período experimental.

A cultura monospórica de *A. alternata* foi mantida mediante repicagens realizadas a cada 15 dias, também em meio citros (28 g de folhas de laranja ‘Pera’, 20 g de glicose e 15 g de ágar) e incubadas em BOD a 28 °C com fotoperíodo de 12 horas até o início do crescimento do fungo. Essa rotina teve como finalidade preservar a vitalidade e as características morfológicas e fisiológicas do microrganismo, garantindo a integridade da cultura ao longo dos experimentos.

3.2 Teste de suscetibilidade à higromicina B

Para determinar o gene de resistência a antibiótico a ser inserido no cassete de transformação, realizou-se um teste de susceptibilidade de *A. alternata* à higromicina B. Esse antibiótico foi selecionado por ser amplamente empregado na literatura para a seleção de transformantes dessa espécie (AKAMATSU et al., 1997; ISSHIKI et al., 2001; ISSHIKI et al., 2003; RODRIGUES, 2018) e de diversos outros fungos filamentosos (SANTOS, 2009; RODRIGUES, 2010).

Inicialmente, o fungo foi repicado para placas de Petri contendo meio citros (28 g de folhas de laranja ‘Pera’, 20 g de glicose e 15 g de ágar), suplementado com diferentes concentrações de higromicina B: 30 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L e 100 mg/L. Como controle negativo, utilizaram-se placas contendo o mesmo meio, porém sem a adição do antibiótico. Todas as placas foram incubadas em estufa a 27 °C, em condições estáticas, e o crescimento micelial foi monitorado ao longo de três semanas.

A avaliação foi conduzida por meio da observação visual do desenvolvimento das colônias e pela mensuração do diâmetro micelial, com o objetivo de identificar a concentração

mínima inibitória da higromicina B para *A. alternata*. A determinação dessa susceptibilidade foi essencial para orientar a escolha do gene de resistência a ser inserido no vetor de transformação.

3.3 Obtenção de mutantes de *A. alternata* patótipo tangerina

Para a obtenção de mutantes de *A. alternata* patótipo tangerina, empregou-se a estratégia de substituição gênica mediada por recombinação homóloga. Essa abordagem baseia-se na integração precisa, no genoma do fungo, de um cassete de substituição contendo um gene marcador de seleção e um gene repórter, flanqueado por regiões homólogas amplificadas a partir do próprio genoma de *A. alternata*. A recombinação ocorre especificamente nessas regiões, permitindo o nocaute direcionado do gene-alvo.

Para a construção do cassete e do vetor final de nocaute, foram utilizados dois vetores já construídos (Figura 1). O primeiro, denominado pALTmut01, atuou como vetor doador. Ele contém um promotor bidirecional, o gene codificante da proteína fluorescente mCherry, o gene de resistência à higromicina B e dois terminadores, compondo o cassete de transformação. O segundo vetor, pUC57, funcionou como vetor receptor. Nesse plasmídeo foram inseridas as regiões flanqueadoras amplificadas do genoma de *A. alternata*, responsáveis por direcionar a recombinação homóloga durante a substituição gênica.

Os genes-alvo foram clonados no sítio de múltipla clonagem (MCS) do pUC57, entre os sítios das enzimas de restrição EcoRI e XbaI, permitindo a inserção ordenada das regiões flanqueadoras necessárias para o direcionamento da recombinação.

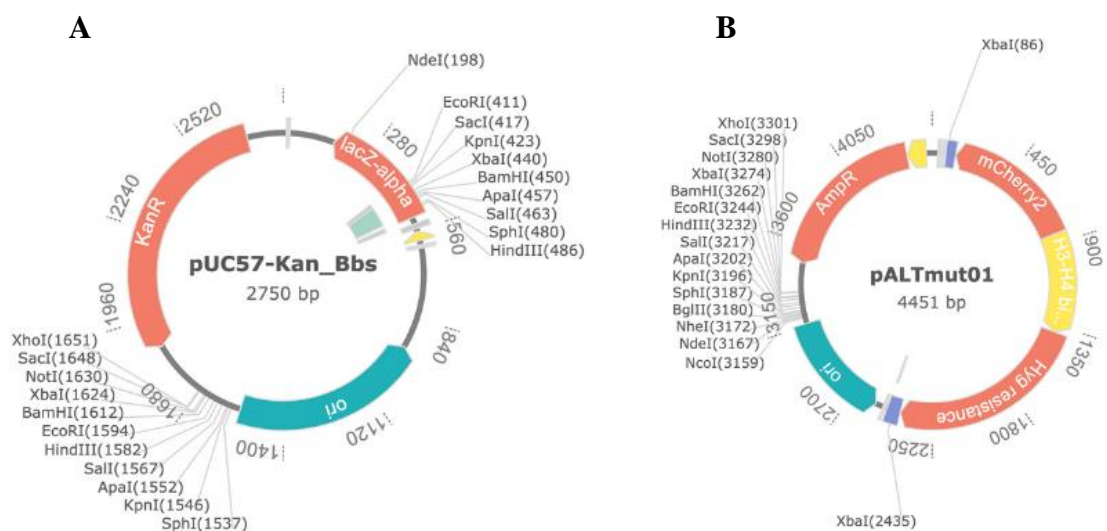


Figura 1: Vetores utilizados para a obtenção de mutantes por substituição gênica.

(A) Vetor doador contendo o cassete de expressão composto pelo gene repórter mCherry2 e pelo gene de resistência à higromicina B, sob controle de promotor bidirecional.

(B) Vetor receptor final da construção, destinado à inserção do cassete e das regiões flanqueadoras homólogas, utilizado para a geração de mutantes em *A. alternata*

3.3.1 Extração e Controle de Qualidade do DNA Genômico

Para a obtenção das regiões de homologia correspondentes às sequências que flanqueiam os genes-alvo AALTg5837, AALTg5454 e AALTg10699 (ALTmutTF), foi realizada a extração de DNA genômico de *A. alternata* patótipo tangerina pelo método CTAB, conforme descrito por Murray e Thompson (1980). Esse método é amplamente utilizado em fungos filamentosos por sua eficiência na remoção de polissacarídeos e compostos fenólicos, que podem interferir em etapas subsequentes de amplificação (SOLAR; GARCÍA, 2017; DOYLE; DOYLE, 1990).

A qualidade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,7%, utilizando-se 5 µL de cada amostra previamente misturados ao tampão de corrida. Considerou-se como DNA íntegro aquele que apresentou banda única e bem definida, de alto peso molecular, sem arraste ou sinais visíveis de degradação — critérios usualmente adotados para análises genômicas de precisão (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Paralelamente, a concentração e a pureza das amostras foram determinadas em espectrofotômetro Nanodrop. A relação de absorbância A260/A280 foi utilizada como parâmetro de qualidade, sendo consideradas adequadas para uso as amostras que apresentaram valores entre 1,8 e 2,0, faixa que indica baixa contaminação por proteínas e compostos orgânicos (NANODROP TECHNOLOGIES, 2007; WILFINGER; MACKY; CHOMCZYNSKI, 1997). Conforme a concentração obtida, as amostras foram diluídas para assegurar condições ideais à etapa de amplificação das regiões flanqueadoras dos genes de interesse.

3.3.2 Amplificação das regiões que flanqueiam os genes alvos

Para a obtenção das regiões de homologia necessárias à construção dos vetores de nocaute, foram amplificadas as sequências que flanqueiam os genes-alvo AALTg5837, AALTg5454 e AALTg10699 (ALTmutTF). As regiões genômicas de interesse foram previamente identificadas por meio da ferramenta BLASTn disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), e os *primers* específicos foram desenhados utilizando o software Primer3, seguindo parâmetros recomendados para reações de PCR de alta especificidade. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se apresentadas na Tabela 1

Tabela 1: *Primers* utilizados para amplificação das regiões flanqueadoras dos genes AALTg5837, AALTg5454 e AALTg10699.

Primer	Sequência (5'–3')	Tamanho (pb)
Alt_mut_TF_Rig_F	CCGAAGACAACACTAGTAGCCTCTCAAGCAACACCG	34
Alt_mut_TF_Rig_R	AAGAAGACCAAAGCAGTGCTACCTTCACAAGCCC	34
Alt_mut_TF_Lef_F	GGGAAGACGAACCTGTTC AACGGCAACACTGCTT	34
Alt_mut_TF_Lef_R	GGGAAGACGTACCAATCTGCGACGATGCGAGTAG	34
AALT_g5454_Rig_F	CCGAAGACAACACTAGGCTGACATGGCTAACGGAGT	34
AALT_g5454_Rig_R	AAGAAGACGAACCTCCTGTGTGTGGCTTCTGCTA	34
AALT_g5454_Left_F	GGGAAGACGAACCTCCTGTGTGTGGCTTCTGCTA	34
AALT_g5454_Left_R	GGGAAGACGTACCACGGGCACAGGCTATATCTCG	34
AALT_g5837_Rig_F	CCGAAGACAACACTAGCTCACATTCCTGGCACTCGT	34
AALT_g5837_Rig_R	AAGAAGACCAAAGCCAACCAGTCACGAACGAGGA	34
AALT_g5837_Left_F	GGGAAGACGAACCTCTTCGGGGACTTTCTTCGCT	34
AALT_g5837_Left_R	GGGAAGACGTACCAGGTGGGCATGACATGGTGTA	34

A amplificação foi realizada utilizando o GoTaq® Green Master Mix (Promega), conforme protocolo padrão do fabricante. Como cada gene possui duas regiões flanqueadoras, foram preparados seis mix de reação, cada um contendo um par de *primers* correspondente a uma das regiões. As reações foram conduzidas em tubos de 0,2 mL contendo: 10,0 µL do Master Mix, 1,0 µL de cada primer (forward e reverse), 2 µL de DNA genômico previamente diluído e água Milli-Q autoclavada para completar o volume final de 20 µL.

Como a temperatura ideal de anelamento não era previamente conhecida para esses *primers*, foram testadas quatro temperaturas distintas (53 °C, 55 °C e 57 °C), com 30 segundos de anelamento por ciclo, de modo a determinar empiricamente as condições mais adequadas para cada reação.

Para a verificação dos produtos amplificados, 1 µL de tampão de corrida foi adicionado a 5 µL do produto de PCR, que foi então submetido à análise por eletroforese à 110 volts por aproximadamente 25 a 30 minutos em gel de agarose a 0,7%, permitindo avaliar a integridade, a especificidade e o tamanho esperado dos fragmentos amplificados.

3.3.3 Purificação do gel

Os produtos de PCR que apresentaram bandas compatíveis foram purificados utilizando o kit *Macherey-Nagel PCR Clean-up and Gel Extraction*, seguindo-se as recomendações do

fabricante (MACHEREY-NAGEL, 2019). Após a eletroforese em gel de agarose a 0,7%, as bandas correspondentes aos fragmentos amplificados foram excisadas sob luz UV e transferidas para microtubos previamente identificados.

A massa de cada fragmento foi utilizada para determinar o volume adequado do Buffer NTI para a dissolução do gel. As amostras foram incubadas a 50 °C até completa solubilização e, em seguida, aplicadas às colunas SV Minicolumn para os processos de ligação, lavagem e eluição do DNA, conforme protocolo do fabricante (MACHEREY-NAGEL, 2019).

