CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA POR RAPD DE RECOMBINANTES EM *Trichoderma pseudokoningii*

IARA FINO SILVA

Bióloga

Orientador: Prof.^ª Dr.^ª ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

abril de 1996

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Silva, Iara Fino

Caracterização genética por RAPD de recombinantes em *Trichoderma pseudokoningii* /Iara Fino Silva. - - Piracicaba, 1996.

108p. : il.

Tese doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1996.
Bibliografia.

1. DNA recombinante 2. Fungo imperfeito - Marcador molecular 3. Fusão de protoplasto I. Título

CDD 589.24

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA POR RAPD DE RECOMBINANTES EM *Trichoderma pseudokoningii*

IARA FINO SILVA

Aprovada em 03 de maio de 1996

Comissão julgadora:

1. Prof ^ª . Dr ^ª . Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner	ESALQ/USP
2. Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo	ESALQ/USP
3. Prof ^ª . Dr ^ª . Maria Helena Pelegrinelli Fungaro	UEL
4. Prof ^ª . Dr ^ª . Marisa Viera de Queiroz	UFV
5. Prof. Dr. Eduardo Bagagli	UNESP/Botucatu

Prof^ª. Dr^ª. ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

Orientador

AGRADECIMENTOS

A autora agradece a todas as pessoas que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho, em especial

às Professoras Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner e Maria Helena Pelegrinelli

Fungaro pela orientação e incentivo,

aos amigos do Departamento de Genética, em especial à Tamara, Sílvia e Inês por

terem me acolhido nos momentos difíceis,

aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos pela convivência e amizade,

aos meus pais e irmãos, pelo apoio que sempre me deram,

ao Quirijn, que muito me incentivou e auxiliou na elaboração desta tese,

à Máira e Matias, que vieram dar alegria a essa época da minha vida.

Agradece também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa de estudos concedida, e ao PADCT II / CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro à pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 O Gênero <i>Trichoderma</i>	3
2.2 O fungo <i>Trichoderma pseudokoningii</i>	4
2.3 O ciclo parassexual	6
2.4 Parameiose	11
2.5 RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao acaso).....	15
2.5.1 O RAPD em fungos filamentosos	19
2.5.2 O RAPD em <i>Trichoderma</i>	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1.1 Linhagens de <i>Trichoderma pseudokoningii</i> var. <i>rifai</i>	28
3.2 Meios de Cultura e Soluções Utilizadas	29
3.2.1 Meio Mínimo	29
3.2.2 Meio Completo.....	29
3.2.3 Meio Mínimo Líquido	30
3.2.4 Meio Completo Líquido.....	30
3.2.5 Meio Completo 2 x concentrado	30

3.2.6 Meio Mínimo mais 4% de Meio Completo	30
3.2.7 Solução de vitaminas	30
3.2.8 Solução de Ácido Nucleico de Leveduras	31
3.2.9 Solução de Caseína Hidrolisada	31
3.2.10 Suplementos Adicionados ao Meio Mínimo	31
3.2.11 Solução Salina	31
3.2.12 Solução de “Tween-80”	32
3.2.13 Solução de Desoxicolato de Sódio	32
3.2.14 Adesivo de Haupts.....	32
3.2.15 Solução de Giemsa	32
3.2.16 Solução de HCl.....	32
3.2.17 Tampão Fosfato 0,125 M pH 7,0.	33
3.2.18 Tampão Fosfato 0,02 M pH 5,8	33
3.2.19 Tampão Fosfato pH 7,0	33
3.2.20 Tampão Mc Ilvaine's pH 5,8	34
3.2.21 Solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,2 M.....	34
3.2.22 Solução de enzimas para Produção de Protoplastos	34
3.2.23 Solução de Polietilenoglicol 6000 (PEG).....	34
3.2.24 Tampão de extração.....	35
3.2.25 SDS (20%).....	36
3.2.26 Acetato de potássio 5 M.....	37
3.2.27 TE pH 8,0	37
3.2.28 Tampão de amplificação 10x.....	37
3.2.29 Primers	37
3.2.30 MgCl_2 6,25 mM.....	37
3.2.31 Taq polimerase	38
3.2.32 dNTPs	38
3.2.33 Tris-Borato-EDTA 10x	38
3.2.34 Solução corante para eletroforese	38
3.2.35 Brometo de etídio	39
3.2.36 Gel de agarose 1,4%.....	39
3.3 Determinação da redução de colônia.....	39
3.4 Verificação do número de núcleos por conídios	39
3.5 Sobrevivência a luz ultravioleta.....	40

