AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE
TRICHODERMA POR ISOENZIMAS, RFLP E RAPD

ISABEL CRISTINA DOS SANTOS

Bióloga

Orientadora: Profa.Dra. ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de
concentração: Genética e Melho-
ramento de Plantas.

PIRACICABA

ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL

DEZEMBRO - 1992

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - FCLQ/USP

Santos, Isabel Cristina dos
Avaliação da variabilidade genética de *Trichode*
por isoenzimas, RFLP e RAPD. Piracicaba, 1992.
92p

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Fungo filamentoso - Variação genética 2. RAP
3. RFLP I. Escola Superior de Agricultura Luiz de
Queiroz, Piracicaba

CDD 589

AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE
TRICHODERMA POR ISOENZIMAS, RFLP E RAPD

ISABEL CRISTINA DOS SANTOS

Aprovada em 01/02/1993

Comissão julgadora:

Profa.Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner	ESALQ/USP
Prof.Dr. Joao Lúcio de Azevedo	ESALQ/USP
Profa.Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro	UEL/Londrina

Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner
Orientadora

Dedico este trabalho aos meus pais
Vicente e Maria: irmãos e cunhados
Roberto e Luzia. Sávio e Tânia.
Juninho e Luciana: aos "pequeninos"
Ana Carolina, Marcos Vinicius,
Juliana, Guilherme e "ao que vai
chegar".

Esta família que é motivo da minha
maior alegria!

Uma simples homenagem que leva toda
minha gratidão!

AGRADECIMENTOS

No decorrer destes três anos, tive o privilégio de trabalhar ao lado de pessoas, as quais não poderia deixar de lembrar neste momento. Deixo registrado o meu reconhecimento e eterno carinho a todas elas.

A querida Profa. Aline A. Pizzirani-Kleiner, por ter me dado o prazer de sua amizade e orientação, e a quem tenho muito carinho.

Ao inestimável Prof. João Lúcio de Azevedo, pela amizade e apoio, meu reconhecimento e admiração.

Ao Prof. Tadeu Elisbão, do Depto. de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina (UEL), quem iniciou-me na pesquisa e a quem tenho profunda admiração: meu eterno agradecimento.

Aos profs. Maria Sueli S. Felipe, Maristela de Oliveira Azevedo e Spartaco Astolfi Filho, por terem permitido que eu desfrutasse de suas experiências científicas e me revelado o fascinante mundo do DNA. Minha gratidão pela acolhida no laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, pela confiança em mim depositada e pelo espírito crítico.

A querida Maria Inês F. Faraldo, pelo auxílio na análise computacional dos resultados obtidos, e também pelo carinho e amizade que a mim foram muito importantes.

Ao amigo José Odair Pereira, pela ajuda nas revelações rotográficas e pelo carisma com que sempre nos envolveu, deixando o nosso ambiente de trabalho muito mais agradável.

A amiga Adriana C. Longo, pelo auxílio na versão do Summary.

Aos amigos Iara e Quiryn pelo auxílio na correção dos originais.

Ao prof. Paulo Roberto Cury do Serviço de Estatística e Computação da Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia de Botucatu-UNESP-Campus de Botucatu-SP por ter me concedido a utilização do programa para análise computacional dos resultados, e pela notável atenção na discussão destes.

Aos amigos do laboratório de Genética de Microrganismos da ESALQ/USP: Zezo, Célia, Gilda, Rose, Luciana, Renata, João, Marcelo, Marisa, André, Adilson, Vitor, Cláudia e Baixa: pela ajuda e agradável convivência. Que a amizade seja eterna!

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular da UNB: Cynthia, Gilberto, Gilvânia, Fernando e Solange. O meu muito obrigada por tudo!

Ao querido Sérgio Simão, pelo carinho e amizade: motivo de uma inspiração maior!

Aos professores do Instituto de Genética da ESALQ, pela valiosa contribuição na minha formação profissional.

A CAFES e CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

A minha querida família, que é meu maior tesouro: pela compreensão, alegria e apoio constantes!

INDICE

Página

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Fungos do gênero <i>Trichoderma</i>	3
2.2. Variabilidade genética através de técnicas moleculares.....	6
2.2.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfisms).....	6
2.2.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Linhagens do fungo <i>Trichoderma</i>	27
3.2. Plasmídios utilizados.....	29
3.3. Sondas moleculares.....	29
3.3.1. Sonda de celobiohidrolase (CBH 1.1)....	29
3.3.2. Sonda de β -tubulina.....	29
3.4. Padrão de peso molecular.....	32
3.5. Preparo de meios de cultivo.....	33
3.5.1. Meio MYG para crescimento micelial....	33
3.5.2. Meio completo sólido.....	33
3.6. Preparo de soluções.....	34
3.7. Manutenção das linhagens.....	41
3.8. Obtenção de micélio para extração de DNA genô- mico.....	41
3.9. Extração e purificação de DNA genômico de micélio.....	42
3.10. Análise de DNA através de eletroforese em gel de agarose.....	43
3.11. Digestão total do DNA genômico e plasmidial..	44
3.12. Transferência do DNA para membrana de nitroce-	

lulose (Southern blotting).....	45
3.13. Purificação de fragmentos de DNA (eluição por centrifugação).....	46
3.14. Hibridização em suporte sólido (membrana de nitrocelulose).....	47
3.15. Técnica de eletroforese de isoenzimas.....	49
3.16. Técnica do RFLP.....	50
3.17. Técnica do RAPD.....	50
3.18. Agrupamento de linhagens segundo taxonomia numérica.....	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1. Variabilidade através de eletroforese de isoenzimas.....	53
4.2. Variabilidade através da técnica do RFLP.....	59
4.2.1. Uso da sonda CBH 1.1.....	59
4.2.2. Uso da sonda β -tubulina.....	60
4.3. Variabilidade através da técnica do RAPD.....	65
4.3.1. Uso do primer 63.....	65
4.3.2. Uso do primer 64.....	70
4.3.3. Uso dos primers 63 e 64 simultaneamente	74
5. CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Esquema básico de amplificação de DNA.....	20
Figura 2 - Mapa de restrição do plasmídeo pUEXO.....	30
Figura 3 - Mapa de restrição do plasmídeo pBT3.....	31
Figura 4 - Representação esquemática dos fragmentos purificados dos plasmídios pUEXO e pBT3, utilizados como sondas.....	32
Figura 5 - Padrão isoenzimático de esterases das 14 linhagens de <i>Trichoderma</i>	55
Figura 6 - Zimograma representativo de esterases das 14 linhagens de <i>Trichoderma</i>	56
Figura 7 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando coeficiente JACCARD, dos resultados isoenzimáticos de esterases.....	57
Figura 8 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando coeficiente SIMPLE MATCHING, dos resultados isoenzimá- ticos de esterases.....	58
Figura 9 - Padrão eletroforético da RFLP com a sonda CBH 1.1 das 14 linhagens de <i>Trichoderma</i>	61

- Figura 10 - Padrão eletroforético da RFLP com a sonda β -tubulina das 14 linh. de *Trichoderma*.... 62
- Figura 11 - Zimograma representativo da RFLP com a sonda β -tubulina das 14 linh. de *Trichoderma*. 62
- Figura 12 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando coeficiente JACCARD do padrão da RFLP com a sonda β -tubulina..... 63
- Figura 13 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando coeficiente SIMPLE MATCHING do padrão da RFLP com a sonda β -tubulina..... 64
- Figura 14 - Padrão eletroforético da RAPD com o primer 63 das 14 linhagens de *Trichoderma*..... 66
- Figura 15 - Zimograma representativo da RADP com o primer 63 das 14 linh. de *Trichoderma*..... 67
- Figura 16 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando coeficiente JACCARD do padrão de RAPD com o primer 63..68
- Figura 17 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando coeficiente SIMPLE MATCHING do padrão de RAPD com o primer 63..... 69
- Figura 18 - Padrão eletroforético da RAPD com o primer 64 das 14 linhagens de *Trichoderma*..... 70

Figura 19 - Zimograma representativo da RAPD com o primer 64 das 14 linh. de *Trichoderma*..... 71

Figura 20 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando o coeficiente JACCARD do padrão de RAPD com o primer 64..72

Figura 21 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando o coeficiente SIMPLE MATCHING do padrão de RAPD com o primer 64..... 73

Figura 22 - Padrão eletroforético da RAPD com os primers 63 e 64 das 14 linh. de *Trichoderma*.. 74

Figura 23 - Zimograma representativo da RAPD com os primers 63 e 64 das 14 linh. de *Trichoderma*.. 77

Figura 24 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando o coeficiente JACCARD do padrão da RAPD com os primers 63 e 64..... 76

Figura 25 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando o coeficiente SIMPLE MATCHING do padrão de RAPD com os primers 63 e 64..... 77

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 01 - Linhagens de <i>Trichoderma</i> utilizadas e suas procedências.....	28
Tabela 02 - Enzimas de restrição.....	46

AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE
TRICHODERMA POR ISOENZIMAS, RFLP E RAPD

Autora: ISABEL CRISTINA DOS SANTOS

Orientadora : Profa.Dra. ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre a variabilidade genética natural existente em espécies do fungo *Trichoderma* e adicionar técnicas auxiliares para distinção de espécies nesse fungo. Nesse sentido, foram avaliadas 14 diferentes linhagens, quanto ao padrão eletroforético de isoenzimas, polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) e polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD).

Na técnica de eletroforese de isoenzimas, o sistema para esterases foi o que apresentou polimorfismo entre as linhagens. Na técnica de RFLP, duas sondas foram testadas: a sonda CBH 1.1 que apresentou homologia somente com duas linhagens de *Trichoderma* e a sonda β -tubulina que apresentou homologia com todas as linhagens e o polimorfismo entre elas. Na técnica de RAPD dois "primers" foram utilizados e apresentaram resultados semelhantes. As linhagens puderam ser divididas em grupos de similaridades, e diferenciações de linhagens da mesma espécie mas de locais diferentes puderam ser detectadas. As três técnicas utilizadas apresentaram resultados satisfatórios para análise de polimorfismo e podem ser utilizadas como técnicas complementares na identificação e classificação de espécies desse gênero.

EVALUATION OF GENETIC VARIABILITY OF *TRICHODERMA* BY ISOZYME, RFLP AND RAPD

Author : ISABEL CRISTINA DOS SANTOS

Adviser : Prof.Dr. ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

SUMMARY

The present work was developed aiming to amplify the knowledge about natural genetic variability existent in species of *Trichoderma* fungus and add complementary techniques to distinguish species. This way, 14 different strains were evaluated concerning isozyme electrophoretic patterns, restriction fragment length polymorphism (RFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD).

In the isozyme technique, esterase system was the one showing polymorphism among strains. In the RFLP technique two probes were tested. The probe CBH1.1 showed homology only with two strains of *Trichoderma*. The probe α -tubulin showed homology with all strains and polymorphism among them. In the RAPD technique, two primers were tested and the results were similar. The strains were divided in similarity groups and differentiations of strains of different places was observed. These techniques showed satisfying results and can be used as an alternative aid for polymorphism analysis in *Trichoderma* taxonomy.

INTRODUÇÃO

Entre as diferentes espécies microbianas produtoras de celulasas, os fungos do gênero *Trichoderma* destacam-se pela eficiente capacidade que possuem na degradação da celulose, através do seu sistema enzimático balanceado.

As aplicações da degradação de materiais celulósicos são muitas como na obtenção de combustíveis líquidos, materiais alimentares e produtos químicos e farmacêuticos. O processo para sacarificação de celulose pode ser realizado por via ácida, apresentando algumas desvantagens como baixo rendimento, impurezas nos xaropes e custo elevado. Por via enzimática é mais vantajoso, porém ainda não foi desenvolvido um processo economicamente significativo utilizando celulasas, devido principalmente ao alto custo de produção. Programas de melhoramento, que envolvem também as recentes técnicas moleculares como clonagem gênica, vem sendo desenvolvidos com o objetivo de tornar viável o uso de microrganismos na obtenção dessas enzimas. Nesse particular, a maioria dos estudos concentram-se em espécies de *Trichoderma*.

Por outro lado, a capacidade para distinguir os fungos do gênero *Trichoderma* não está inteiramente estabelecida, pois as espécies de um mesmo grupo apresentam formas intermediárias, dificultando assim, a identificação de linhagens.

Diversos parâmetros têm sido utilizados para classificar isolados de *Trichoderma* tais como métodos morfológicos, citológicos, e principalmente métodos isoen-

zimáticos, onde está baseada a taxonomia tradicional.

Com o advento de técnicas moleculares, a variação genética dos organismos começa a ser estudada de maneira a resolver os problemas relacionados à taxonomia e evolução. Técnicas como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) têm sido recentemente utilizadas nos estudos taxonômicos.

Considerando-se os pontos mencionados, o presente trabalho foi realizado visando a avaliação da variabilidade de 14 linhagens de *Trichoderma*, isoladas de diferentes locais e incluindo 4 espécies: *T.pseudokoningii*, *T.koningii*, *T.reesei* e *T.viride*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fungos do gênero *Trichoderma*

Os fungos do gênero *Trichoderma*, foram agrupados em nove espécies por RIFAI (1969), que baseou-se em caracteres culturais e morfológicos como sistemas de ramificação de conidióforos e disposição de fiálides, tamanho e forma bem como presença e ausência de ornamentações de fialósporos, entre outros. Segundo este autor, o gênero foi introduzido na literatura micológica por PEERSON em 1794, embora a primeira delimitação genérica precisa, tenha sido dada por HARZ em 1871, que enfatizou a importância de características microscópicas na delimitação do gênero.