O DNA purificado foi diluído em 30 µL de Buffer NE e quantificado em espectrofotômetro Nanodrop (THERMO SCIENTIFIC, 2008). As amostras apresentaram padrão de qualidade adequado, com concentrações dentro da faixa esperada para produtos de PCR e relações A260/A280 próximas de 1,8. Essa razão indica alta pureza e baixa contaminação por proteínas, fenóis ou EDTA, enquanto a relação A260/A230 manteve-se entre 2,0 e 2,2, evidenciando ausência significativa de contaminantes oriundos do gel ou de sais residuais — o que é essencial para etapas posteriores de clonagem (WILFINGER; MACKAY; CHAYEN, 1997).

3.3.4 Construção do cassete de substituição gênica por clonagem Golden Gate

A construção final do vetor de substituição gênica, contendo o cassete de seleção e as regiões de homologia que flanqueiam os genes-alvo, foi realizada por meio da técnica de clonagem Golden Gate. Essa estratégia permite a inserção simultânea de múltiplos fragmentos em uma única etapa, sem a formação de sequências residuais “cicatrices”, uma vez que utiliza enzimas de restrição do tipo IIS, que clivam o DNA fora do sítio de reconhecimento (ENGLER; MARILLONNET, 2013; ENGLER et al., 2014).

Para esta etapa, foi utilizado o kit GeneArt™ Type IIs Assembly, que emprega a enzima BbsI e baseia-se em princípios equivalentes à clonagem Golden Gate. Essa abordagem possibilitou a inserção direcionada dos dois braços de homologia ao cassete de substituição, promovendo a recombinação precisa no genoma do fungo e a interrupção do gene de interesse envolvido na patogenicidade.

Foram realizadas três reações independentes, correspondentes aos três genes-alvo analisados. As reações foram montadas em microtubos de 0,2 mL contendo o vetor doador ALT, o vetor receptor pUC, os fragmentos amplificados correspondentes às regiões flanqueadoras e o GeneArt® Type IIs Enzyme Mix, com volume final ajustado para 20 µL com água Milli-Q autoclavada. Os componentes foram homogeneizados por pipetagem e as reações incubadas em

termociclador programado para 30 ciclos alternando 37 °C por 1 minuto e 16 °C por 1 minuto, seguidos de manutenção a 4 °C.

3.3.5 Transformação *E. coli*

A transformação de *Escherichia coli* foi realizada utilizando o protocolo descrito por Inoue et al. (1990), previamente empregado para a preparação das células ultracompetentes utilizadas neste estudo. As células competentes foram retiradas do armazenamento a -80 °C e imediatamente mantidas em gelo para preservação da viabilidade celular. Em seguida, 5 µL do produto da reação de clonagem Golden Gate foram adicionados às células competentes, permanecendo a mistura em incubação no gelo por 20 minutos.

As amostras foram submetidas a choque térmico a 42 °C por 45–50 segundos e imediatamente retornadas ao gelo por 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados 950 µL de meio SOC previamente aquecido, seguido de incubação sob agitação (150 rpm) a 37 °C, por 40–45 minutos para plasmídeos contendo gene de resistência à ampicilina, ou por 1 h e 30 minutos para plasmídeos contendo gene de resistência à canamicina.

Após o período de recuperação, alíquotas de 100 µL da suspensão foram plaqueadas em meio LB sólido suplementado com antibiótico seletivo, utilizando-se ampicilina na concentração final de 50 µg/mL ou canamicina a 30 µg/mL, conforme o marcador de resistência presente no vetor. O volume remanescente foi centrifugado a 12.000 rpm por 1 minuto, o sobrenadante descartado e o pellet ressuscitado para posterior plaqueamento.

As placas de LB continham ainda IPTG (40 µL) e X-GAL (50 µL), possibilitando a seleção visual das colônias transformadas por meio do sistema de triagem azul/branco. As placas foram incubadas a 37 °C, overnight, para o crescimento e posterior seleção das colônias recombinantes.

3.3.6 Extração e Purificação de DNA Plasmidial por Miniprep Alcalino em Microplaca

As colônias brancas resultantes da transformação de *E. coli* foram selecionadas, inoculadas em meio TB (Terrific Broth) e incubadas a 27 °C sob agitação *overnight*. Após o crescimento, 1 mL de cada cultura foi transferido para microplaca de 96 poços, iniciando o protocolo de miniprep alcalino.

As células foram centrifugadas para obtenção do pellet, ressuscitadas em solução GET e submetidas à lise alcalina com NaOH/SDS, seguida de neutralização com KOAc. As soluções empregadas em cada etapa do protocolo encontram-se na Tabela 2. Em seguida, o lisado foi

clarificado por filtração em placa Millipore, e o DNA plasmidial foi precipitado com isopropanol, lavado com etanol 70% e seco à temperatura ambiente.

O DNA obtido foi ressuspendido em 40 µL de água Milli-Q autoclavada e mantido overnight em temperatura ambiente para completa solubilização, sendo posteriormente armazenado a -20 °C. A qualidade das preparações foi avaliada por espectrofotometria Nanodrop, considerando a razão A260/A280 entre 1,8 e 2,0 como indicativa de pureza adequada para procedimentos subsequentes, conforme critérios amplamente estabelecidos para DNA plasmidial (SAMBROOK; RUSSELL, 2001; GREEN; SAMBROOK, 2012).

Tabela 2: Soluções utilizadas no protocolo de miniprep alcalino em microplaca

Solução	Composição	Observações
GET (Solução 1)	Glicose, EDTA, Tris-HCl	Utilizada para ressuspensão celular.
NaOH/SDS (Solução 2)	NaOH 0,2%; SDS 1%	Promove lise alcalina.
KOAc 3 M (Solução 3)	Acetato de potássio 3 M	Neutralização do lisado.
Etanol 70%	Etanol 70% em água	Lavagem do DNA.
Isopropanol	Puro	Precipitação.
Água Milli-Q autoclavada	—	Ressuspensão final.

3.3.7 Linearização do vetor

Após a obtenção da construção final por meio da técnica de clonagem Golden Gate, o vetor foi submetido à linearização por digestão enzimática utilizando as enzimas de restrição BamHI, HindIII ou XbaI, conforme metodologia previamente descrita por Akamatsu et al. (1997). A escolha dessas enzimas baseou-se na presença de sítios de restrição adequados na sequência do plasmídeo, permitindo a clivagem eficiente do DNA. Dentre as enzimas empregadas, a XbaI foi utilizada especificamente para a confirmação da linearização do vetor, uma vez que apresenta um sítio de restrição único, possibilitando a obtenção de um fragmento linear com o tamanho esperado. Conforme descrito na literatura, a seleção da enzima de restrição para essa etapa não está associada a uma exigência teórica específica, sendo usualmente definida a partir de critérios experimentais e operacionais, podendo diferentes enzimas com características equivalentes ser empregadas para a mesma finalidade (AKAMATSU et al., 1997; SAMBROOK; RUSSELL, 2001; GREEN; SAMBROOK, 2012).

3.3.8 Preparação de protoplasto

Para esta etapa do trabalho, utilizou-se a metodologia adaptada de Cho et al., (2007). O micélio do fungo foi acrescido em 50 mL de meio PD (Potato Dextrose) mantido em agitação a 80 rpm, a 26°C por 4 dias, sendo coletado por centrifugação a 3.000 rpm por 5 minutos. Posteriormente foram lavados com NaCl 0,7 M e digerido em uma suspensão com 10 mg de Kitalase/mL de NaCl 0,7 a 80 rpm, 26°C por aproximadamente 4 horas. Após o período da digestão, foi feita uma análise microscópica para qualificar e quantificar os protoplastos. Por fim foi retirado o sobrenadante – o qual foi filtrado e lavado com solução de NaCl 0,7 M – para centrifugá-lo a 3000 rpm durante 10 minutos, buscando separar os protoplastos em uma interface. Descartou-se o sobrenadante e realizou-se uma nova lavagem com STC (1 M sorbitol, 50 mM CaCl₂ e 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) e centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos para a separação dos detritos celulares, hifas e peletização dos protoplastos. Estes últimos foram ressuspendidos suavemente em 500 µL de STC para uma concentração final de $1,25 \times 10^8$ /mL.

3.3.9 Transformação genética de *A. alternata* mediada por PEG/Ca²⁺

Após a obtenção dos protoplastos de *A. alternata* e do vetor previamente linearizado, a transformação genética foi realizada por meio de um protocolo baseado em PEG/Ca²⁺, adaptado a partir da metodologia descrita por Li et al. (2018). Inicialmente, os protoplastos foram ressuspendidos em solução osmoticamente estabilizada, de forma a preservar sua integridade estrutural. Em seguida, o DNA plasmidial linearizado foi adicionado à suspensão de protoplastos, procedendo-se à incubação na presença de íons Ca²⁺, etapa fundamental para favorecer a associação do DNA exógeno à membrana plasmática. Posteriormente, foi adicionada solução contendo polietilenoglicol (PEG), promovendo a permeabilização transitória da membrana celular e possibilitando a internalização do DNA. Após o período de incubação, os protoplastos foram submetidos a etapas de recuperação em meio apropriado e, posteriormente, plaqueados em meio seletivo para a obtenção dos transformantes.

Protocolos de transformação mediados por PEG/Ca²⁺ têm sido amplamente utilizados em estudos envolvendo fungos filamentosos, incluindo espécies do gênero *Alternaria*, devido à sua eficiência, simplicidade e reprodutibilidade (FINCHAM, 1989; RUIZ-DÍEZ, 2002; AKAMATSU et al., 1997). Trabalhos anteriores demonstram que adaptações pontuais nas condições do protocolo, como tempo de incubação, concentração de PEG e condições osmóticas, são frequentemente necessárias para otimizar a transformação em diferentes espécies fúngicas, sem comprometer a eficiência do processo (LI et al., 2018). Dessa forma, a metodologia adotada

neste estudo encontra-se em consonância com abordagens previamente estabelecidas para a transformação genética de *A. alternata* e outros fungos filamentosos.

4. RESULTADOS

4.1 Crescimento, manutenção e esporulação de *Alternaria alternata*

A viabilidade do fungo *A. alternata* manteve-se estável ao longo de todo o período experimental, indicando que o protocolo de manutenção adotado foi eficiente. A repicagem periódica em placas de Petri contendo meio Citros permitiu a preservação do micélio e a manutenção do vigor das culturas, sem alterações morfológicas indicativas de estresse ou degeneração fúngica.

O crescimento micelial foi observado de forma consistente ao longo das repicagens, apresentando colônias com características fenotípicas típicas da espécie, como coloração escura e padrão de crescimento radial (Figura 2A–C).

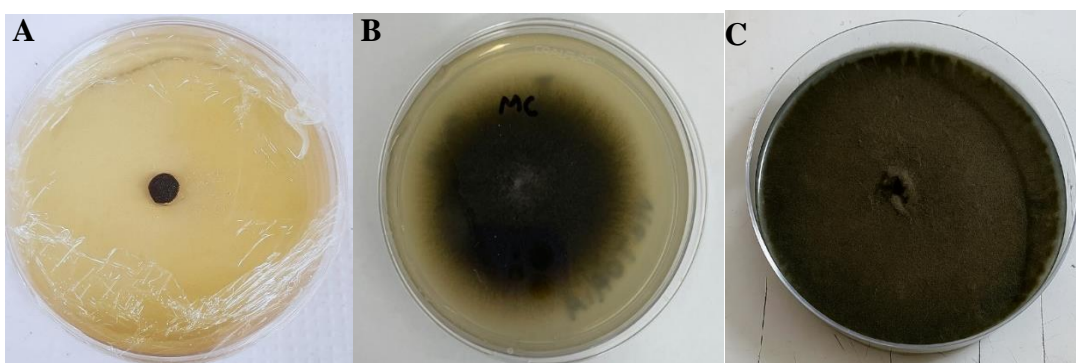


Figura 2: Crescimento e manutenção de *A. alternata* em meio Citros. (A) Estágio inicial de crescimento micelial; (B) Colônia em desenvolvimento e (C) Colônia completamente desenvolvida.