3.6 Obtenção de mutantes morfológicos e auxotróficos.....	40
3.7 Teste de reversão.....	41
3.8 Obtenção de protoplastos	42
3.9 Fusão de protoplastos.....	43
3.10 Obtenção de heterocários.....	43
3.11 Extração do DNA.....	44
3.12 Quantificação do DNA	45
3.13 Amplificação do DNA	45
3.14 Eletroforese.....	46
3.15 Análise da eletroforese.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Determinação de redução de colônia.....	48
4.2 Teste com desoxicolato de sódio em diferentes pHs	50
4.3 Verificação do número de núcleos por conídio	52
4.4 Sobrevivência a luz ultravioleta.....	53
4.5 Obtenção de mutantes morfológicos e auxotróficos.....	54
4.6 Teste de reversão.....	57
4.7 Técnicas genéticas para obtenção de heterocários	57
4.8 Protoplastos de <i>T. pseudokoningii</i> Est-3	58
4.8.1 Obtenção e regeneração de protoplastos	58
4.8.2 Fusão de protoplastos.....	59
4.9 Análise dos recombinantes por RAPD.....	62
5. CONCLUSÕES.....	97
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidades de reagentes para cada amostra de DNA para reações de 25 µl, para reação de RAPD.	46
Tabela 2 - Sequência de temperaturas utilizadas no termo-ciclador, para amplificação de DNA por RAPD.	46
Tabela 3 - Diâmetro das colônias (mm) da linhagem Est-3 com adição de desoxicolato de sódio ao meio completo, após diferentes intervalos de tempo de crescimento a 28°C.....	50
Tabela 4 - Diâmetro das colônias (mm) da linhagem M com adição de desoxicolato de sódio ao meio completo, após diferentes intervalos de tempo de crescimento a 28°C.....	50
Tabela 5 - Diâmetro e esporulação das colônias da linhagem Est-3 em 4 diferentes pHs com adição de desoxicolato de sódio ao meio completo, após diferentes intervalos de tempo de crescimento a 28°C.	51
Tabela 6 - Diâmetro e esporulação das colônias da linhagem M em 4 diferentes pHs com adição de desoxicolato de sódio, ao meio completo, após diferentes intervalos de tempo de crescimento a 28°C.	52
Tabela 7 - Mutantes auxotróficos simples de <i>T. pseudokoningii</i> Est-3 obtidos com luz ultravioleta pelo método do isolamento total.	55
Tabela 8 - Mutantes auxotróficos duplos de <i>T. pseudokoningii</i> Est-3 obtidos com luz ultravioleta pelo método do isolamento total.	55

Tabela 9 - Média da contagem de colônias obtidas por placa de <i>brw ade arg</i> + <i>whi4 leu bio</i> , via fusão de protoplastos em diferentes meios seletivos.....	59
Tabela 10 - Números e frequências de produtos recombinantes e parentais em 500 colônias analisadas quanto às marcas, obtidos no cruzamento <i>whi4 leu bio</i> + <i>brw ade arg</i> via fusão de protoplastos.....	60
Tabela 11 - Média da contagem de colônias obtidas por placa de <i>brw ade leu</i> + T35 <i>g nic met inos arg</i> , via fusão de protoplastos em diferentes meios seletivos.....	60
Tabela 12 - Números e frequências de produtos recombinantes e parentais em 500 colônias analisadas quanto às marcas, obtidos no cruzamento <i>brw ade leu</i> + T35 <i>g nic met inos arg</i> via fusão de protoplastos.....	61
Tabela 13 - Sequência e massa molecular dos primers, utilizados para amplificar DNA das linhagens parentais e recombinantes por RAPD.....	62
Tabela 14 - Valores de α e β (equação 1), bem como os coeficientes de determinação das regressões (r^2) para as eletroforeses realizadas.....	64
Tabela 15 - Número de pares de bases dos fragmentos gerados pelo RAPD nos dois parentais (p) dos cruzamentos 1 e 2 com os diferentes primers.....	65
Tabela 16 - Erro no cálculo do número de pares de bases ao se errar 1 mm na leitura da posição da banda, calculado pela equação (3) para alguns valores de n , considerando $\beta = 0,01 \text{ cm}^{-1}$	66