O primeiro relato da ocorrência de espécies de *Trichoderma* no solo, foi feita por OUDEMANS & KONING em 1902 (citado por RIFAI, 1969). Com o aumento do interesse sobre os fungos de solos, muitos isolados deste gênero foram relatados em várias partes do planeta. As espécies de um mesmo grupo apresentam características sobrepostas, o que torna difícil a classificação dos isolados e conseqüentemente gera grande dificuldade nos estudos de taxonomia deste gênero.

Uma das características marcantes deste gênero é o rápido crescimento, quando comparado a outros fungos. As colônias apresentam-se compactadas, com tufo, e esta compactação parece estar relacionada à estrutura dos conidióforos. A coloração da colônia geralmente é devida à pigmentação de fialósporos. A quantidade de esporos produzidos também faz as colônias parecerem escuras ou opacas. Alguns isolados podem produzir cristais ou secretar um

pigmento que descolore o meio de cultura. O micélio é composto por hifas hialinas, septadas, ramificadas, com parede lisa. Intercaladas nas hifas ou mesmo terminais, da maioria das espécies, estão os clamidosporos globosos ou elipsoidais de pouca coloração e parede lisa. Os conidióforos apresentam-se ramificados, cônicos ou piramidais, soltos ou em tufo. As fiálides com exceção de algumas espécies, estão presentes no ápice das ramificações dos conidióforos. Os conídios são subglobosos, ovóides, elipsoides ou elíptico-cilíndricos e são acumulados no ápice da fiálide formando uma estrutura globosa ou subglobosa.

O interesse maior sobre os fungos deste gênero, está no seu sistema enzimático de degradação da celulose. A celulose é um polímero linear de glicose muito abundante na natureza e é a principal fonte de energia renovável conhecida. O conceito atual de degradação da celulose é de que três enzimas estão envolvidas (GOLDMAN e AZEVEDO, 1989):

1). **Endoglucanase** (1,4-beta-D-glucano 4-glucanohidrolase, EC.3.2.1.4) - hidrolisa as cadeias de celulose, atacando os polímeros internamente, resultando em uma rápida redução do seu tamanho.

2). **Celobiohidrolase** (1,4-beta-D-glucano celobiohidrolase, EC.3.2.1.91) - atua removendo as unidades de glicose e celobiose a partir de extremidades não reduzidas da cadeia.

3). **Beta-glicosidase** (beta-D-glicosídeo glicohidrolase, (EC.3.2.1.21) - hidrolisa a celobiose e outras celodextrinas em glicose.

Muitos autores pesquisam a atuação destas enzimas no processo de hidrólise da celulose. Existe um sinergismo na ação hidrolítica entre a celobiohidrolase e a endoglucanase. Este sinergismo é alto com substratos ordenados mas baixo com substratos amorfos, tais como celulose ácida, e ausente com celuloses substituídas. A endoglucanase atua sobre as regiões amorfas das fibras de celulose, abrindo assim novas extremidades de cadeias para o ataque da celobiohidrolase, a qual remove unidades de celobiose das extremidades não reduzidas da cadeia. Desta forma, o sinergismo entre as duas enzimas resultaria do fato de que o novo substrato (extremidades de cadeias livres) para a celobiohidrolase é formado pela ação da endoglucanase. A β -glicosidase posteriormente aumenta a hidrólise total através da remoção da celobiose, um produto final inibitório da endoglucanase e da celobiohidrolase (GOLDMAN & AZEVEDO, 1989).

Muitos métodos têm sido utilizados para classificar os isolados de *Trichoderma*. Métodos morfológicos (RIFAI, 1969; COOK & BAKER, 1983), citológicos (NEVALAINEN, 1985), e métodos isoenzimáticos (HALL, 1974; BURDON & MARSHALL, 1983; HAWKSWORTH, 1984; PARK et al., 1984; ZAMIR & CHET, 1985; STASZ et al., 1988), onde está baseada a taxonomia tradicional.

Recentemente, métodos de análise direta da molécula de DNA, tem proporcionado grandes avanços no desenvolvimento dos trabalhos referentes a classificação.

2.2. Variabilidade genética através de técnicas moleculares

2.2.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Recentemente uma nova classe de polimorfismo genético, denominada RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), foi descoberta pelo uso de endonucleases de restrição que clivam moléculas de DNA em sítios específicos, e de sondas que detectam fragmentos de DNA homólogos (BECKMAN & SOLLER, 1983).

O princípio da técnica, está baseado na variação natural da sequência de nucleotídeos do DNA, causada pela mudança de um simples par de bases ou de regiões maiores envolvidas nos fenômenos de inversão, translocação, deleção ou transposição. Essas mudanças podem alterar a distribuição dos sítios de restrição de uma ou várias enzimas simultaneamente, bem como resultar no ganho ou perda desses sítios (BECKMAN & SOLLER, 1983).

Em síntese, ela permite a construção de mapas genéticos, estudos taxonômicos e evolutivos, epidemiologia e genética populacional, estudos de caracteres quantitativos (QTL) e identificação de genes (MICHELMORE & HULBERT, 1987).

A técnica do RFLP, consiste em utilizar as endonucleases do tipo II, para digerir o DNA do organismo a ser estudado e com isso analisar a sua variabilidade genética. Estas enzimas, que foram descobertas em bactérias, em 1960, são capazes de reconhecer e clivar sequências específicas de DNA, gerando milhares de fragmentos de tamanhos diferentes, que são separados em gel de eletroforese, sendo os fragmentos menores migrados mais rapidamente através dos

poros do gel do que os fragmentos maiores.

O DNA de organismos eucariotos digerido por enzimas de restrição, quando submetido à eletroforese em gel, resulta num rastro contínuo devido à sua complexidade. Fragmentos específicos, são no entanto detectados pelo uso de sondas apropriadas.

Existem basicamente dois tipos de sequências de DNA que são utilizados como sondas (SAMBROOK et al. 1989). Uma delas é derivada do mRNA (RNA mensageiro) e conhecida como cDNA (DNA complementar). Estas sondas são produzidas através de mRNA isolados, que são enzimaticamente copiados em sequências de DNA pela transcriptase reversa e clonados em vetores apropriados representando portanto, sequências codificadoras. O outro tipo de sonda é feito de DNA genômico (sequência codificadora e não codificadora) que é digerido com enzimas de restrição e os fragmentos inseridos num vetor. Essas sequências usadas como sondas, são homólogas a um fragmento de DNA particular ou a uma porção deste.

O DNA digerido é transferido do gel para um suporte sólido, que pode ser membrana de nylon ou de nitrocelulose (SOUTHERN, 1975) e exposto à sonda marcada quimicamente ou radioativamente, sob condições que promovam a hibridização DNA-DNA. O material não hibridizado é lavado, e a membrana é colocada contra um filme fotográfico para exposição auto-radiográfica. O fragmento de DNA específico hibridizado com a sonda, será visualizado como uma banda no filme.

O número de bandas observado é dependente do

número de loci no genoma homólogo à sonda e do número de sítios de restrição contido nestas sequências de DNA (MICHELMORE & HULBERT, 1987).

Alguns estudos têm relatado o uso de RFLP para ajudar na construção de mapas genéticos. O conhecimento do mapa genético, permite a compreensão da genética básica do organismo e a determinação dos princípios e estratégias a serem empregadas nos programas de melhoramento (AZEVEDO & BALL, 1985).

Neste contexto, podemos destacar o trabalho de HELENTJARIS (1987), que usou a técnica de RFLP para construção de mapa genético de milho (*Zea mays*). Este mapa foi correlacionado com os mapas genéticos convencionais já existentes nesta cultura, construídos através de marcadores morfológicos e isoenzimáticos.

McCOUCH et al. (1988), também construíram um mapa genético baseado em RFLP, em arroz (*Oryza sativa*), que abrange 1389 cM do seu genoma e excede em mais de 20% do mapa genético clássico.

No que diz respeito particularmente a fungos, alguns mapas genéticos baseados em RFLP foram construídos. RAEDER et al. (1989), descreveram a construção de mapa genético do fungo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*, muito conhecido pelo seu poder de degradação da lignina. Neste trabalho, para hibridização com DNA genômico deste fungo, eles usaram 80 sondas homólogas incluindo gene de celulase (CBH I), de lignina peroxidase e DNA mitocondrial e ribossomal. Este mapa, pôde auxiliar nos estudos de análise da segregação meiótica e no isolamento de genes de interesse.

No ascomiceto *Cochliobolus heterostrophus*, fitopatogênico de milho, TZENG et al. (1992), desenvolveram um mapa genético de 1200 cM, através de RFLP e de marcadores fenotípicos, com o objetivo de facilitar a clonagem de genes responsáveis pela patogenicidade e para caracterizar o rearranjo cromossômico que parece estar associado à virulência do locus denominado Tox 1.

Muitos estudos, usam técnicas moleculares recentes além das técnicas clássicas conhecidas, para um estudo mais detalhado sobre a variabilidade genética existente nos organismos, principalmente naqueles onde a variabilidade não é tão aparente, e mesmo para aqueles onde há dificuldade de classificação devido à enorme variabilidade existente.

Para o desenvolvimento destes estudos, os autores têm utilizado tanto DNA genômico (total), como DNA nuclear, ribossomal ou mitocondrial. Assim também, vários tipos de sondas são construídas, com fragmentos de cDNA, fragmentos contendo algum gene de interesse ou mesmo fragmentos randômicos; podendo ser homólogos (proveniente da mesma espécie) ou heterólogos (proveniente de espécie diferente). Passaremos então a discutir trabalhos relativos a esta técnica em fungos, dando ênfase ao tipo de DNA a ser analisado, à sonda empregada e aos resultados obtidos.

MANICOM et al. (1987) usaram a RFLP para identificar as espécies de fungos do gênero *Fusarium* que apresentavam uma variabilidade notória. Neste trabalho, os autores testaram quatro sondas randômicas, construídas de DNA de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* em DNA genômico de 15 isolados de nove espécies diferentes. Houve semelhanças

e diferenças intra e interespecíficas. Os padrões de hibridização com três sondas foram indicativos de seqüências com uma ou poucas cópias por genoma, enquanto que a multiplicidade de bandas com a quarta sonda foi associada à presença de DNA satélite, DNA de seqüência repetitiva, elementos transponíveis ou família de genes. Este argumento pode ser também aplicado na conservação de famílias de genes como os da proteína tubulina.

KIM et al. (1992), trabalhando com o mesmo fungo, além de estudar a variabilidade genética, construiu um mapa genético de DNA mitocondrial para determinar a ocorrência destas variações no genoma mitocondrial. Os autores utilizaram DNA total de 50 isolados de origens geográficas diferentes, para hibridizar com sondas construídas de DNA mitocondrial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. De acordo com os padrões de bandas, pôde-se formar seis grupos distintos. O mapa construído com o DNA mitocondrial serviu para construção de uma árvore filogenética.

Em duas espécies de cogumelos, *Agaricus brunnescens* e *Agaricus bitorquis*, CASTLE et al. (1987) usaram a RFLP para dois propósitos: desenvolver RFLPs como marcadores genéticos em *A. brunnescens* (cogumelo comercial) para serem usados nos programas de melhoramento genético e identificar sondas para distinguir *A. brunnescens* da espécie relacionada *A. bitorquis*. Como sondas para hibridização com o DNA genômico de 11 isolados de *A. brunnescens* e sete isolados de *A. bitorquis*, foi usado DNA nuclear de dois isolados sendo um de cada espécie. Um alto grau de polimorfismo foi observado em ambas as espécies. Através do polimorfismo de bandas, foi possível distinguir as duas espécies e identificar linhagens homocarióticas de heterocarióticas poden-

do com isso usar estes marcadores para confirmar novos genótipos.

Um outro trabalho que fez uso desta técnica, foi o descrito por HULBERT & MICHELMOORE (1988), onde eles analisaram 25 isolados de *Bremia lactucae*, representando diversas origens geográficas e fenótipos de virulência. Este fungo é um causador de doença em cultura de alface, e a análise de sua variabilidade foi devido a duas questões concernentes a dinâmica de populações existentes em várias áreas do planeta: a dimensão da variabilidade presente nas populações e os mecanismos por onde ocorrem mudanças na virulência. Na falta de marcadores genéticos para estudos de variabilidade neste fungo, os autores usaram a RFLP para investigar a variabilidade genética. No desenvolvimento da técnica, os autores usaram para hibridização o DNA genômico das linhagens a serem analisadas; e como sondas, fragmentos randômicos do DNA de um dos isolados. O presente estudo detectou considerável variabilidade genética nas populações de *B. lactucae* das regiões da Europa e Califórnia. Houve uma enorme variabilidade detectada em isolados da Europa e isto foi esperado, uma vez que a área mediterrânea é o centro de diversidade do gênero *Lactuca* e provavelmente o centro de diversidade de *B. lactucae*. Muitos isolados da Europa foram claramente diplóides, em contraste com alguns isolados da Austrália, Japão, Wisconsin e Califórnia, que mostraram mais de dois alelos em vários loci, indicando serem poliplóides ou heterocários estáveis. Este resultado foi inesperado, visto que estes fenômenos não têm sido relatados na família Peronosporaceae. Um dos isolados mostrou ser um híbrido somático entre dois isolados diplóides da Califórnia, de mesmo tipo de reação sexual. Esta é a primeira boa evidência de fusão somática em oomicetos.

Sclerotinia é um outro grupo de fungos que apresenta uma grande variabilidade genética, e a taxonomia atual está baseada em estudos morfológicos, bioquímicos, citológicos, culturais e em características epidemiológicas. Mas a distinção entre as espécies não está inteiramente estabelecida pois na comparação de novas linhagens com as espécies conhecidas, percebe-se uma grande variabilidade que dificulta a classificação. Com base nestes dados, KOHN et al. (1988), estudaram através da técnica de RFLP, a variabilidade entre 42 isolados das espécies *S.sclerotiorum*, *S.minor*, *S.trifoliorum*, *S.asari*, *S.ficariae*, *Sclerotium cepivorum* e *Sclerotinia* n. sp. O DNA genômico destes isolados foi usado para hibridização com sondas de DNA ribossômico de *Neurospora crassa*, de *Schizophyllum commune*, de *Armillaria mellea* e DNA mitocondrial de *Neurospora crassa*. A análise por RFLP confirmou a taxonomia atual e foi observado que muitos polimorfismos foram mais interespecíficos do que intraespecíficos.