As imagens macroscópicas evidenciam a progressão do crescimento fúngico e a manutenção da morfologia característica de *A. alternata* em diferentes momentos de cultivo. Além disso, as culturas apresentaram elevada capacidade de esporulação, confirmada tanto pela observação visual das colônias quanto pela análise microscópica (Figura 3).

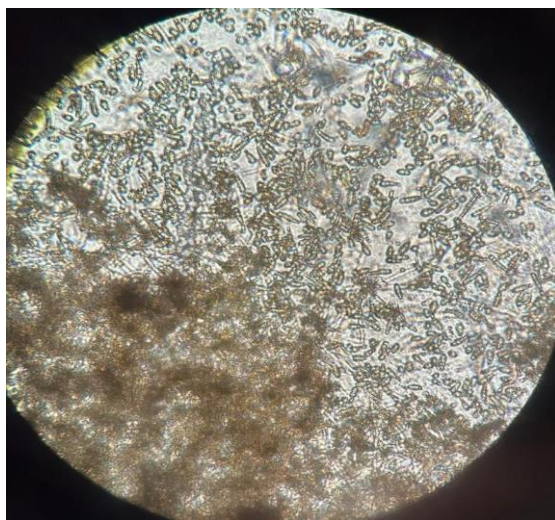


Figura 3: Observação microscópica da esporulação de *A. alternata* cultivada em meio Citros. Micrografia evidenciando a produção abundante de conídios com morfologia característica da espécie, confirmando a manutenção da capacidade reprodutiva do fungo nas condições de cultivo utilizadas.

A observação em microscopia óptica revelou abundante produção de conídios, com morfologia compatível com as descrições clássicas para *A. alternata*, indicando a preservação da capacidade reprodutiva do fungo após sucessivas repicagens em meio Citros (Figura 3). Esses resultados demonstram que o material fúngico manteve-se fisiologicamente ativo e adequado para a realização das etapas experimentais subsequentes.

Resultados semelhantes foram reportados em estudos anteriores, nos quais a manutenção de *Alternaria spp.* em meios de cultivo apropriados favoreceu tanto o crescimento micelial quanto a esporulação, contribuindo para a estabilidade das culturas em condições laboratoriais (ROTEM, 1994; CHUNG, 2012). De forma consistente, Akamatsu et al. (1997) destacaram que a preservação das características fenotípicas e reprodutivas de *A. alternata* é um fator essencial para o sucesso de análises genéticas e moleculares subsequentes.

Assim, os resultados obtidos indicam que o protocolo de manutenção adotado neste estudo foi eficiente para preservar a viabilidade, a morfologia e a capacidade de esporulação de *A. alternata* ao longo do período experimental.

4.2 Determinação da concentração de higromicina B para seleção de transformantes de *A. alternata*

Com o objetivo de definir a concentração adequada de higromicina B a ser utilizada como agente seletivo nas construções gênicas e validar o uso do gene de resistência a esse antibiótico no cassete de transformação, avaliou-se a suscetibilidade de *A. alternata* à higromicina B. Esse

antibiótico é amplamente empregado como marcador seletivo em protocolos de transformação genética de *A. alternata* (AKAMATSU et al., 1997; ISSHIKI et al., 2001; ISSHIKI et al., 2003; RODRIGUES, 2018), bem como em outros fungos filamentosos (SANTOS, 2009; RODRIGUES, 2010).

O crescimento micelial do fungo foi inicialmente avaliado em placas controle, sem adição de higromicina B, nas quais se observou o início do crescimento após aproximadamente dois dias de incubação, com colonização completa da superfície da placa ao final de cerca de três semanas (Figura 4A). Na presença de 30 mg/L de higromicina B, o crescimento micelial ocorreu de forma mais lenta, tornando-se visível após aproximadamente sete dias, com diâmetro médio de 2,6 cm ao término do período experimental (Figura 4B). Em meio suplementado com 50 mg/L do antibiótico, o crescimento foi ainda mais restrito, sendo observado somente após cerca de 12 dias de incubação, atingindo diâmetro máximo de 1,7 cm (Figura 4C).

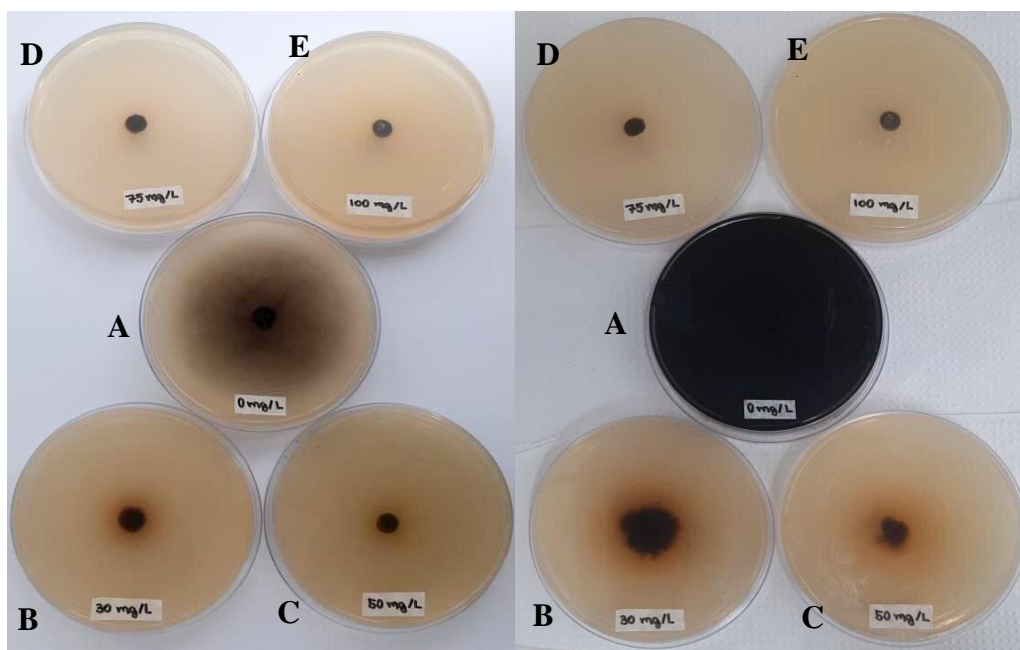


Figura 4: Crescimento de *A. alternata* em meio Citros suplementado com diferentes concentrações de higromicina B. (A) Controle, sem adição de higromicina B (0 mg L⁻¹); (B) 30 mg L⁻¹; (C) 50 mg L⁻¹; (D) 75 mg L⁻¹; (E) 100 mg L⁻¹. As imagens foram obtidas após o período de incubação e evidenciam redução progressiva do crescimento micelial nas concentrações de 30 e 50 mg L⁻¹, bem como inibição completa do crescimento nas concentrações de 75 e 100 mg L⁻¹.

Por outro lado, nas placas contendo 75 mg/L e 100 mg/L de higromicina B, não foi observado crescimento micelial durante todo o período de incubação, evidenciando inibição completa do desenvolvimento fúngico nessas concentrações (Figuras 4D e 4E). A comparação

dos valores de crescimento observados nas diferentes concentrações está sumarizada na Tabela 3, que apresenta os dados descritivos do diâmetro micelial de *A. alternata* em resposta ao aumento da concentração do antibiótico.

Tabela 3: Crescimento micelial de *A. alternata* em diferentes concentrações de higromicina B

Concentração (mg/L)	Crescimento micelial observado	Diâmetro médio (cm)
0 (controle)	Crescimento pleno	Placa colonizada
30	Crescimento reduzido	2,6
50	Crescimento fortemente reduzido	1,7
75	Ausente	0
100	Ausente	0

A análise conjunta dos dados evidenciou uma relação inversa entre a concentração de higromicina B e o crescimento micelial do fungo, caracterizando um efeito dose-dependente. Essa tendência foi claramente visualizada no gráfico apresentado na Figura 5, no qual se observa redução progressiva do crescimento nas concentrações de 30 e 50 mg/L, seguida de inibição completa a partir de 75 mg/L. Esses resultados indicam que concentrações iguais ou superiores a 75 mg/L de higromicina B são eficazes para a seleção de transformantes de *A. alternata*.

Relação entre a concentração de higromicina B e o crescimento micelial de *Alternaria alternata*

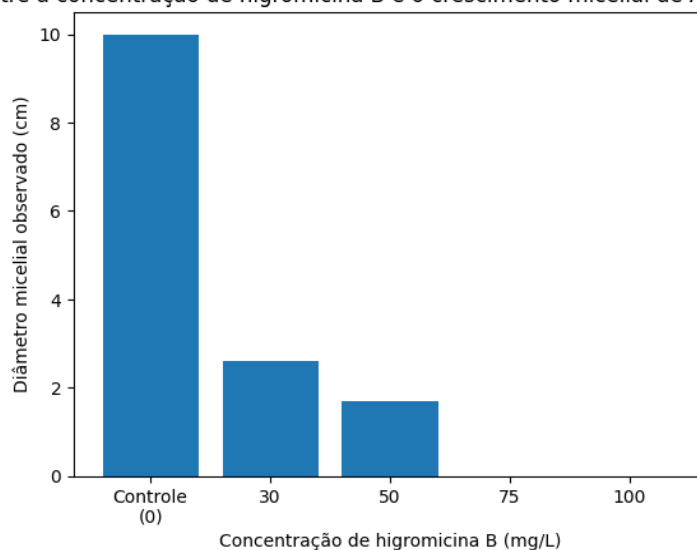


Figura 5: Efeito da higromicina B sobre o crescimento micelial de *A. alternata*. O gráfico representa o diâmetro micelial observado após o cultivo em meio suplementado com diferentes concentrações de higromicina B. Observa-se redução progressiva do crescimento com o aumento da concentração do antibiótico, com inibição completa a partir de 75 mg L⁻¹.

4.3 Integridade do DNA genômico de *A. alternata*

A qualidade e a integridade do DNA genômico extraído de *A. alternata* patótipo tangerina foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose (Figura 6). Observou-se a presença de uma banda única, intensa e bem definida, com migração correspondente a fragmentos de alto peso molecular, posicionada acima do marcador de 1 kb, indicando tamanho estimado superior a 10 kb, conforme esperado para DNA genômico íntegro de fungos filamentosos. A ausência de smear ao longo do gel evidencia que o material genético não apresentou degradação significativa durante o processo de extração.

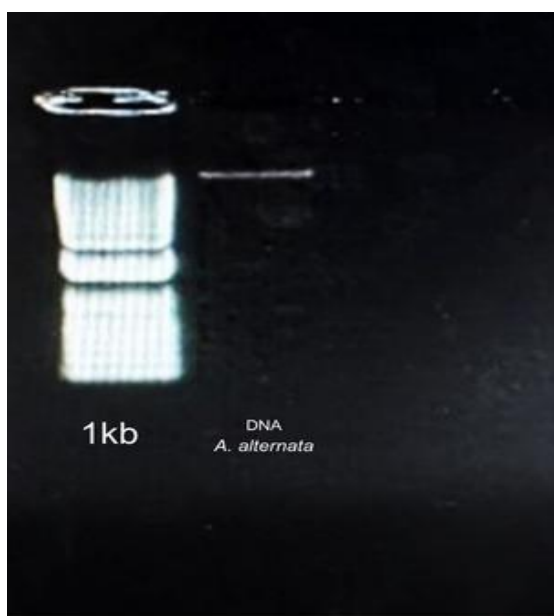


Figura 6: Análise da integridade do DNA genômico de *A. alternata* por eletroforese em gel de agarose. DNA genômico extraído de *A. alternata* patótipo tangerina analisado em gel de agarose a 0,7%, evidenciando a presença de uma banda única e intensa de alto peso molecular, com migração superior a 10 kb, conforme comparação com o marcador de peso molecular de 1 kb. A ausência de smear ao longo do gel indica boa integridade do DNA e baixa degradação, demonstrando a adequação do material para análises moleculares subsequentes.