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Coloração dos núcleos de conídios de *T. pseudokoningii* Est-3, pelo método de Giemsa. Aumento = 1500x.53
- Figura 2 - Esquema de obtenção dos mutantes simples e duplos auxotróficos de *Trichoderma pseudokoningii* da linhagem Est-3 por isolamento total.56
- Figura 3 - Linhagens selvagens Est-3 e M, e respectivos mutantes utilizados nos cruzamentos via fusão de protoplastos.61
- Figura 4 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₂ dos parentais *brw ade arg + whi4 leu bio* (cruzamento 1) e seus segregantes *brw ade* e *whi leu*.67
- Figura 5 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₃ dos parentais *brw ade arg + whi4 leu bio* (cruzamento 1) e seus segregantes *brw ade* e *whi leu*.68
- Figura 6 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₄ dos parentais *brw ade arg + whi4 leu bio* (cruzamento 1) e seus segregantes *brw ade* e *whi leu*.69
- Figura 7 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₇ dos parentais *brw ade arg + whi4 leu bio* (cruzamento 1) e seus segregantes *brw ade* e *whi leu*.70
- Figura 8 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₁₈ dos parentais *brw ade arg + whi4 leu bio* (cruzamento 1) e seus segregantes *brw ade* e *whi leu*.71
- Figura 9 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₁₉ dos parentais *brw ade arg + whi4 leu bio* (cruzamento 1) e seus segregantes *brw ade* e *whi leu*.72

- Figura 10 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₂₀ dos parentais *brw ade arg* + *whi4 leu bio* (cruzamento 1) e seus segregantes *brw ade* e *whi leu*. 73
- Figura 11 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₂ dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*. 77
- Figura 12 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₃ dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*. 78
- Figura 13 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₄ dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*. 79
- Figura 14 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₇ dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*. 80
- Figura 15 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₁₄ dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*. 81
- Figura 16 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₁₅ dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*. 82
- Figura 17 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₁₇ dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*. 83
- Figura 18 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₁₈ dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*. 84

Figura 19 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₁₉ dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*.....85

Figura 20 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₂₀ dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*.....86

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA POR RAPD DE RECOMBINANTES EM *Trichoderma pseudokoningii*

Autor: IARA FINO SILVA

Orientador: Prof.^a Dr.^a ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

RESUMO

No presente trabalho foram realizados estudos genéticos no fungo *Trichoderma pseudokoningii*, utilizando-se duas linhagens contrastantes e isoladas independentemente, a Est-3 e a M. Na Est-3 foram obtidos cinco mutantes auxotróficos simples e quatro mutantes com dupla deficiência, empregando-se para tal, luz ultravioleta. A taxa de mutação foi baixa (0,001%), sugerindo ser essa linhagem muito resistente a irradiação ultravioleta, ou possuir um sistema de reparo muito eficiente.

Dois mutantes auxotróficos duplos, originados da Est-3, foram utilizados nos experimentos de fusão de protoplastos com dois mutantes auxotróficos da linhagem M, sendo um deles duplo e o outro com quatro marcadores. Colônias recombinantes foram recuperadas diretamente de produtos de fusão, em uma baixa frequência (1%), indicando reduzida frequência de recombinação na parameiose entre as duas linhagens.