Em *Phytophthora*, a dificuldade taxonômica é a mesma, também devido ao alto grau de variabilidade morfológica encontrada em algumas espécies descritas e ao número limitado de características que possam ser avaliadas. FORSTER et al. (1990), investigando a diversidade deste gênero, utilizaram o DNA mitocondrial de seis espécies relativamente bem caracterizadas, para ser hibridizado com sondas construídas de DNA nuclear de um dos isolados. Alguns isolados tiveram padrões de restrição idênticos, mas sem correlação aparente com padrões de grupos de hospedeiros ou origem geográfica. Isolados de *P.citrophthora* de origens geográficas diferentes mostraram-se idênticos formando dois sub-grupos. O mesmo aconteceu com isolados de *P.megakaria*. Um alto grau de polimorfismo foi observado

entre os isolados de *P.citricola*.

Em *Laccaria*, a identificação por caracteres morfológicos e fisiológicos é difícil em alguns casos. A separação de *L.laccata*, *L.proxima* e *L.bicolor* pode ser realizada mas com dificuldade pelo uso de critérios como o tamanho e forma de esporos. Com base nisto, GARDES et al. (1990), estudaram a variabilidade através de RFLP, como uma característica taxonômica adicional, em 42 isolados de quatro espécies: além das três mencionadas acima incluiu-se a *L. amethystina*. O DNA genômico dos isolados foi usado para hibridização com sonda de DNA ribossômico de *Armillaria ostoyae*. A variabilidade foi detectada entre isolados de *L. laccata*, refletindo a heterogeneidade morfológica, fisiológica e genética desta espécie. Também houve divergência em *L. bicolor* e em *L. amethystina*. Isolados da região norte-americana de *L. bicolor* pareceram ser um grupo homogêneo e distinto dos isolados europeus.

MOODY & TYLER (1990), usaram RFLP para analisar a diversidade do grupo *Aspergillus flavus*. É um grupo economicamente importante devido à capacidade que alguns isolados apresentam, de produzir metabólitos secundários carcinogênicos, as aflatoxinas, em cultura de amendoim e cereais. Este grupo é constituído por três membros: *A.flavus*, *A.parasiticus*, e *A.nomius*. As três espécies podem ser distinguidas pela morfologia usando métodos que requerem duas a três semanas para serem completados e não são usuais para todos os isolados. O objetivo deste trabalho foi identificar marcadores RFLPs que se correlacionassem com caracteres morfológicos e bioquímicos, e usar o polimorfismo para examinar as relações entre as espécies. Os autores utilizaram DNA nuclear de 59 isolados das espécies

relatadas, coletadas exclusivamente no sul da Índia. As sondas utilizadas foram: gene RNA ribossômico, gene da β -tubulina e genes das histonas 3 e 4 de *Neurospora crassa*; genes da α -tubulina e do triptofano C de *Aspergillus nidulans* e gene da α -tubulina de *Schizosaccharomyces pombe*. De acordo com os padrões de RFLP, as três espécies foram claramente diferenciadas umas das outras. Não foi identificado RFLPs que diferenciassem estes isolados de acordo com a produção de aflatoxinas, mas foi observado correlações com a localização geográfica de onde são pertencentes. Esta análise proveu um método simples para distinguir estes fungos e é consistente com métodos convencionais, tornando-se informação adicional nos estudos de taxonomia e de evolução nesse gênero.

Em *Colletotrichum*, BRAITHWAITE et al. (1990), utilizaram esta técnica para estimar a origem, dos tipos A e B da espécie *C. gloesporioides* e as relações genéticas entre eles. Este fungo é causador da antracnose em culturas de *Stylosanthes* spp. O tipo A ocorre em muitas espécies desta cultura e caracteriza-se por lesões nas folhas e caules. O tipo B ocorre somente em *S. guianensis* e causa necrose generalizada na planta. O DNA genômico de oito isolados, quatro de cada tipo, de origem australiana, foram hibridizados com sonda heteróloga de DNA ribossômico de *Aspergillus nidulans* e sondas homólogas constituídas de fragmentos de DNA randômicos dos tipos A e B. Com base nos padrões de bandas, os dois tipos puderam ser distinguidos claramente, e concomitantemente com estudos morfológicos, bioquímicos e etiológicos, os pesquisadores constataram que os dois tipos são populações distintas na região da Austrália.

O fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani*, é bem conhecido pela sua variabilidade de hospedeiros, características culturais e de patogenicidade. Os seus isolados têm sido divididos em grupos baseados em anastomoses entre hifas de isolados crescidos em meio de cultura sólido. Esta característica é usual para reconhecer os isolados, mas não apresenta nenhuma informação de variação genética e relação filogenética entre os grupos. Numa tentativa de avaliar a metodologia da RFLP para solucionar os problemas taxonômicos e para investigar a diversidade genética dos grupos de anastomoses, JABAJI-HARE et al. (1990), usaram 38 isolados, pertencentes a dez diferentes grupos de anastomoses e de diferentes regiões geográficas. O DNA genômico dos isolados, foi usado para hibridizar com sondas homólogas de DNA nuclear de um dos isolados e sondas heterólogas de DNA ribossômico de *Armillaria ostoyae*. Os resultados mostraram considerável homologia entre sequências de *R. solani* e genes clonados de RNA ribossômico de *A. ostoyae*. Isso foi esperado, uma vez que esses genes apresentam regiões conservadas. Com estas sondas, foi observado variabilidade dentro e entre os grupos. Com as sondas homólogas, só houve hibridização com um dos dez grupos de anastomoses, sugerindo que estas sondas sejam sequências com uma ou poucas cópias por genoma e podem ser usadas para estudos neste grupo específico.

Com este mesmo objetivo, VILGALYS & GONZALEZ (1990), usaram DNA genômico de 87 isolados desta mesma espécie e de diferentes regiões geográficas, para ser hibridizado com sondas homólogas de DNA ribossômico de um dos isolados. Os resultados detectaram considerável diferença nos padrões de restrição de DNA ribossômico com o complexo de *R. solani*. Estas diferenças foram observadas entre os

grupos de anastomoses e entre diferentes isolados.

Nos dois trabalhos descritos acima que envolvem o fungo *R.solani*, os autores encontraram excessiva variabilidade nos padrões de restrição quando compararam isolados de mesma espécie, usando DNA ribossômico como sonda (sonda heteróloga no trabalho JABAJI-HARE et al., 1990 e sonda homóloga no trabalho de VILGALYS & GONZALEZ, 1990). A complexidade dos padrões de restrição foi inesperada pois estudos similares detectaram pouca variação em outros fungos. Esta diferença pode ser atribuída a várias causas, incluindo fatores genéticos (perda ou ganho de sítios de restrição) e fatores que afetam a especificidade da enzima (metilação) e digestibilidade.

Esta técnica foi usada por HAJEK et al. (1990) para confirmação de que o fungo *Entomophaga maimaiga* foi o responsável pela severa redução de mariposas *Lymantria dispar* norte-americanas no ano de 1989. Eles usaram DNA genômico, extraído de fungos isolados de larvas infectadas, coletadas em populações atacadas e como sonda o DNA ribossômico da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e DNA de *Entomophaga auilcae*. Os resultados corroboraram os anteriores, de que o *Entomophaga maimaiga* foi o responsável pela redução da *Lymantria dispar*.

Em um ultimo relato, RFLP foi também utilizada para estudar polimorfismos entre raças e "formae speciales" do fungo fitopatogênico do trigo, *Puccinia graminis tritici* (ANDERSON & PRYOR, 1992). Suas populações, mostram alto nível de variabilidade na virulência contra alguns hospedeiros que contém genes para resistência. Os autores lançaram mão dos marcadores RFLPs para detectar variabili-

dade entre as espécies estudadas, uma vez que marcadores de virulência são submetidos a forte seleção e marcadores isoenzimáticos têm revelado pouca variação, limitando assim o seu uso. Eles usaram RNA poliadenilado, extraído de urediósporos germinados da espécie *P. graminis tritici*, para construção das sondas de cDNA. Um total de nove sondas foram escolhidas para serem hibridizadas com o DNA genômico de três raças de *P. graminis tritici*, duas "formas especiais" desta raça e uma raça de *P. recondita*. Num total de sete das nove sondas usadas, hibridizaram com o DNA da raça *P. recondita*. Entre as raças de *P. graminis tritici* as denominadas 343 e 34 mostraram-se mais similares entre si do que com a denominada 126.

Os trabalhos apresentados neste item da revisão, demonstram claramente que muitos problemas de origem taxonômica e evolutiva podem ser resolvidos pela técnica de RFLP. Em todos os estudos mencionados, os autores citam a eficiência no uso desta técnica e a classificam como uma "ferramenta" valiosa para os estudos genéticos atuais.

2.2.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD é um método de amplificação de fragmentos de DNA, que utiliza "primers" de sequências nucleotídicas arbitrárias e o sistema de PCR.

PCR é a abreviatura de "Polymerase Chain Reaction" e consiste em um método onde se obtém *in vitro* o aumento da quantidade de uma determinada sequência de DNA. Para tanto, utiliza-se a enzima DNA polimerase, cofatores,

desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), tampões apropriados, primers e o DNA molde, sendo este sistema colocado sob condições controladas. Para o monitoramento destas condições, desenvolveu-se um equipamento onde o perfil térmico pode ser programado com relação ao tempo e dimensão. Este perfil é o chamado ciclo de amplificação (WHITE et al., 1989).

Uma maior eficiência deste método foi alcançada com o uso das enzimas Taq polimerase e Vent polimerase, isoladas de *Thermus aquaticus* e *Thermococcus litoralis* respectivamente. Estas enzimas são termoestáveis e devido a isso, torna-se desnecessário acrescentar uma nova quantidade de enzima a cada ciclo (WHITE et al., 1989).

A análise por RAPD tem sido útil para mapeamento genético e estudos de taxonomia e evolução. É uma técnica altamente sensível a diferenças de nucleotídeos entre o primer e o DNA molde, incluindo diferenças em um único nucleotídeo (WILLIAMS et al., 1990). Para que o fragmento seja amplificado (Figura 1), é necessário que o primer reconheça e se ligue à sequência de DNA numa das fitas e um outro primer se ligue à fita complementar. Os primers dispostos nas extremidades da sequência a ser amplificada, um em cada uma das fitas, fornecem a extremidade 3' livre para a atuação da DNA polimerase. A reação é aquecida a 90-95°C para desnaturação do DNA molde, sofre um resfriamento entre 40-60°C para permitir o anelamento dos primers aos sítios apropriados no DNA molde e um novo aquecimento de 70-75°C para que DNA polimerase sintetize novas fitas de DNA, completando-se assim o primeiro ciclo de amplificação. Nos ciclos seguintes, os primers irão se ligar nas fitas originais de DNA e também nas sintetizadas

dos ciclos anteriores.

Polimorfismos são identificados pela presença de um fragmento específico de DNA amplificado em um determinado local, comparado à ausência do mesmo ponto de um outro local. Cada banda de DNA amplificado é o resultado da interação entre o primer e o DNA molde (WILLIAMS et al., 1991).

Figura 1 - Esquema básico de amplificação de DNA por PCR.

O nome RAPD, foi sugerido por WILLIAMS et al. (1990). Paralelamente, WELSH & McCLELLAND (1990), trabalhando com a mesma técnica, sugeriram o nome AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction). Segundo WELSH et al. (1991b), RAPD vem a ser um sub-grupo de AP-PCR que utiliza primers grandes. Apesar da anuência de ambos os grupos, de que os trabalhos deveriam ser referidos como simultâneos, a denominação proposta por WILLIAMS tem sido a mais aceita.

Segundo WELSH e McCLELLAND (1990), a explicação para o fenômeno AP-PCR baseia-se no seguinte: a uma temperatura adequada, os primers podem acoplar-se em muitas regiões do DNA desnaturado em questão. Alguns destes primers estarão distanciados uns dos outros poucas centenas de bases e em fitas opostas do DNA. As sequências entre estas posições serão amplificadas pelo sistema de PCR. A origem dos fragmentos que são amplificados é dependente da sequência do primer, da sequência de DNA molde, da eficiência da iniciação em cada par de sítios de acoplamento e da extensão do segmento.

De acordo com WILLIAMS et al. (1990), o comprimento mínimo de um primer é de 9 bases, devendo ter o conteúdo GC de no mínimo 40% e não conter sequências palindrômicas. Estas restrições, determinadas em diferentes situações de temperatura de acoplamento, asseguraram um nível detectável de produtos amplificados.

WELSH & McCLELLAND (1990), sugerem que os primers a serem utilizados, componham um grupo padrão. Desta forma, dados de diferentes autores poderiam ser comparados com facilidade. No trabalho citado acima, são

sugeridas algumas sequências de primers.

Os grupos de pesquisadores sugerem várias condições para a realização desta técnica. WILLIAMS et al. (1990) e CARLSON et al. (1991) sugerem 45 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 36°C e 2 minutos a 72°C. FAIRBANKS et al. (1991), sugerem 45 ciclos de 3 minutos a 93°C, 1 minuto a 35°C e 2 minutos a 72°C.

Segundo WELSH & McCLELLAND (1990), a temperatura pode necessitar de ajuste caso sejam empregados primers muito pequenos ou muito grandes, e também se empregados genomas complexos.