O padrão observado é compatível com DNA genômico de *A. alternata*, cujo genoma apresenta tamanho aproximado entre 32 e 35 Mb, distribuído em múltiplos cromossomos, resultando em fragmentos de grande extensão quando extraídos de forma íntegra (DANG et al., 2015; WANG et al., 2016). Resultados semelhantes foram descritos por Akamatsu et al. (1997) e ISSHIKI et al. (2001), que relataram a obtenção de DNA genômico de *A. alternata* com migração restrita à região de alto peso molecular em géis de agarose a 0,7%, adequado para aplicações subsequentes como PCR, clonagem e análises de integração gênica.

Além disso, a qualidade do DNA obtido neste estudo mostrou-se comparável àquela reportada em outros fungos fitopatogênicos filamentosos, como *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*, nos quais a visualização de bandas concentradas acima de 10 kb é considerada indicativa de extrações bem-sucedidas e compatíveis com protocolos de transformação genética (SANTOS, 2009; RODRIGUES, 2010). Dessa forma, os resultados confirmaram que o DNA genômico extraído de *A. alternata* patótipo tangerina apresentou integridade estrutural adequada para as análises moleculares subsequentes desenvolvidas neste trabalho.

4.4 Amplificação dos fragmentos gênicos por PCR

As amostras foram submetidas à amplificação por PCR ‘Polymerase Chain Reaction’ utilizando pares de *primers* específicos para os genes AALT_g5837, AALT_g5454 e AALT_g10699 (ALTmutTF), com o objetivo de confirmar a amplificação dos fragmentos alvo e avaliar a eficiência das condições empregadas. A análise dos produtos amplificados por eletroforese em gel de agarose revelou padrões de bandas distintos, compatíveis com os tamanhos esperados para cada gene (Figura 7).

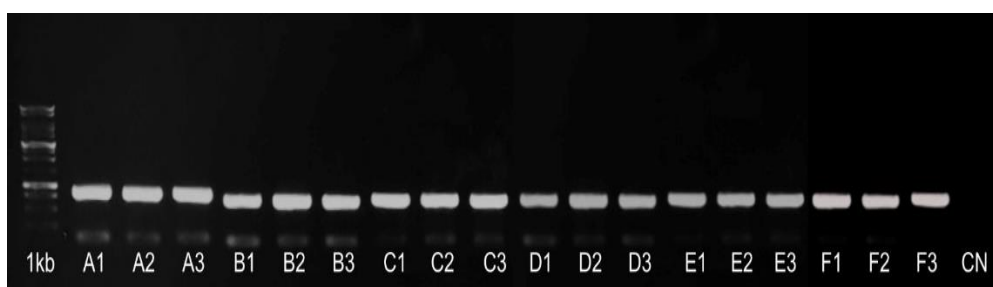


Figura 7: Amplificação dos genes AALT_g5837, AALT_g5454 e AALT_g10699 por PCR. Produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos genes AALT_g5837, AALT_g5454 e AALT_g10699 (ALTmutTF), utilizando pares de *primers* específicos para as regiões direita (Rig) e esquerda (Left) de cada gene. As amostras foram amplificadas em diferentes temperaturas de anelamento (53 °C, 55 °C e 57 °C). As bandas correspondentes ao gene AALT_g5454 apresentaram tamanho aproximado de 168 pb, enquanto os fragmentos amplificados para o gene AALT_g10699 migraram na região de ~117 pb. Para o gene AALT_g5837, observaram-se fragmentos com migração entre 800 pb e 1 kb, conforme estimado por comparação com o marcador de peso molecular (1 kb). O marcador de peso molecular está indicado à esquerda do gel. O controle negativo (CN) não apresentou amplificação, confirmando a ausência de contaminação nas reações.

Para o gene AALT_g5454, amplificado com os pares de *primers* correspondentes às regiões direita (Rig) e esquerda (Left), observou-se a formação de bandas únicas e bem

definidas, migrando na região correspondente a aproximadamente 168 pb, conforme previsto a partir do desenho dos oligonucleotídeos. De modo semelhante, à amplificação do gene AALT_g10699 (ALTmutTF) resultou em fragmentos com migração compatível com ~117 pb, posicionados abaixo da marca de 150 pb do marcador de peso molecular, corroborando a especificidade da amplificação.

Em relação ao gene AALT_g5837, embora o tamanho exato do fragmento não tenha sido previamente determinado, as bandas obtidas apresentaram migração entre 800 pb e 1 kb, conforme estimado pela comparação direta com o marcador de peso molecular de 1 kb. Esse padrão foi consistente entre as diferentes condições avaliadas, indicando a amplificação reprodutível do fragmento alvo.

As amplificações por PCR 'Polymerase Chain Reaction' foram conduzidas em diferentes temperaturas de anelamento (53 °C, 55 °C e 57 °C), não sendo observadas variações significativas no tamanho dos fragmentos ou na definição das bandas, o que indica que a amplificação dos genes analisados ocorreu de forma específica e independente da temperatura de anelamento dentro da faixa testada. A intensidade das bandas foi consistente para todos os genes avaliados, refletindo eficiência adequada da reação.

O controle negativo (CN) não apresentou qualquer banda amplificada, confirmando a ausência de contaminação e validando os resultados obtidos. Resultados semelhantes quanto à amplificação específica e reprodutível de fragmentos gênicos por PCR 'Polymerase Chain Reaction' já foram descritos para *A. alternata* e outros fungos filamentosos, sendo esta abordagem amplamente empregada para a confirmação molecular de construções gênicas e validação de *primers* específicos (AKAMATSU et al., 1997; ISSHIKI et al., 2001; ISSHIKI et al., 2003; RODRIGUES, 2018; SANTOS, 2009).

4.5 Construção do vetor para geração de mutantes por substituição gênica

Durante o processo de montagem, o cassete de expressão presente no vetor pALTmut01, juntamente com as regiões flanqueadoras previamente amplificadas, foi inserido no sítio de clonagem BbsI do vetor receptor pUC57-Kan_Bbs (Figura 8), região originalmente ocupada pelo gene *lacZ*. Essa inserção resultou na inativação do gene *lacZ* e permitiu a obtenção do vetor recombinante contendo o cassete completo flanqueado pelas sequências homólogas específicas de cada gene-alvo.

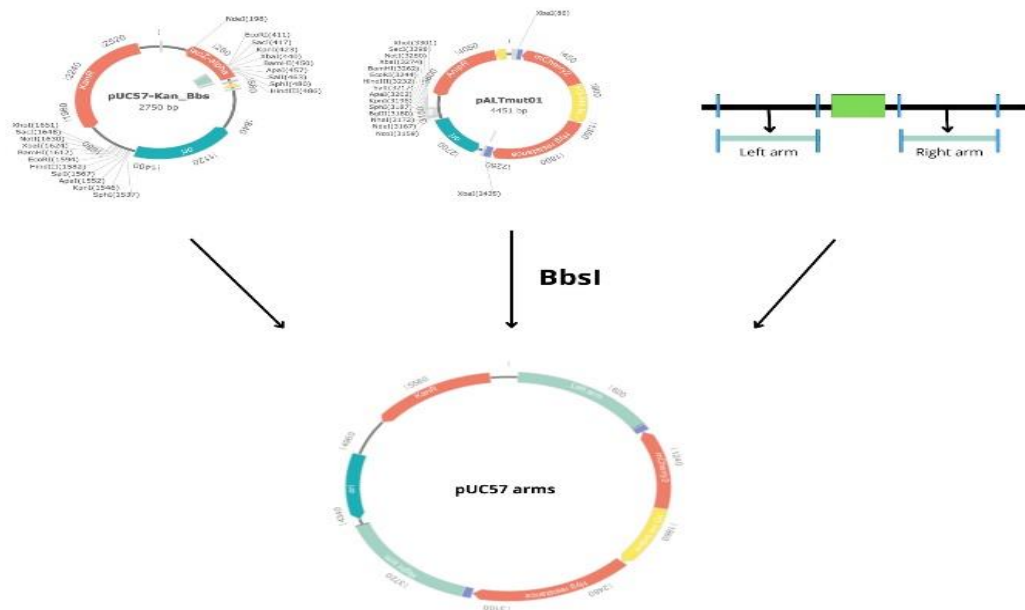


Figura 8: Esquema da construção do vetor pUC57-arms para substituição gênica em *A. alternata*. Representação esquemática do sistema de clonagem utilizando o vetor doador pALTmut01, contendo um cassete de expressão composto por promotor bidirecional, gene repórter mCherry, gene de resistência à higromicina B e dois terminadores, e o vetor receptor pUC57-Kan_Bbs, originalmente portador do gene *lacZ*. O cassete completo, flanqueado pelas regiões homólogas Left e Right (arms) correspondentes aos genes AALT_g5837, AALT_g5454 e AALT_g10699, foi inserido no sítio de clonagem BbsI, substituindo o gene *lacZ* e resultando na geração do vetor recombinante pUC57-arms, destinado à substituição gênica por recombinação homóloga no genoma de *A. alternata*.

Durante o processo de montagem, o cassete presente no vetor pALTmut01 foi transferido para o vetor receptor pUC57-Kan_Bbs, juntamente com as regiões flanqueadoras previamente amplificadas. Essas regiões correspondem às sequências a montante e a jusante dos genes-alvo e são essenciais para direcionar a recombinação homóloga, permitindo a substituição precisa da região gênica endógena pelo cassete de interesse durante o processo de nocaute. A inserção do cassete e das regiões flanqueadoras no vetor receptor resultou na inativação do gene *lacZ*, originalmente presente no pUC57, funcionando como marcador adicional de confirmação da clonagem correta.

Como resultado desse processo, obteve-se o vetor recombinante denominado pUC57-arms, que contém o cassete de expressão flanqueado pelas regiões homólogas específicas de cada gene-alvo. Esse vetor foi destinado às etapas subsequentes de transformação de *A. alternata*, atuando como a construção responsável por mediar a substituição gênica específica

no genoma do fungo, conforme descrito para sistemas de nocaute gênico baseados em recombinação homóloga em fungos filamentosos (AKAMATSU et al., 1997; ISSHIKI et al., 2001; RODRIGUES, 2018).

4.6 Transformação da *E. coli*

A avaliação das placas de transformação permitiu a distinção clara entre colônias recombinantes e não recombinantes por meio do ensaio de azul/branco, baseado na funcionalidade do gene *lacZ* presente no vetor receptor (Figura 9). As colônias azuis observadas indicaram a expressão funcional da enzima β -galactosidase, resultante da manutenção do gene *lacZ* íntegro. Nesses casos, a enzima promoveu a clivagem do substrato cromogênico X-gal, originando o produto azul característico, o que evidencia a ausência de inserção do cassete de interesse no sítio de clonagem (SAMBROOK & RUSSELL, 2001; GREEN & SAMBROOK, 2012).