Os mutantes parentais e seus recombinantes foram analisados pelo RAPD com utilização de dez primers decâmeros arbitrários. Os padrões dos parentais foram distintos com todos os dez primers, sugerindo uma divergência genética entre as duas linhagens utilizadas. A maioria (70,2%) dos padrões dos recombinantes foi similar aos padrões daquele parental ao qual ele mais se assemelhava morfológica e auxotroficamente. Estes resultados sugerem a ocorrência de um fenômeno semelhante a transformação na parameiose.

GENETIC CHARACTERIZATION BY RAPD OF *Trichoderma pseudokoningii* RECOMBINANTS

Author: IARA FINO SILVA

Adviser: Prof. Dr. ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

SUMMARY

For the present thesis genetic studies were carried out on the fungus *Trichoderma pseudokoningii*, using two independently isolated and contrasting strains, Est-3 and M. In Est-3 five single auxotrophic mutants and four mutants with double deficiency were obtained with the use of ultraviolet light. The mutation rate was low (0.001%), suggesting that Est-3 is very resistant to ultraviolet irradiation, or may have a very efficient repair system.

Two double auxotrophic mutants from Est-3 were used for protoplast fusion together with two auxotrophic mutants from the M strain, a double and a quadruple one. Recombinant colonies were obtained directly from the fusion products, however, at a low frequency (1%), indicating a reduced recombination frequency in the parameiosis between these two strains.

The parental mutants and their recombinants were analyzed by RAPD, using ten primers. The parental patterns were different for all primers, suggesting a divergence between the two used strains. The majority of recombinant patterns (70.2%) was equal to the patterns of the parental to which it was more similar in morphological and auxotrophic terms. These results suggest that a phenomenon similar to transformation takes place in parameiosis.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Trichoderma* pertence à Subdivisão Deuteromycotina, dentro da qual existem muitas espécies que são bastante distintas do ponto de vista genético. Esta variabilidade deve estar relacionada com os processos de reprodução parassexual. O ciclo parassexual em fungos filamentosos foi descrito como uma alternativa do ciclo sexual, sendo um processo onde ocorre recombinação, mas de modos distintos daqueles do ciclo sexual padrão. Segundo alguns autores, este ciclo se constitui em um instrumento útil adicional para a análise genética de espécies sexuadas. Para fungos imperfeitos (que incluem espécies fitopatogênicas e de uso na indústria) ele oferece a única maneira para uma análise genética e para a efetivação de cruzamentos planejados. No gênero *Trichoderma* foi descrito o ciclo parassexual, embora os fenômenos nele envolvidos ainda não estejam muito claros. Um outro fenômeno designado parameiose também foi detectado no gênero *Trichoderma*, este é um fenômeno de instabilidade dos núcleos diplóides heterozigóticos, os quais apresentam uma alta taxa de recombinação e haploidização nas hifas heterocarióticas, guardando semelhanças com o processo meiótico.

A parameiose pode ser melhor caracterizada via análise por marcadores moleculares. Entre esses, o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) pode ser empregado como técnica alternativa rápida e eficiente para identificar o grau de similaridade genética entre linhagens parentais e seus segregantes. Esta técnica está

baseada na amplificação de fragmentos de DNA usando “primers” de seqüências arbitrárias. A amplificação RAPD está baseada na capacidade de um único primer de DNA, composto de 9-10 nucleotídios, para determinar a amplificação de vários fragmentos de DNA de uma fonte genômica de DNA. Os polimorfismos são reconhecidos como a presença de um fragmento específico de DNA amplificado em uma linhagem comparado a ausência daquele mesmo fragmento em uma outra linhagem.