Com relação a concentração de DNA molde, WELSH & McCLELLAND (1990), consideraram entre 7,5ng e 30pg adequado para a amplificação, quando utilizado um primer de 34 bases. Níveis de concentração abaixo deste, produziram amplificações esporádicas. Para WILLIAMS et al. (1990), 25 ng de DNA genômico foi o suficiente para analisar amostras provenientes de humanos, soja, *Neurospora crassa*, milho, *Escherichia coli* e outras bactérias.

Todos estes autores consideram necessário testar previamente diferentes concentrações do DNA molde bem como diferentes primers.

Para a visualização dos fragmentos amplificados, pode-se utilizar coloração do gel com brometo de etídio (WILLIAMS et al., 1990), ou também desoxinucleotídeos (dNTPs) marcados radioativamente (WELSH & McCLELLAND, 1990).

Objetivando-se a otimização da técnica,

CARLSON et al. (1991), trabalhando com coníferas, apontou alguns aspectos relevantes a repetibilidade e identificação dos produtos amplificados. Dentre estes, merecem destaque:

- a) concentração e fonte da enzima DNA polimerase;
- b) concentração do íon Mg^{++} ;
- c) concentração do DNA molde sendo que altas concentrações estão relacionadas com o aumento da resolução e repetibilidade dos fragmentos;
- d) bandas de DNA de menor peso molecular são de mais fácil repetição como marcadores RAPD do que bandas de maior peso;
- e) variabilidade pode ser causada pelo próprio aparelho de PCR.

A seguir, serão expostos alguns dos trabalhos, que utilizaram a técnica de RAPD, em vários organismos envolvendo vegetais, animais e microrganismos.

O trabalho de WILLIAMS et al. (1990) envolveu DNA genômico de humanos, soja, milho, *Neurospora crassa* e bactérias. Os autores obtiveram no mínimo um tipo de polimorfismo em cada uma das espécies analisadas. Com modificações de apenas uma das dez bases de um primer, este grupo demonstrou que uma alteração nucleotídica no primer (por inferência no DNA molde), determina se um dado segmento será ou não amplificado. No trabalho realizado com *E. coli*, ficou comprovado que genomas pequenos suportam a amplificação e podem ser distinguidos de acordo com o seu padrão de bandas em um gel de agarose. Utilizando 66 indivíduos F₂, segregantes do cruzamento de *Glycine max* e *Glycine soja*, eles demonstraram a utilidade de marcadores RAPD no mapeamento genético. Utilizando os fragmentos amplificados como sondas para hibridização na técnica de RFLP, foram comparados os resultados do mapeamento com

marcadores RAPD, com aqueles obtidos com marcadores RFLP. Pelos dados obtidos, ficaram confirmadas as posições no mapa de marcadores RAPD. Os autores observaram que os marcadores RAPDs podem ser eficientes em regiões genômicas onde os marcadores RFLPs não são. Através da marcação radioativa dos fragmentos amplificados pela técnica de RAPD, e estes sendo utilizados como sondas, foi possível verificar que os marcadores são oriundos de regiões de DNA de cópia única, DNA medianamente repetitivo e DNA altamente repetitivo.

O trabalho de WELSH & McCLELLAND (1990), mostrou através da análise por RAPD, variação intraespecífica em linhagens de *Staphylococcus aureus*; e em arroz (*Oryza sativa* L.), também foi constatada variações no padrão de produtos amplificados a nível interespecífico e intraespecífico.

WELSH et al. (1991b), testaram a validade do método para a determinação de linhagens paternas de milho híbrido. Utilizando o primer M13 (primer universal), foram identificados três cruzamentos de linhagens que deram origem a três híbridos avaliados, ou seja, com apenas um primer e em um único experimento, conseguiu-se distinguir seis linhagens e definir os descendentes na geração F1.

WILDE et al. (1992), utilizando marcadores RAPD na diferenciação de espécies de cacau (*Theobroma cacao*), conseguiram estabelecer padrões de amplificação distintos para os treze acessos testados. De 13 primers testados, quatro forneceram padrões complexos e foram descartados e os nove restantes foram utilizados para analisar a extensão e natureza do polimorfismo.

Em camundongos (*Mus musculus*), foi utilizado pela primeira vez uma matriz de combinações de pares de primers de sequências diferentes para fazer distinção entre raças desta espécie, demonstrando assim a aplicação deste tipo de matriz no mapeamento genético e análise de polimorfismos (WELSH & McCLELLAND, 1991 e 1991 a).

RIEDY et al. (1992), utilizando a técnica de RAPD para avaliar a paternidade em um grupo de babuínos e humanos, usaram 5 de um total de 20 primers, em um grupo de 24 indivíduos de progênies conhecidas, incluindo 10 babuínos e 14 humanos. Cada RAPD produziu um padrão distinto de produtos de amplificação, consistindo de 3 a 18 bandas. Todos os primers reproduziram padrões de bandas não parentais ou seja, segmentos amplificados na descendência que não corresponderam a nenhum segmento amplificado nos paternais, tanto em babuínos quanto em humanos. Os autores atentaram para a improvável contaminação das amostras ou dos reagentes, em vista da presença de controles e a da repetibilidade das novas bandas. A explicação para estes resultados pode ser devida a mutação produzindo novas bandas, mas seria necessário uma alta taxa para gerar o número de fragmentos não parentais observados. A presença de artefatos da PCR, gerados pelo erro da enzima polimerase durante a amplificação, adicionando nucleotídeos que não correspondem ao DNA molde, também pode explicar os resultados deste trabalho. Estes resultados, fazem questionar o emprego desta técnica nos estudos de paternidade. Os autores enfatizam a necessidade de examinar cuidadosamente os componentes utilizados nesta técnica e até mesmo modificá-la, de maneira a se eliminar os problemas encontrados.

Esta técnica, também se apresenta útil para

mapeamento genético em fungos, como demonstrou WILLIAMS et al., (1991). O trabalho destes autores, feito com o fungo *Neurospora crassa*, envolveu 38 progênies obtidas do cruzamento entre duas linhagens. Eles analisaram a distribuição de cinco marcadores RAPD encontrados entre as linhagens, nas progênies. Através de um programa computacional, juntamente com outros dados obtidos por RFLP para mapeamento nesta mesma população, eles fizeram a distribuição dos marcadores RAPD, nos grupos de ligação I, V e VI. Também neste trabalho, os autores apresentaram resultados obtidos com a combinação de dois primers ao mesmo tempo para o desenvolvimento da PCR. Eles usaram o genoma de soja, para testar todas as combinações possíveis entre sete primers de dez bases cada. Esperou-se que uma variedade maior de segmentos fosse observada, nas condições experimentais realizadas, se comparado com o uso dos primers individualmente, mas o número de bandas foi diminuído. Isto sugere que embora seja possível gerar produtos de amplificação adicionais, pelo uso de combinações de primers, a eficiência é substancialmente reduzida pelo aparente limite no número total de bandas que podem ser produzidas pela reação de amplificação.

A potencialidade desta nova metodologia mostra-se clara nesses trabalhos. A exceção do problema do grande número de bandas não paternais em progênies de belduinos e humanos, a técnica tem mostrado resultados satisfatórios e por vezes até comprovados pela RFLP.

3. MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

3.1. Linhagens do fungo *Trichoderma*

As linhagens do fungo *Trichoderma* utilizadas no presente trabalho estão relacionadas na Tabela 1. As linhagens EQ2, T21P, EST3, T10P, T1V, T1SE e TW6 foram cedidas pelo Dr. Itamar Soares de Melo, do Centro Nacional de Pesquisa e Defesa da Agricultura (CNPDA-EMBRAPA) localizado em Jaguariuna- SP. As outras foram originadas do estoque do Setor de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

Todas as linhagens foram identificadas pelo Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco-Recife.

Tabela 1- Linhagens de *Trichoderma* utilizadas e suas procedências.

Nomenclatura		Identificação	Procedência
1	M	<i>T. pseudokoningii</i>	Reserva ecológica do CPATU Belém - PA.
2	V	<i>T. pseudokoningii</i>	Estoque de madeiras de Piracicaba - SP.*
3	EQ2	<i>T. pseudokoningii</i>	Raiz de eucalipto da região de Piracicaba SP.
4	EST3	<i>T. pseudokoningii</i>	Estrada da região de Piracicaba - SP.
5	T10P	<i>T. pseudokoningii</i>	Solo de plantação de pimentão. Recife -PE.
6	T21P	<i>T. pseudokoningii</i>	Solo de plantação de pimentão - Mogi das Cruzes - SP.
7	TIV	<i>T. pseudokoningii</i>	Estrada da região de Piracicaba - SP.
8	TISE	<i>T. pseudokoningii</i>	Solo da região de Piracicaba - SP.
9	TAL1	<i>T. viride</i>	Plantação de alface de Mogi das Cruzes SP.
10	T2B	<i>T. viride</i>	Plantação de alface de Mogi das Cruzes SP.
11	Fc59	<i>T. viride</i>	Estoque de madeiras de Piracicaba - SP.*
12	Fc35	<i>T. viride</i>	Estoque de madeiras de Piracicaba - SP.*
13	TW6	<i>T. koningii</i>	Estrada da região de Piracicaba - SP.
14	R	<i>T. reesei</i> QM 9414	Mutante celulolítico isolado no "U.S. Army Natick Development Center" - Natick E.U.A. (Mandels et al.1971).

* Estoques de madeiras das indústrias de papel RIPASA s/a, CHAMPION s/a e Indústria de Papel de Piracicaba (IPP).

3.2. Plasmídios utilizados

O plasmídeo pUEXO (Figura 2). é derivado do pUC 18 e contém a molécula do cDNA do gene celobiohidrolase CBH 1.1 de *Phanerochaete chrysosporium*.

O plasmídeo pBT3 (Figura 3). é derivado do pUC 12 e contém o gene da β -tubulina do fungo *Neurospora crassa*.

Os dois plasmídios foram cedidos pela Profa. Dra. Maria Sueli Soares Felipe - Universidade de Brasília, Brasília, D.F.

3.3. Sondas moleculares

Como sondas moleculares (Figura 4), foram utilizados fragmentos contendo o cDNA do gene de celobiohidrolase de *P. chrysosporium*, e o gene da β -tubulina de *N. crassa*.

3.3.1. Sonda CBH 1.1

Fragmento de 1.7 kb resultante da digestão do plasmídeo pUEXO com a enzima Eco RI.

3.3.2. Sonda β -tubulina

Fragmento de 1,6 kb resultante da digestão do plasmídeo pBT3 com a enzima Eco RI.

Figura 2 - Mapa de restrição do plasmídeo pUEXO. Os sítios de restrição que estão abreviados são: A, Ava I; B, Bam HI; Bg, Bgl I; E, Eco RI; H, Hin DIII; K, Kpn I; P, Pst I; Sa, Sal I; Sm, Sma I; St, Stu I; X, Xho I.

Figura 3 - Mapa de restrição do plasmídeo pBT3. Os sítios de restrição que estão abreviados são: B, Bam HI; E, Eco RI; H, Hin DIII; K, Kpn I; N, Nco; P, Pst I; Sa, Sal I; Sm, Sma I; Ss, Sst I; X, Xho I.

Figura 4 - Representação esquemática dos fragmentos purificados dos plasmídios pUEX0 e pBT5.

3.4. Padrão de peso molecular

O bacteriófago lambda foi utilizado como marcador de peso molecular nas eletroforeses em gel de agarose. Para isso o seu DNA foi submetido à digestão, com as enzimas de restrição Eco RI e Hin DIII durante 3 horas e aquecido a 65°C durante 10 minutos.

MÉTODOS

3.5. Preparo de meios de cultivo

3.5.1. Meio MYG para crescimento micelial

- Extrato de malte	5.0 g
- Extrato de levedura	2.5 g
- Glicose	10.0 g
- Água destilada	1000.0 ml

O pH foi ajustado para 6.5 com NaOH 1 N e esterilizado em autoclave por 20 minutos a 120°C.

3.5.2. Meio completo (PONTECORVO et al., 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973).

- NaNO ₃	6.0 g
- KH ₂ PO ₄	1.5 g
- KCl	0.5 g
- MgSO ₄ 7H ₂ O	0.001 g
- ZnSO ₄	0.001 g
- Glicose	10.0 g
- Extrato de levedura	0.5 g
- Peptona	2.0 g
- Caseína hidrolisada	1.5 g
- Solução de vitaminas (item 3.6.2.5)	1.0 ml
- Água destilada	1000.0 ml

O pH foi ajustado para 6.5 com NaOH 1 N e esterilizado em autoclave por 20 minutos a 120°C. Para meio sólido, foi acrescentado 15 g de agar.

3.6. Preparo de soluções

3.6.1. Soluções tampão

3.6.1.1. Tampão R

-Trisma base	740,0 mg
-EDTA	1,2 mg
-Água destilada	100,0 ml

O pH foi ajustado para 7,5 com HCl e estocado a 4°C.

3.6.1.2. TEB 10X

-Trisma base	108,0 g
-Ácido bórico	55,0 g
-EDTA 0,5 M (pH 8,0)	40,0 ml
-Água destilada	1000,0 ml

O pH foi ajustado para 8,0 com HCl. Para TEB em concentrações menores, foram feitas diluições apropriadas com água destilada.

3.6.1.3. Tampão de amostra para DNA

-Glicerol	20,0 ml
-SDS	2,0 mg
-Azul de bromofenol	0,05 mg
-Água destilada	100,0 ml

A solução foi aquecida sem atingir o ponto de ebulição e estocada em aliquotas a 4°C.