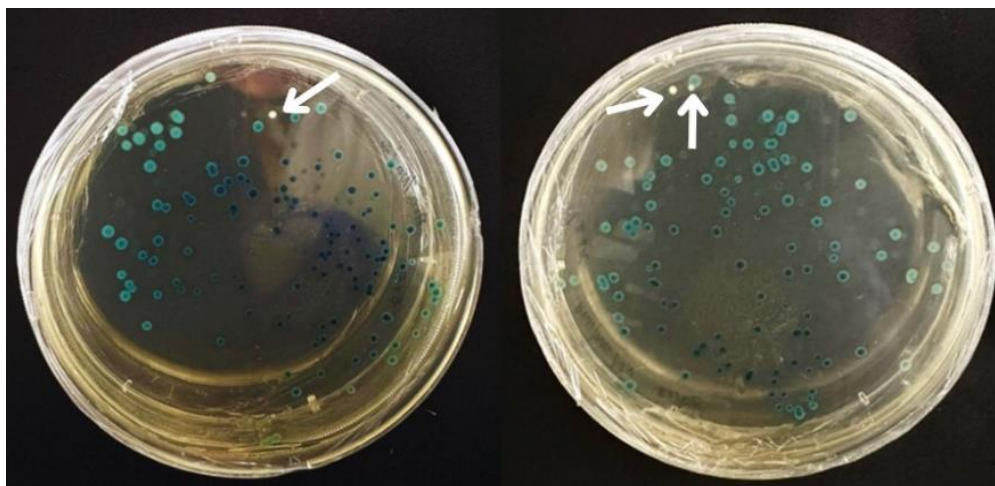


Figura 9: Placas de transformação de *E. coli* submetidas ao ensaio de azul/branco. Placas de transformação de *E. coli* após incubação em meio suplementado com X-gal e IPTG, evidenciando colônias azuis e brancas. As colônias brancas, destacadas na imagem, indicam a inativação do gene *lacZ* em decorrência da inserção do cassete de interesse no vetor receptor.

Em contraste, a presença de colônias brancas representou o resultado de maior relevância experimental. A ausência de coloração azul nessas colônias indicou a interrupção funcional do gene *lacZ*, decorrente da inserção bem-sucedida do cassete de expressão no sítio de clonagem do vetor receptor. A inativação do gene *lacZ* impediu a produção da β -galactosidase, impossibilitando a metabolização do X-gal e resultando, conseqüentemente, na formação de colônias brancas. Esse padrão é amplamente reconhecido como um indicativo confiável da

obtenção de clones recombinantes corretamente construídos (VIEIRA & MESSING, 1982; SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

Os resultados observados neste estudo estão em consonância com aqueles descritos em trabalhos que empregaram vetores derivados de pUC para clonagem molecular e seleção de recombinantes em sistemas bacterianos, nos quais a interrupção do gene *lacZ* é utilizada como estratégia eficiente para triagem inicial de clones positivos (YANISCH-PERRON et al., 1985; GREEN & SAMBROOK, 2012). Dessa forma, a predominância de colônias brancas nas placas de transformação corroborou a eficiência do processo de clonagem e confirmou a correta inserção do cassete de interesse no vetor receptor, validando essa etapa como adequada para a obtenção das construções gênicas destinadas às análises subsequentes.

4.7 Minipreparação de DNA plasmidial dos clones recombinantes

Após a confirmação das colônias transformadas, procedeu-se à minipreparação do DNA plasmidial com o objetivo de recuperar os vetores recombinantes obtidos na etapa de clonagem. A extração foi realizada por meio de um protocolo em formato de 96 poços, permitindo o processamento simultâneo de múltiplos clones e garantindo uniformidade nas condições experimentais.

O DNA plasmidial recuperado apresentou integridade estrutural compatível com aplicações de digestão enzimática, conforme verificado pela manutenção das formas plasmidiais características e pela ausência de sinais evidentes de degradação. Além disso, a quantidade obtida foi suficiente para a realização das etapas subsequentes do estudo, incluindo a linearização dos vetores recombinantes para uso nos experimentos posteriores. Esses critérios são considerados adequados para DNA plasmidial destinado a análises moleculares em protocolos de clonagem e manipulação genética (SAMBROOK & RUSSELL, 2001; GREEN & SAMBROOK, 2012).

Dessa forma, a minipreparação em 96 poços permitiu a obtenção eficiente dos vetores recombinantes, viabilizando a continuidade das análises experimentais previstas neste trabalho.

4.8 Linearização e confirmação do tamanho dos vetores recombinantes

Os vetores recombinantes obtidos após a etapa de clonagem foram submetidos à digestão com a enzima de restrição XbaI com o objetivo de promover a linearização do DNA plasmidial previamente à transformação fúngica. A escolha da enzima XbaI baseou-se na presença de um sítio de clivagem único nas construções geradas, permitindo a linearização completa do vetor e

a verificação direta do tamanho esperado das construções, sem interferir nas regiões funcionais do cassete ou nas sequências homólogas inseridas. Essa estratégia é amplamente utilizada em estudos de transformação fúngica como etapa de validação estrutural de vetores recombinantes (AKAMATSU et al., 1997; ISSHIKI et al., 2001; RODRIGUES, 2018). A análise em gel de agarose demonstra o padrão de migração característico de plasmídeos linearizados, com redução da mobilidade em relação à forma circular, confirmando a ação das enzimas de restrição utilizadas.

A análise dos produtos de digestão por eletroforese em gel de agarose revelou um padrão de migração compatível com DNA plasmidial linearizado, caracterizado pela redução da mobilidade eletroforética em relação às formas circulares superenoveladas (Figura 10). Observou-se a presença de um fragmento com tamanho aproximado de 1,3 kb, correspondente ao vetor pALT, e de um fragmento de aproximadamente 2,0 kb, referente ao vetor pUC, valores consistentes com os tamanhos previstos para cada uma das construções individuais.

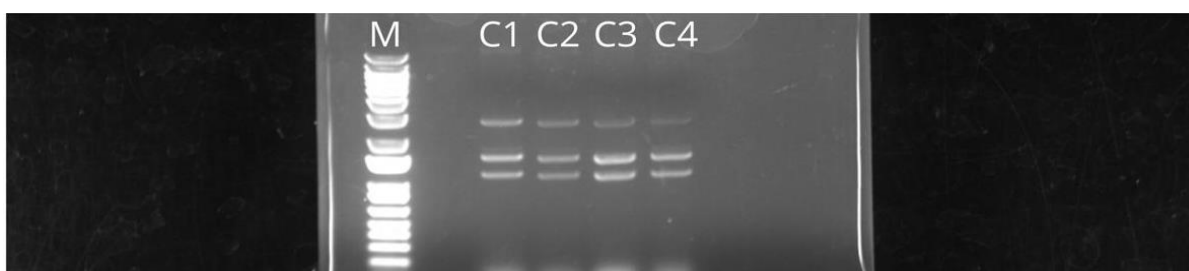


Figura 10: Análise da linearização dos vetores por eletroforese em gel de agarose. Eletroforese em gel de agarose a 0,7% realizada para a confirmação da linearização dos vetores recombinantes após digestão enzimática com XbaI. M: marcador de peso molecular 1 kb Plus (Thermo Fisher Scientific); C1, C2, C3 e C4: amostras de DNA plasmidial obtidas a partir de colônias transformadas de *E. coli*, evidenciando fragmentos linearizados de aproximadamente 1,3 kb (vetor pALT) e 2,0 kb (vetor pUC), compatíveis com o tamanho final estimado de ~3,3 kb da construção recombinante.

A partir da soma desses fragmentos, foi possível confirmar que o tamanho final do vetor recombinante linearizado correspondeu a aproximadamente 3,3 kb, em concordância com o desenho experimental proposto para a construção do vetor destinado à substituição gênica. Resultados semelhantes, empregando a digestão enzimática como ferramenta para confirmação do tamanho e integridade de vetores recombinantes antes da transformação, têm sido amplamente descritos para *A. alternata* e outros fungos filamentosos (AKAMATSU et al., 1997; SANTOS, 2009; RODRIGUES, 2010).

Dessa forma, a digestão com XbaI permitiu confirmar tanto a linearização eficiente quanto o tamanho esperado da construção final, validando essa etapa como adequada para o prosseguimento dos ensaios de transformação genética de *A. alternata*.

4.9 Obtenção e avaliação de protoplastos de *A. alternata*

As hifas de *A. alternata* foram cultivadas por quatro dias em meio PD, sob condições de agitação contínua, promovendo o crescimento vegetativo e a formação de micélio adequado para a etapa subsequente de protoplastização, conforme evidenciado na Figura 11. O período de incubação adotado mostrou-se suficiente para a obtenção de biomassa fúngica jovem e metabolicamente ativa, característica considerada favorável para a digestão enzimática da parede celular em fungos filamentosos (PEBERDY, 1990; LI et al., 2018).

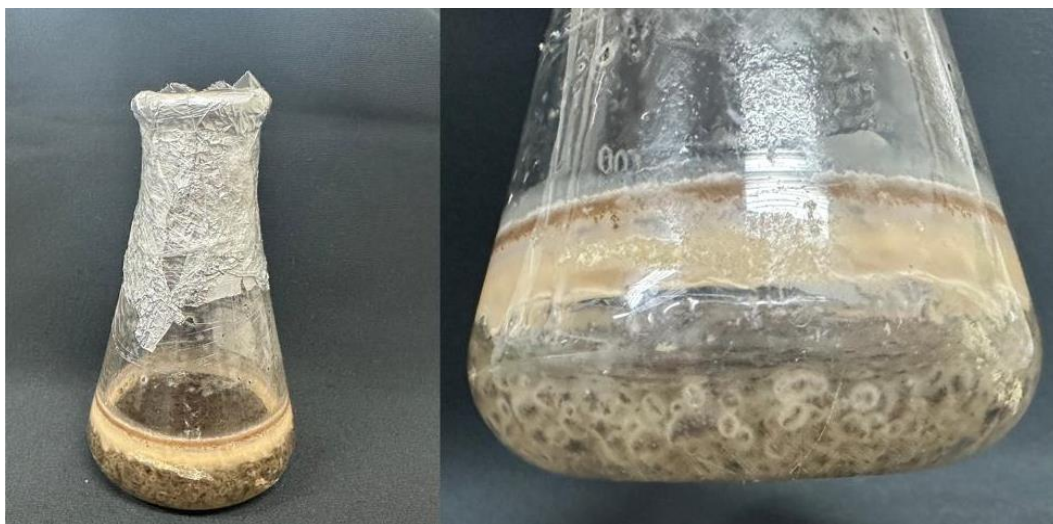


Figura 11: Formação de micélio de *A. alternata* após cultivo em meio líquido. Formação de micélio fúngico de *A. alternata* após a inoculação de hifas em meio PD, incubadas por quatro dias sob agitação contínua, evidenciando o crescimento vegetativo adequado para a etapa de protoplastização.

A digestão da parede celular foi realizada com a enzima Kitalase, resultando na liberação eficiente de protoplastos e na formação de uma suspensão homogênea, conforme apresentado na Figura 12. A análise microscópica revelou células predominantemente esféricas, com membranas bem preservadas e ausência de fragmentos hifais aparentes, indicando a eficiência do processo enzimático empregado. Resultados semelhantes foram descritos em estudos de transformação genética de *A. alternata* e de outros fungos filamentosos, nos quais a utilização

de enzimas líticas adequadas é determinante para a obtenção de protoplastos viáveis e estruturalmente íntegros (AKAMATSU et al., 1997; ISSHIKI et al., 2001; LI et al., 2018).