Dentro deste contexto , o presente trabalho foi desenvolvido objetivando estudar os fenômenos envolvidos na recombinação parassexual de *Trichoderma pseudokoningii* var. Rifai, utilizando RAPD. Duas possibilidades são discutidas com relação a esse fenômeno: fusão dos núcleos parentais, e uma perda gradual dos cromossomos, dando origem a segregantes com cromossomos originados de ambos os parentais em diferentes combinações; ou que só parte do material genético passe de um parental para o outro, em processo semelhante ao da transformação genética, onde os descendentes teriam um conjunto cromossômico de um parental com apenas fragmentos de DNA, inseridos por recombinação, do outro parental.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* foi inicialmente descrito por Persoon (1794, apud BISSET, 1991) para quatro fungos macroscopicamente similares. As quatro espécies originalmente descritas em *Trichoderma*, a saber *T. aureum*, *T. nigrescens*, *T. roseum* e *T. viride*, cada uma com diferente coloração de conídios, agora são consideradas como não relacionadas umas com as outras, e o nome tornou-se aplicado a formas verdes ubíquitas tipificadas por *T. viride*. Rifai (1969) forneceu o delineamento genérico de *Trichoderma*, baseado em caracteres microscópicos, que é geralmente aceito hoje. O conidióforo em *Trichoderma* é repetidamente ramificado, usualmente de um modo regular, dendrítico, isto é, ramificado a um número indefinido de níveis, com a ramificação primária produzindo pequenas ramificações secundárias que também podem ramificar, e assim por diante. Com a primeira ramificação longa formada, sucessivas ramificações a níveis mais altos apicalmente e distalmente progressivamente menores, e ramificações e fiálides a todos os níveis divergentes são formadas. As fiálides são ampuliformes a saculiformes, usualmente com constrição na base, mais ou menos inchada próxima ao meio, e abruptamente atenuada próxima ao ápice em um pescoço curto subcilindrico. As fiálides são dispostas em verticilos terminalmente sobre ramificações dos conidióforos, ou menos freqüentemente únicas ou em verticilos diretamente sob o

septo ao longo do conidióforo e suas ramificações. Isolados de *Trichoderma* freqüentemente podem ser reconhecidos por caracteres macroscópicos, que incluem crescimento rápido em cultura, um micélio aéreo esparso, e produção de distintivas pústulas conidiogênicas brancas ou verdes (BISSET, 1991).

O gênero *Trichoderma* foi revisado por RIFAI em 1969 e por BISSET em 1991, e os isolados foram agrupados em 9 espécies, diferenciadas primariamente pelo modo de ramificação do conidióforo e morfologia dos conídios. Esta classificação com base nestas características não tem sido satisfatória. Recentemente outros métodos tem sido empregados, como de técnicas sorológicas (BARAK & CHET, 1988) e eletroforese de aloenzimas (STASZ et al., 1988b, 1989b).

Os teleomorfos conhecidos para *Trichoderma* estão no gênero *Hypocrea*. Há mais de 60 espécies de *Hypocrea* que foram observadas na literatura como teleomorfos de *Trichoderma* (BISSET, 1991)

2.2 O fungo *Trichoderma pseudokoningii*

T. pseudokoningii é um fungo que apresenta micélio translúcido e esparso, com pouco crescimento aéreo, composto de hifas ramificadas, septadas, com parede lisa e sem cor. Os conidióforos são em tufo tornando-se pulverulentos na maturidade. Os primeiros conidióforos formam zonação, os quais tornam-se indistintos posteriormente. Os conídios são produzidos isoladamente e sucessivamente, na extremidade de cada fiálide, apresentando-se subcilíndricos ou oblongos e algumas vezes elipsóides. Quanto à coloração, mudam de branco a branco-esverdeado e verde (RIFAI, 1969; BISSET, 1991). Seus conídios são uninucleados, embora binucleados também ocorram principalmente em colônias selecionadas de heterocários (FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER, 1992).

SANTOS (1992) fez um estudo da variabilidade genética em *Trichoderma* utilizando eletroforese de isoenzimas, RFLP e RAPD. Segundo a autora, as três técnicas apresentaram resultados satisfatórios para análise de polimorfismo e podem ser utilizadas como técnicas complementares na identificação e classificação de espécies desse gênero.

Por serem fungos saprofíticos do solo as espécies de *Trichoderma* utilizam uma grande variedade de fontes de carbono e nitrogênio (DANIELSON & DAVEY, 1973). *T. pseudokoningii* pode degradar a celulose, apresenta um crescimento rápido com uma temperatura ótima em torno de 28 °C (BISSET, 1984) e também apresenta ótimo desenvolvimento em meio mínimo e completo utilizado para *Aspergillus nidulans*.