3.6.1.4. Tampão para eluição da coluna de Biogel

-Trisma base	0,242 g
-NaCl	0,584 g
-EDTA	0,037 g
-Água destilada	100,0 ml

3.6.1.5. Tampão de amostra da coluna de Biogel

Ao tampão do item anterior, acrescentou-se:

-Glicerol (v/v) 50 ml

-Azul de bromofenol (p/v) 0,05 mg

O tampão foi distribuído em aliquotas em tubos "Eppendorf" e guardado a -20°C .

3.6.1.6. Tampão de extração de DNA

-EDTA (0.5 M) 0.6 ml

-NaCl (5 M) 0.6 ml

-SDS (20%) 0.75 ml

-Tris HCl 1 M pH 8,0 1,2 ml

- β -mercaptoetanol 20 μl

-Espermidina 120 μl

A solução foi completada para 30 ml com água destilada.

3.6.1.7. Solução Tris HCl 1 M, pH 8.0

-Trisma base 121.1 g

-Água destilada 1000.0 ml

O pH foi ajustado para 8.0 com HCl concentrado e esterilizado em autoclave durante 20 minutos a 120°C .

3.6.1.8. Solução tampão do gel separador

-Trisma base 45.75 g

O trisma base foi dissolvido em 60 ml de água destilada. o pH foi ajustado para 8.9 com HCl 1 N. o volume completado para 100 ml. confirmado o pH e a solução foi filtrada e armazenada a temperatura ambiente.

3.6.1.9. Solução tampão do gel empilhador

-Trisma base 7.47 g

O Trisma base foi dissolvido em 60 ml de água desti-

lada, o pH foi ajustado para 6,8 com HCl 1 N o volume completado para 100 ml, confirmado o pH e a solução foi filtrada e armazenada a temperatura ambiente.

3.6.1.10. Solução tampão do tanque (10 X)

-Trisma base	63,2 g
-Glicina	39,9 g
-Água destilada	1000.0 ml

Após dissolução, o volume foi completado para 1000 ml, filtrado e armazenado. No momento do uso, a solução foi diluída em 1:10 com água destilada.

3.6.1.11. Solução tampão da amostra para isoenzimas

-Glicerol	5 ml
-Tampão do gel empilhador	2,5 ml
-Azul de bromofenol	2,5 mg

O volume foi completado para 25 ml com água destilada e a solução foi armazenada a -20°C.

3.6.1.12. Solução tampão 10X para RAPD

-Tris HCl pH 8,5	200 mM
-KCl	500 mM
-MgCl ₂	60 mM
-Soro albumina bovina (BSA)	1000µg/ml

3.6.2. Outras soluções

3.6.2.1. Solução salina 0,9% (p/v)

-NaCl	0,9 g
-Água destilada	100 ml

O volume foi distribuído em aliquotas e mantido a 4°C.

3.6.2.2. Solução estoque de NaAc 3 M

-NaAc (acetato de sódio) 408.1 g

-Água destilada 1000.0 ml

Ajustado o pH para 5.5 com ácido acético glacial e esterilizado em autoclave durante 20 minutos a 120°.

3.6.2.3. Solução estoque de NaCl 5 M

-NaCl 292.2 g

-Água destilada 600.0 ml

Após a dissolução, o volume foi ajustado para 1000 ml e a solução foi esterilizada em autoclave durante 20 minutos a 120°C.

3.6.2.4. Solução estoque de SDS 20%

O SDS (dodecil sulfato de sódio) foi dissolvido em 300 ml de água destilada, (aquecendo a solução a 70°C), ajustado o pH para 7,2 com HCl 1N, completado o volume para 500 ml, confirmado o pH e estocado a temperatura ambiente.

3.6.2.5. Solução de vitaminas

-Ácido nicotínico 100.0 mg

-Ácido P-aminobenzoico 10.0 mg

-Biotina 0.2 mg

-Piridoxina 50.0 mg

-Riboflavina 100.0 mg

-Tiamina 50.0 mg

-Água destilada 100 ml

Após a dissolução, a solução foi aquecida em banho-maria a 90°C durante 20 minutos e conservada em frasco escuro a 4°C.

3.6.2.6. Solução RNase A

-RNase A	10 mg
-Tris HCl pH 7,5	10 mM
-NaCl	15 mM

A solução foi aquecida em banho-maria a 95°C por 15 minutos, resfriada lentamente e guardada a -20°C.

3.6.2.7. Solução de brometo de etídio

-Brometo de etídio	1 g
-Água destilada	100 ml

O brometo foi dissolvido, guardado em frasco escuro e utilizado com precauções devido a sua ação mutagênica.

3.6.2.8. Solução de fenol hidratado, pH 7.0

O fenol puro cristalizado foi fundido em banho-maria a 65°C. Foi acrescentado o mesmo volume de água destilada e a mistura foi agitada por cerca de 30 minutos em agitador magnético. A fase aquosa foi descartada e substituída por solução de Tris HCl 1 M, pH 8,0, novamente agitado por 30 minutos e conferido o pH da fase fenólica. Foram acrescentados 0,05% de 8-hidroxiquinolina e meio volume de solução de Tris HCl 0.1 M pH 8,0. A solução foi estocada em frasco escuro a 4°C e usada com precauções devido a sua toxicidade.

3.6.2.9. Solução de SSC 20X

-NaCl	175,3 g
-Citrato trissódico	88,2 g
-Água destilada	1000 ml

O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 10 N. No momento do uso, foram feitas soluções apropriadas com água destilada.

3.6.2.10. Solução desnaturante

-NaCl	43,8 g
-------	--------

-NaOH	10,0 g
-------	--------

Foi acrescentado água destilada para um volume final de 500 ml, e a solução foi filtrada e estocada a 4°C.

3.6.2.11. Solução neutralizante

-Tris base	60,5 g
------------	--------

-NaCl	58,0 g
-------	--------

Foi acrescentado água destilada para um volume final de 500 ml, o pH foi ajustado para 5,0 com HCl concentrado e a solução foi filtrada e estocada a 4°C.

3.6.2.12. Solução de pré-hibridização

-SSC	6X
------	----

-SDS (p/v)	0,5%
------------	------

-Solução de Denhardt's	5X
------------------------	----

-DNA de esperma de salmão	10 mg/ml
---------------------------	----------

Preparada no momento de uso.

3.6.2.13. Solução de hibridização

-SSC	6X
------	----

-SDS (p/v)	0,5%
------------	------

-Solução de Denhardt's	5X
------------------------	----

-NaEDTA	10 mM
---------	-------

-Sonda marcada radioativamente (item 3.14.1).	
---	--

3.6.2.14. Solução de Denhardt's (50X)

-Ficol	5 g
--------	-----

-Polivinilpirrolidona	5 g
-----------------------	-----

-Albumina sérica bovina (BSA)	
-------------------------------	--

Pentax, Fração V (Sigma)	5 g
--------------------------	-----

-Água destilada 500 ml

A solução foi esterilizada em filtro milipore e estocada a -20°C.

3.6.2.15. Solução estoque de acrilamida 30%

-Acrilamida 75 g

-Bis acrilamida 2 g

Os componentes foram dissolvidos em água destilada para um volume final de 250 ml e a solução foi filtrada e armazenada a 4°C. Sua utilização foi cuidadosa devido à ação neurotóxica.

3.6.2.16. Gel separador a 10%

-Tampão do gel separador (item 3.6.1.8) 1.5 ml

-Acrilamida (item 3.6.2.15) 5,0 ml

-Água destilada 8,4 ml

-Persulfato de amônia a 10% 0,112 ml

-Temed 0,005 ml

3.6.2.17. Gel empilhador a 4%

-Tampão do gel empilhador (item 3.6.1.9) 0.75 ml

-Acrilamida (item 3.6.2.15) 1,0 ml

-Água destilada 5,7 ml

-Persulfato de amônia a 10% 0,056 ml

-Temed 0,008 ml

3.6.2.18. Solução corante para esterases

Substratos:

α -naftil acetato 1% em solução aquosa de acetona 50%

β -naftil acetato 1% em solução aquosa de acetona 50%

Corantes:

-"Fast blue RR" 50 mg

-Tris HCl 0,5 M pH 7,1 5 ml

- α -naftil acetato	0,75 ml
- β -naftil acetato	0,75 ml
-Água destilada	43,5 ml

-O gel foi incubado a temperatura ambiente até as bandas aparecerem, lavado em água e fixado em glicerol a 10%.

3.6.2.19. Solução corante para fosfatase alcalina

- α -naftil fosfato de sódio a 1% em acetona 50%	1,5 ml
-"Fast Blue RR"	50 mg
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ a 1 M	0,5 ml
- $MnCl_2$ a 1M	0,5 ml
-Tris HCl a 50 mM, pH 8,5	50 ml

-O "Fast Blue RR" foi dissolvido na solução de α -naftil fosfato de sódio e após isso foi adicionado solução tampão e os demais componentes. O gel foi incubado no escuro a 30°C até as bandas aparecerem. A fixação foi feita em solução aquosa de glicerol 10%.

3.7. Manutenção das linhagens

As linhagens foram mantidas em tubos inclinados de meio completo sólido (item 3.5.2). Após a inoculação dos esporos, os tubos foram incubados a 25°C por 3 dias, sendo então selados e guardados convenientemente a 4°C. O estoque foi renovado a cada 6 meses.

3.8. Obtenção de micélio para extração de DNA genômico

Aproximadamente 10^8 con/dios foram ressuspensos em 10 ml de solução salina 0,9% (item 3.6.2.1), sen-

do 1 ml inoculado em frasco "Erlenmeyer" de 500 ml contendo 250 ml de meio MYG (item 3.5.1) e colocado sob agitação de 120 rpm a 28°C por 18 horas.

O micélio foi coletado a vácuo, lavado em água destilada esterilizada, determinado o seu peso úmido, congelado com nitrogênio líquido e estocado a -70°C até o momento do uso.

3.9. Extração e purificação de DNA genômico de micélio

Dentre os vários métodos para extração e purificação de DNA encontrados na literatura, o método utilizado para realização deste trabalho foi o descrito por BORGES et al. (1990).

Para cada preparação, foram utilizados entre 0,5 g e 1,0 g de micélio estocado. O micélio foi pulverizado em almofariz, sob nitrogênio líquido, até a obtenção do pó micelial. Este foi dividido em duas partes, colocados em tubos "Falcon", adicionado em cada um 15 ml de tampão de extração de DNA (item 3.6.1.6) e homogeneizado. Um volume igual de fenol hidratado (item 3.6.2.8) foi acrescentado, procedendo-se a uma leve homogeneização e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. A fase fenólica foi desprezada enquanto se recuperou a fase aquosa, ou seja, o sobrenadante. Este procedimento usando o fenol foi repetido e a fase aquosa desta repetição foi acrescentado 10 ml de fenol-clorofórmio na proporção de 1:1, suavemente homogeneizado e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi recuperada e a esta, adicionou-se 10 ml de clorofórmio, mais uma vez homogeneizado e centrifugado na mesma condição.

anterior, recuperado o sobrenadante num tubo "Corex" de 15 ml, acrescentado 10% do volume, de acetato de sódio 3 M (item 3.6.2.2), e a seguir dois volumes de etanol absoluto previamente esfriado. Os tubos foram homogeneizados e colocados em repouso por um período de aproximadamente 2 horas a -20°C. Procedeu-se a centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e lavando o precipitado com etanol absoluto e com etanol 70%. O material foi secado usando-se bomba de vácuo, ressuspendido cuidadosamente com tampão R (item 3.6.1.1) e tratado com 5 µl de solução RNase (item 3.6.2.6) por 15 minutos a 37°C. A seguir, foi feita a análise do DNA quanto ao seu grau de pureza, concentração e integridade através de eletroforese em gel de agarose (item 3.10).

3.10. Análise de DNA através de eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK et al., 1989)

A eletroforese em gel de agarose constituiu-se em uma técnica simples, rápida, sensível e foi utilizada em várias etapas deste trabalho. Na análise da integridade, concentração e grau de pureza do DNA genômico, monitoração dos processos de digestão enzimática do DNA e estimativa de peso molecular dos fragmentos do DNA plasmidial e das bandas obtidas com as técnicas moleculares RFLP e RAPD desenvolvidas.

Para o preparo do gel, a agarose (tipo 1 Sigma) foi misturada ao tampão TEB 1X (item 3.6.1.2), fundida por ebulição e, para cada 100 ml do tampão foi acrescentado 5 µl de brometo de etídio (item 3.6.2.7). A concentração da agarose variou de 0,8% para RFLP e 1,5% para

RAPD. As amostras adicionou-se tampão de amostra (item 3.6.1.3) numa proporção de 10% dos seus volumes e as mesmas foram então aplicadas nos poços do gel, sendo TEB 1X o tampão da cuba. O gel foi submetido a uma voltagem que variou de 30 a 70 V para os géis da técnica do RFLP e de 100 a 150 V para os géis da técnica do RAPD. O término da eletroforese foi sempre monitorado pela migração do corante azul de bromofenol presente no tampão de amostra. Ao final, o material no gel foi analisado em transiluminador de luz ultravioleta, comprimento de onda longo (360 nm) e o gel fotografado com filtro laranja.

3.11. Digestão total do DNA genômico e plasmidial

O DNA genômico extraído foi quantificado de acordo com o item 3.10, de forma a se estabelecer para as reações uma relação conveniente das concentrações de enzima/substrato segundo os fabricantes.

O DNA genômico das linhagens foi submetido a digestão dupla pelas enzimas de restrição Eco RI e Bam HI, sendo que para um total de 30 µl, foram utilizados 5 µl de DNA (0.4 µg/µl), 3 µl de tampão NE3 10X, comum para as duas enzimas, 1.5 µl de cada enzima e 19 µl de água destilada para completar o volume final. Por se tratar de digestão total, o sistema bem homogeneizado, foi incubado durante a noite a 37°C. Uma fração do DNA digerido foi aplicado em gel de agarose 0.8% e avaliada a clivagem. Sendo esta incompleta, fez-se uma pequena correção do volume final do sistema com acréscimo de mais enzima, estendendo-se o tempo de incubação por mais 3 horas a 37°C. As enzimas (Tabela 2) foram diluídas para 20 U/µl e devidamente estocadas a

-20°C. Estas, bem como os respectivos tampões foram adquiridos do fabricante BIOLABS.