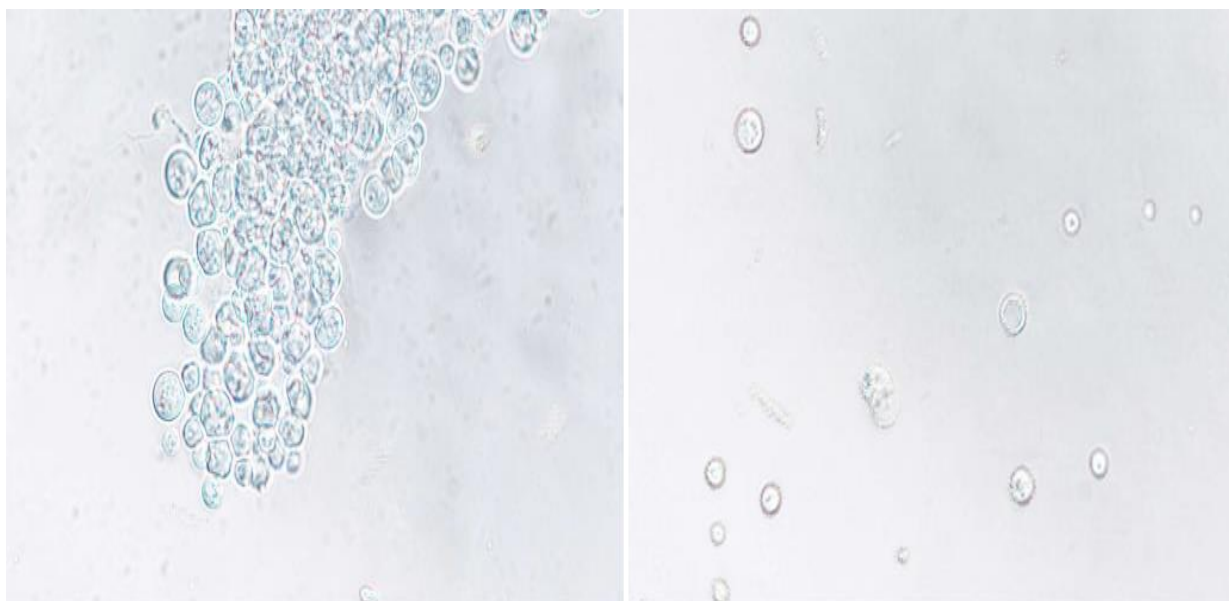


Figura 12: Protoplastos de *A. alternata* obtidos por digestão enzimática. Protoplastos de *A. alternata* obtidos após digestão enzimática das hifas com Kitalase, observados em microscopia óptica, apresentando morfologia esférica e integridade celular preservada, o que evidencia a eficiência do processo de remoção da parede celular.

A quantificação dos protoplastos, realizada em câmara de Neubauer, revelou uma concentração média de $1,25 \times 10^8$ protoplastos/mL, valor compatível com aqueles reportados na literatura para ensaios de transformação mediados por PEG/ Ca^{2+} em fungos filamentosos. Essa concentração é considerada adequada para garantir eficiência na etapa de transformação genética, sem comprometer a viabilidade celular (PEBERDY, 1990; SANTOS, 2009; RODRIGUES, 2018).

Em conjunto, os resultados obtidos confirmaram que as condições de cultivo, digestão enzimática e quantificação adotadas foram apropriadas para a obtenção de protoplastos viáveis de *A. alternata*, possibilitando o prosseguimento dos ensaios de transformação genética descritos neste trabalho.

4.10 Regeneração micelial após transformação mediada por PEG/ Ca^{2+}

A transformação de *A. alternata* foi conduzida pelo método mediado por PEG/ Ca^{2+} , utilizando o vetor previamente linearizado. Após o período de recuperação em meio regenerativo e posterior transferência para meio seletivo suplementado com higromicina B, as placas foram

monitoradas diariamente ao longo de 15 dias com auxílio de lupa estereoscópica. Durante o período de incubação, observou-se o surgimento de estruturas fúngicas compatíveis com processos iniciais de regeneração celular, caracterizadas pela formação de massas miceliais compactas, de coloração escura, associadas ao aparecimento de hifas finas e pouco ramificadas (Figura 13). Essas estruturas surgiram de forma localizada no meio seletivo, sugerindo a sobrevivência e a retomada do crescimento celular após o processo de protoplastização e transformação.

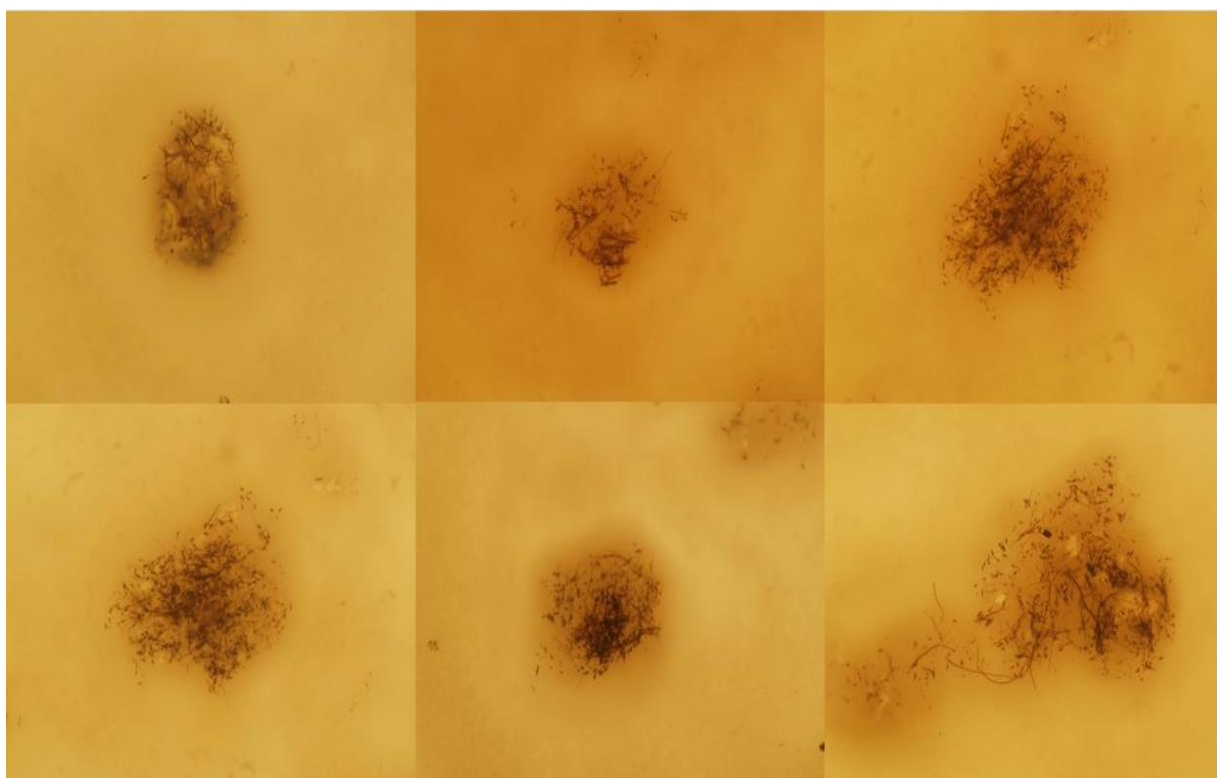


Figura 13: Estruturas miceliais observadas após transformação de *A. alternata* pelo método PEG/Ca²⁺. Aspectos morfológicos observados após a transformação de protoplastos de *A. alternata* pelo método mediado por PEG/Ca²⁺ e incubação em meio seletivo contendo higromicina B por até 15 dias. As imagens evidenciam a formação de massas celulares escuras e a presença de hifas finas, compatíveis com processos iniciais de regeneração micelial. A confirmação dos eventos de transformação requer análises moleculares e funcionais adicionais.

Entretanto, embora esses aspectos morfológicos sejam frequentemente descritos na literatura como indicativos iniciais de regeneração de protoplastos transformados em fungos filamentosos, eles não permitem, isoladamente, a confirmação inequívoca da obtenção de mutantes estáveis. Estudos prévios demonstram que eventos de regeneração parcial ou crescimento residual também podem ocorrer a partir de protoplastos não transformados ou de

células que apresentem tolerância temporária ao agente seletivo (AKAMATSU et al., 1997; LI et al., 2018; SANTOS, 2009).

Dessa forma, os resultados observados indicam compatibilidade morfológica com processos iniciais de regeneração micelial, mas não permitem afirmar de maneira conclusiva que as estruturas observadas correspondam a transformantes contendo a inserção correta do cassete gênico. Trabalhos semelhantes em *A. alternata* e em outros fungos filamentosos destacam a necessidade de etapas adicionais de validação molecular e funcional para a confirmação dos eventos de transformação (ISSHIKI et al., 2001; ISSHIKI et al., 2003; RODRIGUES, 2018). Nesse contexto, a confirmação definitiva dos mutantes requer análises complementares, incluindo PCRs diagnósticos direcionados às regiões de integração do cassete, avaliação da expressão do gene repórter mCherry por microscopia de fluorescência e, quando necessário, o sequenciamento das regiões flanqueadoras para comprovar a inserção homóloga no locus alvo. Estratégias semelhantes são amplamente empregadas e recomendadas na literatura para assegurar a correta obtenção de mutantes por recombinação homóloga em fungos filamentosos (AKAMATSU et al., 1997; LI et al., 2018).

Assim, os resultados obtidos nesta etapa demonstram que o protocolo de transformação e regeneração adotado foi tecnicamente adequado para *A. alternata*, permitindo a sobrevivência celular em meio seletivo, ao passo que as análises subsequentes serão fundamentais para a confirmação molecular e funcional dos mutantes gerados.

5.DISSCUSSÃO

A construção e validação de ferramentas moleculares eficientes para *A. alternata* representaram um passo essencial para o avanço de estudos de genômica funcional em fungos fitopatogênicos. Ao longo deste trabalho, buscou-se estabelecer um fluxo experimental reprodutível, desde a definição das condições seletivas até a montagem de um vetor modular capaz de direcionar a substituição gênica por recombinação homóloga. A estabilidade do crescimento micelial e a manutenção da viabilidade do fungo ao longo dos experimentos indicaram que as condições de cultivo adotadas foram adequadas para sustentar as etapas subsequentes, conforme descrito previamente para espécies do gênero *Alternaria* (ROTEM, 1994; CHUNG, 2012).

A avaliação da sensibilidade de *A. alternata* à higromicina B evidenciou um efeito dose-dependente, culminando na inibição completa do crescimento micelial a partir de 75 mg L⁻¹. Esse resultado foi determinante para a definição da pressão seletiva empregada nas etapas de transformação. Estudos prévios demonstram que a concentração efetiva de higromicina pode

variando entre espécies e até mesmo entre isolados de um mesmo fungo, tornando imprescindível a padronização experimental antes da seleção de transformantes (AKAMATSU et al., 1997; ISSHIKI et al., 2001). Assim, a concentração estabelecida neste trabalho foi coerente com valores descritos para fungos filamentosos fitopatogênicos e adequada para assegurar a eliminação de células não transformadas.