Com os plasmídios, procedeu-se da mesma forma, sendo que para o plasmídio pUEXO (0.5 µg/µl), num total de 75 µl, foram utilizados 5 µl de DNA, 5 µl de RNase, 7.5 µl de tampão 10 X para Eco RI, 1 µl de Eco RI e 56.5 µl de água. Para o plasmídio pBT3 (1 µg/µl), foram utilizados 5 µl de DNA, 3 µl de RNase, 2 µl de tampão 10 X para Eco RI, 1.5 µl de Eco RI e 8.5 µl de água para um volume final de 20 µl. Os sistemas foram incubados a 37°C, durante a noite, e analisados em gel de agarose.

3.12. Transferência do DNA para membrana de nitrocelulose (SOUTHERN, 1975)

Uma vez digerido o DNA genômico das 14 linhagens de *Trichoderma* e migrados em gel de agarose 0.8%, o gel foi tratado de maneira a se obter o DNA desnaturado, ou seja, fitas abertas, necessário ao processo de hibridização com as sondas moleculares. Para isso o gel foi tratado com solução desnaturante (item 3.6.2.10) por 30 minutos sob agitação lenta e posteriormente com solução neutralizante (item 3.6.2.11) nas mesmas condições anteriores. A membrana de nitrocelulose foi cortada no mesmo tamanho do gel, marcada em uma de suas extremidades, umedecida com água destilada e colocada na cuba de transferência (vacu-Gene Pump, Pharmacia LKB) previamente montada. O gel tratado foi colocado sobre esta membrana evitando-se bolhas entre os dois, para impedir danos na transferência do DNA. Sobre o gel foi adicionado cerca de 10 ml solução de SSC 20X (item 3.6.2.9) e ligado o vácuo em 50 mbar. Periodicamente o gel foi recoberto com esta solução evitando o res-

secamento durante as 2 horas de transferência. Após esse tempo, o sistema foi desmontado, o gel foi novamente corado com brometo de etídio e observado sob luz ultravioleta longa. Constatada a transferência, a membrana foi posta para secar a temperatura ambiente e por fim, foi feita a fixação do DNA a 80°C por 2 horas e guardada em recipiente plástico selado até o momento do uso.

Tabela 2 - Enzimas de restrição

Enzima	Sítio de restrição	Tampão de reação
Eco RI	5' G↓AATTC 3'	Tampão 10X para Eco RI
Bam HI	5' G↓GATCC 3'	Tampão 10X para Bam HI

3.13. Purificação de fragmentos de DNA

(Método de eluição por centrifugação)

Os plasmídios digeridos (item 3.11) foram analisados em eletroforese em gel de agarose, obtendo-se a separação dos fragmentos a serem utilizados como sondas moleculares e estes foram purificados pelo procedimento descrito a seguir.

As bandas do gel de agarose contendo os fragmentos (Figura 4), foram visualizadas com auxílio de luz ultravioleta longa e retiradas por corte no gel e colocadas num tubo "Eppendorf" previamente preparado com cerca de 2 mm de la de vidro e um pequeno orifício em sua base, para passagem do DNA. Este tubo foi colocado no interior de um segundo e a ele foi introduzido a banda do gel e 100 µl

de tampão R. fazendo-se uma centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos. O material foi precipitado com solução de NaCl 0,3 M (item 3.6.2.3) e 2,5 volumes de etanol absoluto, recuperado por centrifugação e ressuspensão em tampão R. Uma fração deste foi analisada em gel de agarose 0,8%.

3.14. Hibridização em suporte sólido (membrana de nitrocelulose)

3.14.1. Preparo da sonda

O fragmento de DNA a ser marcado radioativamente foi purificado como o descrito no item 3.13, a partir dos plasmídeos pUEXO e pBT3 (Figuras 2 e 3).

3.14.1.1. Marcação radioativa

A marcação foi realizada segundo o protocolo do "Kit Random - Priming" desenvolvido no laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília. O "kit" utiliza heptanucleotídeos sintéticos com todas as combinações possíveis de nucleotídeos, a partir dos quais desoxinucleotídeos radioativos ou não, são incorporados às moléculas de DNA com o auxílio da enzima Klenow.

Uma quantidade de 100 ng de DNA a ser marcado e 1 µl de primer (75 ng/µl) foram misturados e desnaturados a 100°C por 5 minutos e rapidamente colocados no gelo para que os primers pudessem ser hibridizados ao DNA da sonda. Foi acrescentado a esta mistura água destilada, os nucleotídeos TTP, CTP, GTP e ³²P-dATP e a enzima Klenow. Esse sistema foi levado a 20°C por 2 horas e posteriormente purificado como no item a seguir.

3.14.1.2. Purificação da sonda radioativa em coluna de filtração Biogel A.

Uma coluna de filtração de Biogel A foi preparada numa seringa de 1 ml fixada a um suporte. A sonda já marcada por ^{32}P -ATP foi imediatamente aplicada à coluna e eluída com 50 μl do tampão da coluna do Biogel A (item 3.6.1.5). Aliquotas de 2 gotas foram coletadas em tubos "Eppendorf" e utilizando um medidor Geiger a uma distância padrão, foi avaliada a radioatividade. As aliquotas contendo o DNA marcado foram somadas, aquecidas a 100°C por 5 minutos para nova desnaturação das fitas e utilizadas instantaneamente na solução de hibridização (item 3.6.2.13). O nucleotídeo radioativo não incorporado ficou atrasado na coluna em relação ao DNA, sendo desprezado cuidadosamente.

3.14.2. Hibridização DNA-DNA da sonda radioativa

Para a hibridização das sondas marcadas radioativamente, com o DNA genômico digerido contido na membrana de nitrocelulose, esta foi incubada com solução de pré-hibridização (0,2 ml de solução/ cm^2 de membrana), por 2 horas a 55°C sob agitação lenta. Após a pré-hibridização a membrana foi colocada em um recipiente plástico com solução de hibridização (0,1 ml de solução/ cm^2 de membrana), procedeu-se a deaeração e vedação do plástico e por fim, foi incubada a 45°C e 55°C por 12 horas em cada temperatura sob agitação branda. Terminado o período de hibridização, a membrana foi retirada cuidadosamente, submetida a lavagens sucessivas com solução de SSC (item 3.6.2.9) até a estrinência desejada, exposta ao filme de raios X e este revelado da maneira convencional. As sondas radioativas foram descartadas convenientemente.

3.15. Técnica de eletroforese de isoenzimas

Na análise do polimorfismo através de isoenzimas, o procedimento utilizado foi o descrito por Paccolla-Meirelles et al., 1988. As linhagens foram cultivadas em frascos "Erlenmeyer", contendo 30 ml de meio líquido (item 3.5.2). Após incubação por 5 dias a 28°C, a película formada foi filtrada em filtro Buchner, usando bomba de vácuo, sendo o micélio lavado 3 vezes com água destilada de forma que não permanecessem resíduos do meio de cultivo no micélio. O micélio foi levemente secado com papel de filtro, pesado e para cada 300 mg, foi adicionado 1 ml do tampão do gel empilhador esfriado (item 3.6.1.9) para ser triturado em homogeneizador elétrico. O extrato foi colocado em refrigerador, em banho de gelo durante 12 horas para completar a extração, sendo posteriormente centrifugado por 30 minutos a 15.000g sob refrigeração. O extrato protéico (sobrenadante) foi coletado e estocado em aliquotas a -20°C.

No momento do uso, 30 µl do extrato protéico de cada amostra, foi misturado com a mesma quantidade de tampão da amostra (item 3.6.1.11) e aplicado nas canaletas do gel de poliacrilamida que foi feito da maneira descrita a seguir.

A placa foi montada em sistema vertical e vedada com ágar-água (4%). O gel separador (item 3.6.2.16) foi vertido na placa e completou-se o restante com água (para que ocorresse a polimerização uniforme da borda superior do gel). Uma vez polimerizado, a água foi retirada, o gel empilhador (item 3.6.2.17) foi vertido e o pente foi então introduzido. Após polimerização do gel empilhador, o pente e o espaçador inferior da placa foram retirados cul-

dadosamente, e a placa foi fixada na cuba de corrida. A voltagem utilizada foi 100 V até o material atingir o limite entre os dois géis, sendo elevada a 200 V e permanecendo até o final da corrida.

Ao término da corrida, o gel foi retirado da placa e imerso na solução corante (itens 3.6.2.18-19).

3.16. Técnica do RFLP

Para a análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP), foram realizados os seguintes passos: o micélio das 14 linhagens de *Trichoderma*, foi obtido como descrito no item 3.8. Deste micélio, o DNA foi extraído, purificado e analisado (itens 3.9 e 3.10 respectivamente), posteriormente digerido (item 3.11) e novamente analisado em gel de agarose. Constatada a digestão total, os DNAs foram transferidos para duas membranas de nitrocelulose (item 3.12), uma para cada sonda. O passo seguinte foi obter os fragmentos a serem utilizados como sondas moleculares (itens 3.11 e 3.13) dos plasmídios pUEXO e pBT3 (Figuras 2 e 3), marca-los e purifica-los como no item 3.14.1. A hibridização foi então realizada, colocando as sondas em contato com a membrana de nitrocelulose (item 3.14.2) e por fim, foi feita a análise dos padrões de bandas existentes no filme de raios X.

3.17. Técnica do RAPD

Na realização desta técnica, foi montado um sistema com os seguintes componentes: 38,5 µl de água bi-

destilada. 5 µl de tampão 10X (item 3.6.1.12). 1 µl de dNTPs (10 mM/cada). 2 µl de primer (10 ng/µl). 2.5 µl de DNA (2 ng/µl) e 1 µl da enzima Taq polimerase (4 U/µl) produzida no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foi colocado 40 µl de óleo mineral (Sigma), para evitar a evaporação. O sistema foi homogeneizado e levado ao aparelho de PCR (Gene ATAQ Controller - Pharmacia LKB) para a reação que envolveu 36 ciclos, sendo interrompida no 18º ciclo para que se colocasse mais 1µl da enzima. Cada ciclo foi constituído de período e temperaturas definidos para os processos de desnaturação do DNA, anelamento e ação enzimática, sendo 2 minutos 95°C, 1 minuto a 35°C e 2 minutos a 72°C respectivamente. Ao término da reação, os padrões foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1.5%, como descrito no item 3.10.

Inicialmente, foram testados 5 primers, que foram desenvolvidos no laboratório de Biologia Molecular, da Universidade de Brasília, e suas seqüências são as seguintes:

Primer 49:	5' - CAGGCCCTTC - 3'
Primer 61:	5' - GGTCCTTGAC - 3'
Primer 62:	5' - GGGTAACGCC - 3'
Primer 63:	5' - CAGCACCCAC - 3'
Primer 64:	5' - TGCCGAGCTG - 3'

3.16. Agrupamento de linhagens segundo taxonomia numérica

A análise de agrupamento foi efetuada, calculando-se dois coeficientes de associação, que utilizam de variáveis binárias para verificar semelhanças entre unida-

des (ROHLF, 1988). As variáveis foram consideradas as bandas e as unidades foram as linhagens.

O algoritmo de agrupamento utilizado foi UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average), programa NTSYS-PC (ROHLF, 1988).

O coeficiente JACCARD é calculado de acordo com a fórmula $J: A/(P-D)$, onde A é o número de concordâncias positivas, ou seja, de variáveis presentes; P é o número total de variáveis; e D é o número de concordâncias negativas, ou seja, de variáveis ausentes; portanto este coeficiente utiliza como numerador somente as concordâncias positivas.

O coeficiente SIMPLE MATCHING, é calculado segundo a fórmula $SM: M/P$, onde M é o número de concordâncias (positivas e negativas); e P é o número total de variáveis; portanto, diferentemente do primeiro, este coeficiente utiliza tanto concordâncias positivas como negativas no numerador.

Por esta análise, quanto maior for a semelhança entre duas unidades, maior será o valor do coeficiente de associação.

Estes dois coeficientes de associação foram utilizados para todas as análises dos resultados obtidos por eletroforese de isoenzimas, de RFLP e RAPD.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho e a discussão correspondente serão apresentados na seguinte ordem: inicialmente, serão mostrados os resultados referentes aos padrões eletroforéticos de isoenzimas empregando-se o sistema de esterases na revelação das bandas; em seguida, teremos a análise da técnica de RFLP onde serão apresentados os perfis de bandas encontrados com a sonda de celobiohidrolase (CBH 1.1) e β -tubulina; posteriormente, serão apresentados os resultados relativos a técnica do RAPD, utilizando-se dois primers com sequências diferentes, denominados primer 63 e primer 64.

Através dos padrões de bandas obtidos pelas técnicas empregadas, foram construídos zimogramas e a partir destes, foi efetuada a análise de agrupamentos. Os dendrogramas das interrelações entre as linhagens, utilizando os coeficientes JACCARD e SIMPLE-MATCHING, foram construídos através do programa NTSIS-PC, como citado no item 3.17.

4.1. Variabilidade através de isoenzimas

O fenotipo eletroforético de proteínas e enzimas pode ser considerado a expressão do produto primário do gene, uma vez que a sequência de aminoácidos das proteínas é determinada pela sequência nucleotídica de genes estruturais. A visualização das bandas no gel, corresponde a posição de migração da enzima presente na amostra. As várias bandas visualizadas, são resultados de enzimas com cargas, tamanhos ou configurações espaciais

diferentes. A diferença de posições das bandas pode ser devida a modificações dos aminoácidos que constituem a enzima, ou seja, é o resultado de mutação ou mutações no gene(s) estrutural(ais) que codifica(m) a enzima (PACCOLA-MEIRELLES et al., 1988).

Nesta análise, foram utilizados para revelação das bandas dois sistemas de coloração (PACCOLA-MEIRELLES, 1988). Para fosfatase alcalina, o perfil eletroforético foi o mesmo, ou seja, as enzimas apresentaram migrações equivalentes em todas as linhagens analisadas, com um padrão de duas bandas de tamanhos diferentes. O padrão de bandas desse sistema, representa a semelhança das linhagens, podendo considerar que as sequências de DNA codificantes para essa enzima são as mesmas.

Já no caso do sistema para esterases α e β , as enzimas migraram em diferentes posições no gel, como mostra a Figura 5. Deste padrão de bandas, também visualizado na Figura 6, foram construídos os dendrogramas apresentados nas Figuras 7 e 8 e através destes, observa-se formação de cinco grupos de unidades, sendo dois grupos mais homogêneos: 11, 13 e 14; 9 e 10; três grupos pouco homogêneos: 1 e 2; 3 e 7; 4, 6, 8. As unidades 5 e 12 apresentaram os comportamentos mais diferenciados, por esta análise.

Figura 5 - Padrão isoenzimático de esterases das 14 linhagens de *Trichoderma*.

Figura 6 - Zimograma representativo de esterases das 14 linhagens de *Trichoderma*.

Figura 7 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando o coeficiente JACCARD, dos resultados isoenzimáticos de esterases.

Figura 8 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando o coeficiente SIMPLE MATCHING, dos resultados isoenzimáticos de este-
rases.

4.2. Variabilidade através da técnica do RFLP

Para a realização da análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP), foram seguidos os passos como descrito no item 3.15 (Material e Métodos). Como no processo de hibridização foi observado material inespecífico, dificultando a visualização das bandas tanto no uso da sonda CBH 1.1, como da sonda β -tubulina, foram feitas lavagens sucessivas das membranas após a hibridização, com aumento da estringência para que se pudesse retirar a hibridização inespecífica indesejada e permitir uma melhor visualização do padrão de bandas específicas. As condições de estringência usadas foram:

- baixa (SSC 2X / SDS 0.1% / 55°C),
- media (SSC 1X / SDS 0.1% / 60°C),
- alta (SSC 0.1X / SDS 0.1% / 60°C).

4.2.1. Uso da sonda CBH 1.1.

Como pode ser observado na Figura 9, foram identificados sinais altos de homologia da sonda CBH 1.1 com o DNA genômico das linhagens T2B e FC 59, ambas *Trichoderma viride*. Este resultado evidencia duas bandas de aproximadamente 2.5 Kb e 1.8 kb. Como já mencionado na revisão de literatura, o número de bandas é dependente do número de loci no genoma homólogo a sonda e também do número de sítios de restrição contido nestas sequências de DNA. Através dos resultados obtidos, pode-se inferir duas hipóteses:

1. há um sítio de restrição de Eco RI ou Bam HI, enzimas utilizadas para digestão do DNA das linhagens, na sequência de DNA que codifica esse gene nas linhagens de *Trichoderma* utilizadas para o estudo;
2. há mais de uma sequência desse gene no genoma das linhagens de *Trichoderma*.

Para as outras linhagens, não houve hibridização da sonda utilizada com o DNA genômico. Isto pode ser explicado pelo fato do gene que codifica para essa enzima nestas linhagens, não apresentar sequência de homologia com a sequência do DNA da sonda CBH 1.1.

4.2.2. Uso da sonda β -tubulina

O gene da β -tubulina de *Neurospora crassa* foi utilizado como sonda neste trabalho, por ser esta proteína muito conservada em termos evolutivos (ORBACH et al. 1986), sendo possível a visualização de hibridização desta sonda com o DNA das linhagens estudadas.

Os resultados apresentados na Figura 10, mostram homologia desta sonda com todas as linhagens de *Trichoderma* estudadas. Num total de duas a cinco bandas aparecem em cada uma delas. Assim como nos resultados obtidos com a sonda CBH 1.1, o número de bandas encontrado pelo uso da sonda β -tubulina, pode ser explicado pelo número de loci no genoma, e também pela presença de sítios de restrição contidos na sua sequência. A multiplicidade de bandas pode estar associada à presença de famílias de genes como é o caso da tubulina sendo esta explicação a mais acertada para estes resultados. Este argumento também é relatado no trabalho de MANICOM et al (1987) descrito na revisão de literatura. Nas canaletas A e B estão os padrões de peso molecular.

A partir do padrão de bandas, que pode ser visualizado também no zimograma apresentado na Figura 11, foram construídos os dendrogramas apresentados nas figuras 12 e 13 e através destes observa-se que os grupos mais

homogêneos são: 2, 4, 5, 6 e 8; 9 e 10; e os grupos menos homogêneos são: 1, 3 e 7; 11, 12, 13 e 14.

Figura 9 - Padrão eletroforético da RFLP com a sonda CBH 1.1. das 14 linhagens de *Trichoderma*.

Figura 10 - Padrão eletroforético da RFLP com a sonda β -tubulina das 14 linhagens de *Trichoderma*.

Figura 11 - Zimograma representativo da RFLP com a sonda β -tubulina das 14 linhagens de *Trichoderma*.

Figura 12 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando o coeficiente JACCARD do padrão de RFLP com a sonda β -tubulina.

Figura 13 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando o coeficiente SIMPLE MATCHING do padrão de RFLP com a sonda β -tubulina.

4.3. Variabilidade através da técnica do RAPD

Dos primers testados, os que apresentaram melhor distribuição de bandas, foram os denominados 63 e 64, e portanto utilizados para a realização deste estudo.

4.3.1. Uso do primer 63

O padrão de bandas de RAPD, utilizando o primer 63, encontra-se na Figura 14 e o respectivo zimograma na Figura 15.

O dendrograma das interrelações entre as linhagens de *Trichoderma*, utilizando o coeficiente JACCARD e o coeficiente SIMPLE-MATCHING, encontram-se nas Figuras 16 e 17 respectivamente.

Pela análise dos dendrogramas, utilizando o coeficiente JACCARD e SIMPLE MATCHING, observa-se que os grupos mais homogêneos são 2 e 5; 9 e 10: Os grupos menos homogêneos são: 3 e 7; 4, 6 e 8; 11, 12, 13 e 14. A unidade 1 neste caso apresenta o comportamento mais diferenciado.

Figura 14 - Padrão eletroforético da RAPD com o primer 63 das 14 linhagens de *Trichoderma*.

Figura 15 - Zimograma representativo da RAPD com o primer 63 das 14 linhagens de *Trichoderma*.

Figura 16 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando o coeficiente JACCARD do padrão de RAPD com o primer 63.

Figura 17 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando o coeficiente SIMPLE MATCHING do padrão de RAPD com o primer 63.

4.3.2. Uso do primer 64

A Figura 18 mostra os padrões de RAPD, utilizando o primer 64 e a Figura 19 mostra o respectivo zimograma.

Pela análise dos dendrogramas, utilizando os coeficientes JACCARD e SIMPLE MATCHING que encontram-se nas Figuras 20 e 21 respectivamente, os grupos mais homogêneos foram: 3 e 7; 9 e 10; 4, 6 e 8; e os grupos pouco homogêneos foram: 1, 11, 12, 13 e 14; 2 e 5.

Figura 18 - Padrão eletroforético da RAPD com o primer 64 das 14 linhagens de *Trichoderma*.

Figura 19 - Zimograma representativo da RAPD com o primer 64 das 14 linhagens de *Trichoderma*.

Figura 20 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando o coeficiente JACCARD do padrão de RAPD com o primer 64.

Figura 21 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando o coeficiente SIMPLE MATCHING do padrão de RAPD com o primer 64.

4.3.3. Uso dos primers 63 e 64

Neste estudo, os dois primers foram utilizados simultaneamente, na realização da técnica do RAPD.

O padrão de bandas encontrado neste caso, encontra-se na Figura 22 e o zimograma na Figura 23.

Pela análise dos dendrogramas, que estão demonstrados nas Figuras 24 e 25, utilizando os coeficientes JACCARD e SIMLE MATCHING respectivamente, os grupos mais homogêneos foram: 3 e 7; 9 e 10; e os grupos pouco homogêneos foram: 1, 11, 12, 13 e 14; 4, 6 e 8; 2 e 5.

Figura 22 - Padrão eletroforético da RAPD com os primers 63 e 64 das 14 linhagens de *Trichoderma*.

Figura 23 - Zimograma representativo da RAPD com os primers 63 e 64 das 14 linh. de *Trichoderma*.

Figura 24 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando o coeficiente JACCARD do padrão de RAPD com os primers 63 e 64.

Figura 25 - Dendrograma ilustrativo das interrelações entre as linhagens utilizando o coeficiente SIMPLE MATCHING do padrão de RAPD com os primers 63 e 64.

As condições da técnica do RAPD, apresentam-se diversificadas, como descrito nos trabalhos da revisão de literatura. Em relação às temperaturas para desnaturação do DNA, anelamento e ação enzimática há mudanças de um ou dois graus. O período em cada uma dessas temperaturas, também é variável, sendo que para a desnaturação, os autores usam entre um a três minutos; para o anelamento, de um a dois minutos; e somente para o período de ação enzimática eles usam a mesma temperatura. A quantidade de dNTPs parece não apresentar diferença significativa. Apesar de WELSH et al. (1990, 1991, 1991a e 1991b), admitirem primers de sequências longas, de cerca de 20 bases, WILLIAMS et al. (1991) citam que usando primers pequenos, aumenta-se a probabilidade de encontrar no genoma dois sítios para esses primers relativamente próximos e com orientação invertida, necessário para a amplificação das seqüências. A fonte e qualidade da DNA polimerase é também muito importante. Experimentos preliminares indicam que polimerases de outros organismos que não sejam da bactéria *Thermus aquaticus*, pode dar produtos de amplificação diferentes, provavelmente devido a diferenças na sensibilidade da combinação entre o primer e o DNA molde. Em todos os trabalhos analisados, o número de ciclos pode variar de 36 a 45.

Em nosso estudo, as condições descritas foram satisfatórias. A enzima Taq polimerase utilizada, foi produzida no Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul, sendo o seu gene isolado da bactéria *Thermus aquaticus* e clonado pelo grupo do Dr. Spartaco Astolfi Filho da Universidade de Brasília. Estudos preliminares mostraram a mesma eficiência desta enzima comparada com outras importadas.

Ao combinar dois primers espera-se que uma

maior variedade de segmentos seja observada quando comparada com o uso dos primers individualmente (WILLIAMS, 1991). Nos resultados do trabalho supra-mencionado foi observado um menor número de bandas, nas condições experimentais relatadas, mostrando um limite no número total de bandas amplificadas. No presente estudo demonstrou-se que houve o esperado aumento no número de bandas quando os primers 63 e 64 foram combinados (Figura 22) se comparado com o uso deles individualmente (Figuras 14 e 18).

A escolha do coeficiente de associação para cada situação, torna-se criteriosa, uma vez que cada um apresenta maneiras diferenciadas de análise. Dos coeficientes existentes, talvez os dois mais usados sejam o SIMPLE MATCHING que utiliza tanto as concordâncias positivas como as negativas no numerador e o JACCARD que utiliza como numerador somente as concordâncias positivas.

Segundo o Dr. Paulo Roberto Cury, da UNESP-Campus de Botucatu (comunicação pessoal), observa-se casos em que os resultados obtidos das análises com mais de um coeficiente de associação, não são coincidentes, tornando a interpretação dos dados mais complexa.

Neste trabalho, observa-se que os resultados obtidos através dos dois coeficientes de associação utilizados foram corroboráveis.

Ao considerar os resultados apresentados pelas três técnicas desenvolvidas, foram formados basicamente cinco grupos. Os agrupamentos feitos entre as linhagens foram semelhantes nas três técnicas utilizadas.

A linhagem M apresentou o comportamento mais diferenciado, assemelhando-se a V pelo sistema de esterases e a EQ2 e TIV pela RFLP, todas identificadas como *T. pseudokoningii*. Pela RAPD, ela se assemelha a Fc59, Fc35, TW6 e R, identificadas como *T. viride*, *T. koningii*, e *T. reesei* respectivamente. Como esta linhagem foi isolada em Belém-PA, região geográfica bastante diferente das outras linhagens do estudo, a divergência encontrada no presente estudo pode estar relacionada a pressões seletivas diferentes que esta linhagem tenha sofrido, originando assim a variabilidade observada.

Os grupos que envolvem as linhagens EQ2 e TIV, identificadas como *T. pseudokoningii*; e Tal1 e T2B, identificadas como *T. viride*, todas da mesma região, foram formados pelas técnicas analisadas, mostrando assim as suas semelhanças.

Os grupos das linhagens EST3, T21P e TISE; e V e T10P, identificadas como *T. pseudokoningii* e de localizações diferentes, apresentam semelhanças em todas as análises. Há também uma certa semelhança entre estes grupos. A linhagem T10P, da região de Recife-PE, pela análise de esterases se diferencia claramente de todas as linhagens analisadas. Na análise por RAPD apresenta-se semelhante a linhagem V e faz parte de um grupo maior envolvendo as linhagens EST3, T21P e TISE na análise por RFLP.

A linhagem Fc35, embora tenha se apresentado de maneira diferenciada na análise do padrão de esterases, pela análise de RAPD usando o primer ô4, assemelha-se à linhagem M. Pelas análises de RFLP e RAPD usando o primer ô3, ela faz parte do grupo das linhagens Fc59, TW6 e R. Este

grupo maior envolve linhagens identificadas em três espécies: *T. viride*, *T. koningii* e *T. reesei*, demonstrando semelhança interespecífica.