A confirmação da integridade do DNA genômico e à amplificação específica das regiões flanqueadoras dos genes AALT_g5454 e AALT_g10699 indicaram que os fragmentos selecionados apresentaram qualidade e especificidade suficientes para aplicação em estratégias de recombinação homóloga. A utilização de braços homólogos bem caracterizados é amplamente reconhecida como um fator crítico para aumentar a eficiência de substituição gênica direcionada e reduzir eventos de integração ectópica (ISSHIKI et al., 2003; TURGEON, 2010). A robustez das amplificações, observada em diferentes temperaturas de anelamento, reforçou a confiabilidade das sequências obtidas para uso na construção vetorial.

O vetor desenvolvido neste estudo foi baseado em uma arquitetura modular, contendo um promotor bidirecional, o gene de resistência à higromicina B e o gene repórter mCherry, flanqueados por braços de homologia específicos. Essa organização estrutural seguiu princípios já consolidados na literatura para fungos filamentosos, nos quais a modularidade permite a reutilização do backbone vetorial para diferentes genes-alvo mediante a simples substituição das regiões flanqueadoras (AKAMATSU et al., 1997; ISSHIKI et al., 2001). Dessa forma, o sistema proposto apresenta caráter transferível e adaptável, possibilitando sua aplicação em estudos futuros com outros genes e, potencialmente, em outras espécies fúngicas.

A obtenção de protoplastos viáveis e em concentração adequada constituiu uma etapa crítica para o sucesso da transformação. A digestão enzimática das paredes celulares resultou em células esféricas, morfologicamente preservadas, compatíveis com descrições clássicas de protoplastos fúngicos utilizados em transformações mediadas por PEG/Ca²⁺ (TURGEON, 2010). A concentração obtida foi considerada apropriada para maximizar a eficiência de transformação, conforme relatado em estudos recentes com fungos filamentosos (LI et al., 2018).

A regeneração micelial observada em meio seletivo contendo higromicina B representou um indicador funcional inicial de transformação. Para que ocorra crescimento sob pressão seletiva, é necessário que o fungo expresse funcionalmente o gene de resistência presente no cassete inserido. Assim, a regeneração observada indicou que o método de transformação mediado por PEG/Ca²⁺ foi eficiente e que os protoplastos mantiveram viabilidade após o processo (AKAMATSU et al., 1997; LI et al., 2018). Entretanto, conforme amplamente discutido na literatura, a regeneração isolada não constitui evidência definitiva de integração

homóloga, uma vez que eventos como tolerância transitória ao antibiótico ou integrações ectópicas podem ocorrer (ISSHIKI et al., 2003; TURGEON, 2010).

Para a validação inequívoca dos eventos de transformação, foram propostas e serão executadas análises complementares: (i) PCR diagnóstico com *primers* que flanqueiam pontos de junção homóloga (junction PCR) para demonstrar integração no locus alvo; (ii) detecção da expressão do repórter mCherry por microscopia de fluorescência ou por quantificação de fluorescência; e (iii) sequenciamento das regiões de integração quando necessário, a fim de descartar integrações parciais ou rearranjos. Essas abordagens seguem protocolos consolidados para confirmação de transformantes por recombinação homóloga em fungos filamentosos e minimizam a possibilidade de falsos positivos (ISSHIKI et al., 2003; SHINKADO et al., 2022).

No que concerne às tecnologias de edição genômica, embora existam relatos de utilização do sistema CRISPR/Cas9 em *A. alternata* (WENDEROTH et al., 2017) e revisões que discutem a expansão da edição em fungos filamentosos (SHINKADO et al., 2022; SHEN et al., 2024), a sua aplicação rotineira em *A. alternata* ainda depende de vetores e protocolos otimizados para entrega e expressão de componentes do sistema CRISPR. Nesse sentido, o vetor desenvolvido neste trabalho constitui um pré-requisito tecnológico: um backbone funcional e caracterizado para expressão de genes e seleção é condição necessária para que estratégias baseadas em CRISPR/Cas9 sejam implementadas de forma eficiente e reprodutível (SHINKADO et al., 2022; HANDELMAN et al., 2023). Assim, o sistema aqui proposto não apenas validou etapas fundamentais de clonagem e transformação, mas também criou a infraestrutura molecular necessária para futuras aplicações de edição gênica.

Foram identificadas limitações e desafios metodológicos que deverão ser enfrentados em trabalhos posteriores. Entre eles destacaram-se: (i) a necessidade de replicação adicional das transformações para estimar eficiência de integração; (ii) possíveis variações entre isolados de *A. alternata* quanto à suscetibilidade à higromicina; (iii) a dependência de protocolos de protoplastização sensíveis a flutuações de condição osmótica e enzimática; e (iv) a eventual ocorrência de integrações ectópicas, que exigem PCRs diagnósticos e sequenciamento para serem descartadas. Reconhecer essas limitações permitiu delinear um fluxo experimental futuro mais rigoroso e reduzir a margem de incerteza nas conclusões.

Quanto às perspectivas experimentais, a confirmação molecular dos mutantes permitirá avançar para estudos funcionais: nocaute individual dos genes AALT_g5837, AALT_g5454 e AALT_g10699, ensaios de patogenicidade em folhas de tangerina, análises de crescimento e morfologia, quantificação da expressão de genes relacionados à produção da toxina ACT e mensuração da fluorescência de mCherry. Esses experimentos permitirão mapear rotas de

virulência e inferir a contribuição funcional de cada gene ao fenótipo patogênico, conforme abordagens adotadas em estudos recentes de genômica funcional de fungos fitopatogênicos (WANG et al., 2022; JIANG et al., 2023).

Em síntese, este trabalho apresentou e validou, em nível metodológico, um sistema vetorial modular e um fluxo experimental para obtenção de mutantes por recombinação homóloga em *A. alternata*. A regeneração observada sob pressão seletiva representou um indicador funcional inicial da efetividade do protocolo de transformação; a confirmação definitiva dos eventos exigirá as análises moleculares previstas. O vetor construído constituiu, portanto, uma contribuição técnica relevante, abrindo caminho para a aplicação de ferramentas de edição gênica e para estudos funcionais que visem elucidar mecanismos de virulência em *A. alternata*.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de um vetor de transformação genética e a padronização de um sistema experimental aplicável a estudos de genômica funcional em *A. alternata*. Os resultados obtidos ao longo das diferentes etapas permitiram estabelecer um fluxo metodológico consistente, desde a manutenção e caracterização do material fúngico até a construção e aplicação inicial de uma ferramenta molecular voltada à substituição gênica por recombinação homóloga.

A estabilidade do crescimento micelial, aliada à manutenção da capacidade de esporulação ao longo das repicagens, demonstrou que o protocolo de cultivo adotado foi eficiente para preservar a viabilidade fisiológica do fungo. Esse aspecto mostrou-se fundamental para garantir a reprodutibilidade das etapas subsequentes, especialmente aquelas que exigiram biomassa fúngica jovem e metabolicamente ativa, como a extração de DNA genômico e a obtenção de protoplastos.

A determinação da concentração de higromicina B evidenciou uma resposta dose-dependente de *A. alternata*, permitindo a definição de 75 mg L⁻¹ como concentração seletiva eficaz. Esse resultado foi decisivo para assegurar a eliminação de células não transformadas e fornecer um critério confiável de seleção sob pressão antibiótica, alinhando-se aos valores descritos na literatura para fungos filamentosos fitopatogênicos.

A qualidade do DNA genômico extraído e à amplificação específica das regiões flanqueadoras dos genes selecionados confirmaram a adequação do material molecular obtido para aplicações em clonagem e recombinação homóloga. A construção do vetor recombinante, baseada em uma arquitetura modular contendo promotor bidirecional, gene de resistência à

higromicina B e o gene repórter mCherry, resultou em uma ferramenta versátil e funcional, cuja aplicabilidade pode ser estendida a diferentes genes-alvo mediante a substituição das regiões de homologia.

A eficiência da clonagem em *E. coli*, confirmada pelo ensaio de azul/branco, pela minipreparação plasmidial e pela linearização dos vetores, assegurou a integridade estrutural das construções obtidas e sua adequação para os ensaios de transformação fúngica. A obtenção de protoplastos viáveis, em concentração compatível com protocolos clássicos de transformação mediada por PEG/Ca²⁺, confirmou que as condições experimentais adotadas foram apropriadas para *A. alternata*.

A regeneração micelial observada em meio seletivo contendo higromicina B constituiu um indicativo funcional inicial da eficiência do processo de transformação, uma vez que o crescimento sob pressão seletiva pressupõe a expressão do gene de resistência presente no vetor. Entretanto, conforme discutido ao longo do trabalho, a regeneração isolada não foi interpretada como evidência definitiva de integração homóloga, sendo reconhecida como uma etapa inicial e obrigatória do processo, que requer validação molecular e funcional complementar.

Nesse contexto, o estudo estabeleceu bases sólidas para a confirmação futura dos eventos de transformação por meio de PCRs diagnósticos, análise da expressão do gene repórter mCherry e, quando necessário, sequenciamento das regiões de integração. Além disso, o vetor desenvolvido representa um avanço metodológico relevante, ao constituir um pré-requisito essencial para a implementação de abordagens mais recentes de edição genômica, como sistemas baseados em CRISPR/Cas9, ainda pouco explorados em *A. alternata* e dependentes de vetores funcionais previamente validados.

Embora limitações inerentes a sistemas de transformação fúngica tenham sido identificadas, como a necessidade de maior número de eventos independentes e a variabilidade associada à regeneração de protoplastos, essas restrições não comprometeram os objetivos centrais do trabalho. Pelo contrário, contribuíram para a definição de estratégias experimentais mais robustas e realistas para estudos futuros.

Dessa forma, concluiu-se que o vetor construído e o sistema experimental estabelecido neste trabalho constituem uma ferramenta viável, modular e transferível para estudos de genômica funcional em *A. alternata*. A continuidade desta pesquisa, por meio da geração e validação de mutantes estáveis e da realização de análises funcionais, permitirá aprofundar o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na virulência, no crescimento e na interação patógeno-hospedeiro, contribuindo para o avanço do conhecimento sobre esse importante fungo fitopatogênico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAMATSU, H.; ISSHIKI, A.; AKIMITSU, K.; YAMAMOTO, M.; YAMAMOTO, H. AAL-toxin-deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. *Phytopathology*, v. 87, n. 9, p. 967–972, 1997.
- AKIMITSU, K.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. *Molecular Plant Pathology*, v. 4, n. 6, p. 435–446, 2003.
- AZEVEDO, F. A.; POLYDORO, D. A.; BASTIANEL, M.; KUPPER, K. C.; STUART, R. M.; COSTA, F. P.; PIO, R. M. Resposta de diferentes genótipos de tangerinas e seus híbridos à inoculação *in vitro* e *in vivo* de *Alternaria alternata*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 1–10, 2010.
- BASTIANEL, Marcos. *Resistência à leprose e à mancha marrom de Alternaria nos citros: caracterização de híbridos, herança, mapeamento genético e expressão gênica*. 2005. 291 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) — Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- BOJJA, R. S.; CERNY, R. L.; PROCTOR, R. H.; DU, L. Determining the biosynthetic sequence in the early steps of the fumonisin pathway by use of three gene disruption mutants of *Fusarium verticillioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 52, n. 10, p. 2855–2860, 2004.
- CHEN, H. Q.; CAO, L.; DEKKERS, K. L.; ROLLINS, J. A.; KO, N. J.; TIMMER, L. W.; CHUNG, K. R. A gene with domains related to transcription regulation is required for pathogenicity in *Colletotrichum acutatum* causing Key lime anthracnose. *Molecular Plant Pathology*, v. 6, n. 5, p. 513–525, 2005.
- CHO, Y.; DAVIS, J. W.; KIM, K. H.; WANG, J.; SUN, Q. H.; CRAMER, R. A.; LAWRENCE, C. B. A high-throughput targeted gene disruption method for *Alternaria brassicicola* functional genomics using linear minimal element constructs. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 19, n. 1, p. 7–15, 2006.

ČREŠNAR, B.; PETRIČ, Š. Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1814, n. 1, p. 29–35, 2011.

ENGLER, C.; MARILLONNET, S. Combinatorial DNA assembly using Golden Gate cloning. In: VOIGT, C. A. (org.). *Synthetic Biology*. Totowa: Humana Press, 2013. p. 141–156.

ENGLER, C.; MARILLONNET, S. Golden Gate cloning. In: VALLIER, L.; ELSAYED, A. (org.). *DNA Cloning and Assembly Methods*. Totowa: Humana Press, 2014. p. 119–131.

ENGLER, C.; YOULES, M.; GRUETZNER, R.; EHERT, T. M.; WERNER, S.; JONES, J. D. G.; PATERSON, T.; MARILLONNET, S. A Golden Gate modular cloning toolbox for plants. *ACS Synthetic Biology*, v. 3, n. 11, p. 839–843, 2014.

FERREIRA, E. A.; MOREIRA, S. I.; PERINA, F. J.; ALVES, E. *Mancha-marrom-de-Alternaria em tangerineiras e seus híbridos: identificação e manejo*. Belo Horizonte: EPAMIG, 2016. (Circular Técnica).

FINCHAM, J. R. S. Transformation in fungi. *Microbiological Reviews*, Washington, v. 53, n. 1, p. 148–170, 1989.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *FAOSTAT – Crops and livestock products: Tangerines, mandarins, clementines, satsumas*. Rome, 2022. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/>. Acesso em: 30 mar. 2024.

GOES, A.; MONTES DE OCA, A. G.; REIS, R. F. Ocorrência de la mancha de *Alternaria* en mandarina ‘Dancy’ en el estado de Rio de Janeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, p. 386, 2001.

HANDELMAN, M.; SHEN, J.; ZHOU, Y.; KELLER, N. P. Genetic manipulation strategies for filamentous fungi: current tools and future directions. *Fungal Biology Reviews*, Amsterdam, v. 45, p. 100–115, 2023.

- HARIMOTO, Y.; HATTORI, T.; ITO, K.; TSUGE, T. Functional analysis of host-selective toxin genes in *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, St. Paul, v. 21, n. 11, p. 1489–1499, 2008.
- INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, v. 96, n. 1, p. 23–28, 1990.
- ISSHIKI, A.; AKIMITSU, K.; YAMAMOTO, M.; YAMAMOTO, H. Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 14, n. 6, p. 749–757, 2001.
- ISSHIKI, A.; AKIMITSU, K.; YAMAMOTO, M.; YAMAMOTO, H. Green fluorescent detection of fungal colonization and endopolygalacturonase gene expression in the interaction of *Alternaria citri* with citrus. *Phytopathology*, v. 93, n. 7, p. 768–773, 2003.
- ITO, K.; TANAKA, T.; HATTA, R.; YAMAMOTO, M.; AKIMITSU, K.; TSUGE, T. Dissection of the host range of the fungal plant pathogen *Alternaria alternata* by modification of secondary metabolism. *Molecular Microbiology*, v. 52, n. 2, p. 399–411, 2004.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. *Produção Agrícola Municipal: culturas temporárias e permanentes – Tangerina*. Rio de Janeiro: IBGE, 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html>. Acesso em: 30 mar. 2024.
- JIANG, Y.; LIU, X.; WANG, Z.; ZHANG, H. Advances in functional genomics of phytopathogenic fungi. *Frontiers in Microbiology*, Lausanne, v. 14, p. 1–15, 2023.
- JOHNSON, R. D.; JOHNSON, L.; ITOH, Y.; KODAMA, M.; OTANI, H.; KOHMOTO, K. Cloning and characterization of a cyclic peptide synthetase gene from *Alternaria alternata* apple pathotype involved in AM-toxin synthesis and pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 13, n. 7, p. 742–753, 2000.

- KELLY, S. L.; KELLY, D. E. Microbial cytochromes P450: biodiversity and biotechnology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 368, p. 20120476, 2013.
- KLITTICH, C. J. R.; BRONSON, C. R. Reduced virulence associated with toxin deficiency in *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 76, p. 427–432, 1986.
- KOHMOTO, K.; ITOH, Y.; SHIMOMURA, N.; KONDOH, Y.; OTANI, H.; KODAMA, M.; NISHIMURA, S.; NAKATSUKA, S. Isolation and biological activities of two host-specific toxins from the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, v. 83, p. 495–502, 1993.
- KOZAKIEWICZ, Z.; FUNGARO, M. H. P.; TIMMER, L. W.; PEVERELLI, M. G. Host-specific toxins produced by *Alternaria alternata* and their involvement in pathogenicity of citrus brown spot. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 52, n. 2, p. 117-133, 1998.
- LEONARD, K. J. Virulence, pathogenicity, and toxin production in *Alternaria* species. *Phytopathology*, St. Paul, v. 67, p. 1273–1278, 1977.
- LI, D.; TANG, Y.; LIN, J.; CAI, W. Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microbial Cell Factories*, v. 16, art. 168, 2017.
- LI, H.; ZHANG, Y.; ZENG, X.; LIU, Z.; ZHANG, J. PEG/Ca²⁺-mediated transformation in filamentous fungi: an efficient method for genetic manipulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 102, n. 14, p. 5891–5903, 2018.
- LIN, C. H.; YANG, S. L.; CHUNG, K. R. The YAP1 homolog–mediated oxidative stress tolerance is crucial for pathogenicity of *Alternaria alternata* in citrus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 22, n. 8, p. 942–952, 2009.
- LIN, C. H.; YANG, S. L.; WANG, N. Y.; CHUNG, K. R. The FUS3 MAPK signaling pathway of the citrus pathogen *Alternaria alternata*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 47, n. 4, p. 381–391, 2010.

MORTON, R.; HOOYKAAS, P. J. J. Gene replacement. *Molecular Breeding*, Dordrecht, v. 1, n. 2, p. 123–132, 1995.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, v. 8, n. 19, p. 4321–4326, 1980.

OLIVEIRA, T. A.; SILVA, R. N.; FERREIRA, E. A.; ALVES, E. Evaluation of antibiotic resistance markers in phytopathogenic fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 50, n. 3, p. 707–716, 2019.

PERES, N. A. R.; AGOSTINI, J. P.; TIMMER, L. W. Outbreaks of *Alternaria* brown spot of citrus in Brazil and Argentina. *Plant Disease*, v. 87, n. 6, p. 750, 2003.

PEBERDY, J. F. Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. *Microbiological Reviews*, Washington, v. 54, n. 4, p. 397–430, 1990.

PORCINO, Mirelly M.; NASCIMENTO, Luciana C.; SOUZA, Jean de O.; SOUZA, Breno O.; NUNES, Marciano C. Caracterização morfo genética e reação de resistência de genótipos de tangerineira a *Alternaria alternata* f. sp. citri. *Summa Phytopathologica*, v. 43, n. 2, p. 118-123, 2017.

PUCHTA, Holger. Gene replacement by homologous recombination in plants. In: TOWN, Chris (org.). *Functional genomics*. Dordrecht: Springer Science+Business Media, 2002. p. 173–182.

RODRIGUES, C. Estudos funcionais de patógenos fúngicos causadores de doença em citros. 2018. Projeto (Chamada Universal CNPq) – Instituto Agronômico de Campinas, Cordeirópolis, 2018.

RODRIGUES, M. B. C. Transformação genética e patogenicidade de *Guignardia citricarpa*. 2010. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ROTEM, J. *The genus Alternaria: biology, epidemiology, and pathogenicity*. St. Paul: APS Press, 1994.

REIS, R. F.; ALMEIDA, T. F.; STUCHI, E. S.; GOES, A. Susceptibility of citrus species to *Alternaria alternata*, the causal agent of Alternaria brown spot. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 113, p. 336–342, 2007.

RUIZ-DÍEZ, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 92, n. 2, p. 189–195, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, L. V. D. Caracterização estrutural do gene que codifica a histidina quinase slnC11. 2009. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

SANTOS, F. C. Transformação genética em fungos filamentosos: avanços metodológicos e aplicações. *Revista Brasileira de Microbiologia*, São Paulo, v. 40, p. 1–10, 2009.

SÃO PAULO (Estado). Coordenadoria de Defesa Agropecuária. *Mancha marrom de Alternaria em citros*. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, 2023. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br>. Acesso em: 30 mar. 2024.

SOLEL, Z.; KIMCHI, M. Susceptibility and resistance of citrus genotypes to *Alternaria alternata* pv. *citri*. *Journal of Phytopathology*, v. 145, n. 8–9, p. 389–391, 1997.

SOUZA, M. C.; STUCHI, E. S.; GOES, A. Evaluation of tangerine hybrid resistance to *Alternaria alternata*. *Scientia Horticulturae*, v. 123, n. 1, p. 1–4, 2009.

SHEN, J.; HANDELMAN, M.; ZHOU, Y.; KELLER, N. P. Genome editing in filamentous fungi: tools, applications and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 108, p. 1–15, 2024.

- SHINKADO, T.; TSUGE, T.; ITO, K.; AKIMITSU, K. Development of CRISPR/Cas9-mediated gene disruption system in *Alternaria alternata*. *Fungal Genetics and Biology*, San Diego, v. 159, p. 103675, 2022.
- TARALLO, M. M. Análise da expressão gênica de *Alternaria alternata* em resposta ao extrato de tangor Murcott. 2018. Dissertação (Mestrado) – Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2018.
- THOMMA, B. P. H. J. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, Oxford, v. 4, n. 4, p. 225–236, 2003.
- TIMMER, L. W.; TIMMER, R. L.; MASSIE, L. D.; FORSTER, H.; GOTTWALD, T. R.; WARDLOW, G. J. Environmental factors affecting the severity of *Alternaria* brown spot of citrus and their potential use in timing fungicide applications. *Plant Disease*, v. 84, n. 6, p. 638–643, 2000.
- TSUGE, T.; HARIMOTO, Y.; AKIMITSU, K.; OTA, Y.; KODAMA, M. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiology Reviews*, Oxford, v. 37, n. 1, p. 44–66, 2013.
- TUDZYNSKI, B.; BOLLER, T.; WIEMANN, P. Secondary metabolism and fungal pathogenicity. *Current Opinion in Plant Biology*, London, v. 5, p. 373–379, 2002.
- WANG, X.; LI, H.; ZHANG, Y.; LIU, J. Comparative genomics reveals pathogenicity-related genes in *Alternaria alternata*. *BMC Genomics*, London, v. 23, p. 1–14, 2022.
- WENDEROTH, M.; PINELO, M.; LEMBKE, A.; JACOBSEN, I. D.; FISCHER, R. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in filamentous fungi. *Fungal Biology and Biotechnology*, London, v. 4, p. 1–11, 2017.
- YODER, O. C. Toxins in pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 18, p. 103–129, 1980.

YU, J.; KELLER, N. P. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 43, p. 437–458, 2005.

ZHANG, X.; LIU, X.; WANG, Y.; YANG, Y. Development of a hygromycin B selection system for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Mycological Progress*, v. 15, n. 9, p. 935–943, 2016.

ZHOU, Y.; SHEN, J.; HANDELMAN, M.; KELLER, N. P. Engineering fungal secondary metabolism through genome editing. *Biotechnology Advances*, Oxford, v. 69, p. 108250, 2024.