As linhagens TAL1, T2B, Fc59 e Fc35, identificadas como *T. viride*, foram separadas pelas análises das técnicas empregadas, demonstrando assim a divergência intraespecífica, que pode estar relacionada com as diferenças geográficas, pois a TAL1 e T2B são da região de Mogi das Cruzes-SP e Fc59 e Fc35 são da região de Piracicaba-SP.

Cabe aqui enfatizar que estas técnicas muito contribuem para resolver problemas taxonômicos encontrados nos seres vivos, entre outras aplicações já mencionadas. São técnicas com princípios diferentes e limitações próprias, que devem ser levadas em consideração ao se fazer o estudo.

A eletroforese de isoenzimas, por ser uma técnica simples, cujos resultados refletem a atividade gênica, é de grande valia para estudos genéticos, populacionais, taxonômicos e evolucionários dos seres vivos. O uso de marcadores morfológicos junto com isoenzimas, possibilitou um grande avanço na construção de mapas genéticos em muitos organismos. As proteínas são detectadas eletroforéticamente e a variação alélica depende da substituição de aminoácidos, o que nem sempre altera sua mobilidade eletroforética. A variação na sequência codificadora de DNA acarretando em substituição de aminoácidos neutros ou então, substituição de nucleotídeos na terceira base de um códon, resulta em mutações silenciosas que, apesar de não alterarem o produto protéico final, causam mudanças nos sítios de restrição de endonucleases. O mesmo é válido para sequên-

cias não codificadoras como os introns e as sequências flanqueadoras.

As técnicas moleculares, vêm se posicionando por serem capazes de revelar mais diferenças entre os indivíduos do que as técnicas que envolvem caracteres morfológicos e de isoenzimas, uma vez que detectam diferenças na própria molécula responsável pela hereditariedade. As vantagens são o número bem maior de marcadores, se considerarmos a dimensão do DNA e a detecção de variação em regiões não transcritas.

As vantagens da técnica do RAPD, comparado as isoenzimas e RFLP, é o processo rápido, fácil e semi-automatizado (FAIRBANKS et al., 1991). Com relação a RFLP, a análise por RAPD necessita de uma quantidade bem menor de DNA, possibilitando a avaliação nos primeiros estágios de vida do organismo. Segundo WELSH et al. (1991b), na análise por RAPD necessita-se de duzentas a mil vezes menos DNA do que por RFLP. Isto é particularmente importante para o uso de marcadores genéticos no processo de seleção de indivíduos. Quanto mais cedo for feita a seleção, menor será o desperdício de tempo e recursos com materiais não promissores. Uma segunda vantagem sobre a RFLP é na análise dos resultados que são feitos diretamente no gel de agarose ou poliacrilamida, enquanto que na RFLP, é necessário que o resultado da hibridização presente num suporte sólido seja exposto a um filme de raio X.

Em princípio, marcadores morfológicos e isoenzimáticos são tão úteis quanto os marcadores de DNA. No entanto na prática, um número maior de marcadores de DNA podem ser encontrados. Não se pode dizer que os marcadores

de DNA substituem as isoenzimas, primeiro porque o uso destas já está estabelecido e tem proporcionado relações importantes com caracteres e populações. Segundo porque trabalhar com isoenzimas é mais barato, uma vez que a técnica exige menos recursos. No entanto, com o rápido aprimoramento das técnicas para o preparo do DNA e hibridização, bem como a reutilização de materiais, acredita-se que o custo das análises por DNA irão decrescer, tornando-se rotineiras. Assim, a maior vantagem dos marcadores moleculares, ou seja, a quantidade ilimitada de marcadores poderá ser melhor explorada.

5. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos no presente trabalho permite concluir que:

As técnicas de isoenzimas, RFLP e RAPD são eficientes para estudar a variabilidade entre linhagens de *Trichoderma* e podem ser utilizadas como técnicas complementares na identificação e classificação de espécies desse gênero. Dessas técnicas a RAPD se mostrou mais eficaz devido a maior facilidade de desenvolvimento, rapidez na obtenção dos resultados e uma maior variedade de bandas a serem analisadas.

As 14 linhagens avaliadas podem ser separadas em cinco grupos que foram semelhantes nas três técnicas empregadas. Diferenciações entre linhagens da mesma espécie mas de locais diferentes puderam ser estabelecidas, mostrando divergências intraespecíficas que podem estar relacionadas com diferenças geográficas.

O agrupamento de linhagens segundo taxonomia numérica, usando os coeficientes JACCARD e SIMPLE MATCHING e o algoritmo de agrupamento UPGMA empregados para análise são eficientes para agrupar linhagens de *Trichoderma*. Os resultados dos dois coeficientes foram corroboráveis, mostrando a eficiência desta análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON. P. A. & PRYOR A. J. DNA restriction fragment length polymorphisms in the wheat stem rust fungus. *Puccinia graminis tritici*. Theoretical Applied Genetics. Berlin. 83: 715-19. 1992.
- AZEVEDO. J. L. & COSTA. S. O. P. Exercícios práticos de genética. São Paulo. Ed. Nacional. EDUSP. 1973. 286 p.
- AZEVEDO. J. L. & BALL. C. Melhoramento genético de microrganismos. In: Azevedo. J. L.. coord. *Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética*. Piracicaba. FEALQ. 1985. cap. 1.9. p. 77-81.
- BECKMANN. J. S. & SOLLER. M. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. Theoretical Applied Genetics. Berlin. 67: 36-43. 1983.
- BORGES. M. I. : AZEVEDO. M. O. : BONATELLI. JR. . R. : FELIPE. M. S. S. : ASTOLFI FILHO. S. A practical method for the preparation of total DNA from filamentous fungi. *Fungal Genetics Newsletter*. Kansas City. 37: 10. 1990.
- BRAITHWAITE. K. S. : IRWIN. J. A. G. : MANNERS. J. M. Restriction fragment length polymorphisms in *Colletotrichum*

gloeosporioides infecting *Stylosanthes* spp. in Australia. *Mycol. Res.* 94: 1129-37, 1990.

BURDON, J. J. & MARSHALL, D. R. The use of isozymes in plant disease research. In: Tanksley, S. D. & Orton, T. J. *Isozymes in plant genetics and breeding*. Amsterdam, 1983. p.401-12.

CARLSON, J. E.; TULSIERAM, L. K.; GLAUBITZ, J. C.; LUK, V. W. K.; KAUFFELDT, C.; RUTLEDGE, R. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theoretical and Applied Genetics*. Berlin. 83: 194-200. 1991.

CASTLE, A. J.; HORGAN, P. A.; ANDERSON, J. B. Restriction fragment length polymorphisms in the mushrooms *Agaricus brunnescens* and *Agaricus bitorquis*. *Applied Environmental Microbiology*. Baltimore. 53: 816-22. 1987.

FAIRBANKS, D. J.; ANDERSEN, W. R.; MAUGHAN, P. J. RAPD analysis for biological resource characterization: a laboratory manual..1991. 29p.

FORSTER, H.; OUDEMANS, P.; COFFEY, M. D. Mitochondrial and nuclear DNA diversity within six species of *Phytophthora*. *Experimental Mycology*. San Diego. 14: 18-31. 1990.

GARDES, M.; FORTIN, J. A.; MUELLER, G. H.; KROPP, B. R.

Restriction fragment length polymorphisms in the nuclear ribosomal DNA of four *Laccaria* spp.: *L. bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima*, and *L. amethystina*. *Phytopathology*, Lancaster, 80: 1312-17, 1990.

GOLDMAN, G. H. & AZEVEDO, J. L. Melhoramento genético de microrganismos produtores de celulase. *Ciência e Cultura* São Paulo, 41: 229-40. mar., 1989.

HAJEK, A. N.; HUMBER, R. A.; ELKINTON, J. S.; MAY, B.; WALSH, S. R. A.; SILVER, J. C. Allozyme and restriction fragment length polymorphisms analyses confirm *Entomophaga maimaiga* responsible for 1989 epizootics in north american gypsy moth populations. *Population Biology*, 87: 6979-82, 1990.

HALL, R. Electrophoretic protein profiles as criteria in the taxonomy of fungi and algae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 100: 253-9, 1974.

HAWKSWORTH, D. L. Fungi in culture. *Nature*, 310: 18, 1984.

HELENTJARIS, T. A genetic linkage map for maize based on RFLPs. *Trends in Genetics*, Cambridge, 3: 217-21, 1987.

HULBERT, S. H. & MICHELMORE, R. W. DNA restriction fragment length polymorphism and somatic variation in lettuce

ce downy mildew fungus, *Bremia lactucae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, St. Paul, 1: 17-24, 1988.

JABAJI-HARE, S. H.; MELLER, Y.; CHAREST, P. M. Investigation of genetic relatedness among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* using cloned DNA probes. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Guelph, 12: 393-404, 1990.

KIM, D. H.; MARTYN, R. D.; MAGILL, C. W. Restriction fragment length polymorphism group and physical map of mitochondrial DNA from *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Phytopathology*, Lancaster, 82: 346-53, 1992.

KOHN, L. M.; PETSCHKE, D. M.; BAILEY, S. R.; NOVAK, L. A.; ANDERSON, J. B. Restriction fragment length polymorphisms in nuclear and mitochondrial DNA of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, Lancaster, 78: 1047-51, 1988.

MANICON, B. Q.; BAR-JOSEPH, M.; ROSNER, A.; VIGODSKY-HAAS, H.; KOTZE, J. M. Potential applications of random DNA probes and restriction fragment length polymorphisms in the taxonomy of the Fusaria. *Phytopathology*, Lancaster, 77: 669-72, 1987.

MCCOUCH, S. R.; KOCHERT, G.; YU, Z. H.; WANG, Z. Y.; KHUSH, G. S.; COFFMAN, W. R.; TANSLEY, S. D. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 76: 815-29, 1988.

- MICHELMOORE, R. W. & HULBERT, S. H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Annual Review Phytopathology*, Palo alto, 25: 383-404, 1987.
- MOODY, S. F. & TYLER, B. M. Use of nuclear DNA restriction fragment length polymorphisms to analyse the diversity of the *Aspergillus flavus* group: *A. flavus*, *A. parasiticus*, and *A. nomius*. *Applied Environmental Microbiology* Baltimore, 56: 2453-60, 1990.
- NEVALAINEN, H. Genetic improvement of enzyme production in industrially important fungal strains. Helsinki, 1985. 243p. (Doutoramento - University of Helsinki).
- ORBACH, M. J., PORRO, E. B. & YANOFSKY, C. Cloning and characterization of the gene for β -tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. *Molecular and Cellular Biology*, 6: 2452-61, 1986.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L.; ALFENAS, A.C. Manual de técnicas eletroforéticas em microrganismos. Piracicaba, FEALQ, 1988. 54p.
- PARK, W. M., PARK, Y. H., LEE, E. Y. Application of electrophoretic methods for differentiation of *Trichoderma* species. *Korean Journal of Plant Protection*, 23: 102-8, 1984.

RAEDER, U.; THOMPSON, W.; BRODA, P. RFLP-based genetic map of *Phanerochaete chrysosporium* ME446: lignin peroxidase genes occur in clusters. *Molecular Microbiology*, Oxford, 3: 911-18, 1989.

RIEDY, M. F., HAMILTON III, W. J., AQUADRO, C. F. Excess of non-parental bands in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD PCR. *Nucleic Acids Research*, Oxford, 20: 918, 1992.

RIFAI, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, Oxon, 116: 1-56, Jan. 1969.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York, Exeter Publishing, 1988.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning - a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1989.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal Molecular Biology*, London, 98: 503-17, 1975.

STASZ, T. E., WEEDEN, N. F., HARMAN, G. E. Methods of isozyme electrophoresis for *Trichoderma* and *Gliocladium* species. *Mycologia*, Bronx, 80: 870-74, 1988.

- TZENG, T.; LYNHOLM, L. K.; FORD, C. L.; BRONSON, C. R. A restriction fragment length polymorphisms map and electrophoretic kariotype of the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. *Genetics*, Princeton, 130: 81-96, 1992.
- VILGALYS, R. & GONZALEZ, D. Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms in *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, Lancaster, 80: 151-58, 1990.
- WELSH, J. & McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrarily primers. *Nucleic Acids Research*, Oxford 18: 7213-18, 1990.
- WELSH, J. & McCLELLAND, M. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, 19: 5275-79, 1991.
- WELSH, J.; PETERSEN, C.; McCLELLAND, M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Research*, Oxford, 19: 303-6, 1991a.
- WELSH, J.; HONEYCUTT, R. J.; McCLELLAND, M.; SOBRAL, B. W. S. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 82: 473-76,

1991b.

WHITE. T. J.: ARNHEIM. N.: ERLICH. H. A. The polymerase chain reaction. *Trends in Genetics*. Cambridge. 5: 185-89. 1989.

WILDE. J.: WAUGH. R.: POWELL. W. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics*. Berlin. 83: 871- 7. 1992.

WILLIAMS. J. G. K.: KUBELIK. A. R.: LIVAK. K. J.: RAFALSKI. J. A.: TINGEY. S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. Oxford. 18: 6531-5. 1990.

WILLIAMS. J. G. K.: KUBELIK. A. R.: RAFALSKI. J. A.: TINGEY. S. V. Genetic analysis with RAPD markers. In: Bennett. J. W. & Lasure. L. L. *More Gene Manipulations in Fungi*. New York. 1991. Appendix A. p. 431-39.

ZAMIR. D. & CHEI. I. Application of enzyme electrophoresis for the identification of isolates in *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*. 31: 578-80. 1985.