A maioria das espécies de *Trichoderma* é fotossensível em relação à esporulação, de forma que certos comprimentos de luz são bastante efetivos em induzir a esporulação (MILLER & REID, 1961; GRESSEL & HARTMANN, 1968; BETINA & SPISIAKOVA, 1976). Um aspecto importante da esporulação, embora muito pouco estudado, é a capacidade de produção de clamidiósporos, já demonstrado em várias espécies de *Trichoderma* (LEWIS & PAPAIVIZAS, 1983; 1984), e também relatado em *T. pseudokoningii* (BISSET, 1984).

A fase perfeita (teleomórfica) de algumas espécies de *Trichoderma* permite classificá-las como pertencentes ao gênero *Hypocrea*, família *Hypocreaceae* (DOY, 1967). *T. pseudokoningii* pode representar a forma imperfeita (anamórfica) da espécie *Hypocrea schweinitzii* (RIFAI, 1969) ou mesmo outra espécie do gênero *Hypocrea* (BISSET, 1984).

As várias espécies do gênero *Trichoderma* têm recebido especial atenção nos últimos tempos, pois atuam em processos de hiperparasitismo de patógenos de raízes de plantas, parasitismo de insetos, bem como são bons produtores de exoenzimas (BISSET, 1984; PAPAIVIZAS, 1985; CARVALHO, 1989). Isolados de *T. pseudokoningii* se

destacam principalmente pela sua produção de celulasas (BISSET, 1984; BERTOLIN, 1987; VICENTE, 1989), mas também pela capacidade de controlar fitopatógenos (MELO & HEALE, 1989).

2.3 O ciclo parassexual

Com a descoberta do ciclo parassexual em fungos por PONTECORVO & ROPER em 1952, a genética de fungos entrou em uma nova fase, principalmente para os fungos imperfeitos que, por não apresentarem um mecanismo conhecido de recombinação genética pelo ciclo sexual, não possibilitavam seus estudos genéticos (SILVEIRA, 1983).

O ciclo parassexual, segundo PONTECORVO (1956) se caracteriza por apresentar anastomose de hifas com núcleos diferentes (heterocariose), fusão de núcleos haplóides, permuta mitótica e haploidização. Além de ser um sistema que favorece aos estudos de ordem genética, possibilitando o mapeamento de grupos de ligação, o ciclo parassexual oferece ainda a possibilidade de amplificação de variabilidade para os fungos que não apresentam ciclo sexual. Com relação ao mapeamento de genes, FORBES (1959) obteve uma linhagem de *Aspergillus nidulans* contendo marcadores em todos os oito grupos de ligação. Desta maneira, tendo-se uma linhagem mutante com um gene a ser localizado em um grupo de ligação, basta que se proceda uma análise pelo ciclo parassexual e, com a haploidização, este gene será mapeado juntamente com alguns marcadores da linhagem mestre (McCULLY & FORBES, 1965). Em *A. nidulans*, KÄFER (1958), usando esta técnica de mapeamento, localizou cerca de 40 genes nos 8 grupos de ligação, sendo que a localização destes genes foi confirmada com o uso de análise meiótica.

O ciclo parassexual também tem se mostrado útil nos estudos de dominância e recessividade de genes em um mesmo núcleo, ou em citoplasma comum (ROPER, 1966; AZEVEDO, 1972) e também nos estudos sobre instabilidade mitótica (AZEVEDO, 1972; NIFFINEGER E SOUZA, 1979). Do ponto de vista aplicado, o ciclo parassexual possibilitou a recombinação e melhoramento genético em fungos economicamente importantes e que não apresentam ciclo sexual (SERMONTI, 1969; BONATELLI JR., 1981; MESSIAS, 1979) e também permitiu explicar o aparecimento de novas raças fisiológicas em fungos fitopatogênicos (BUXTON, 1956, 1962; AZEVEDO, 1976).

No gênero *Trichoderma*, várias espécies foram estudadas em relação ao ciclo parassexual, empregando principalmente fusão de protoplastos e, em menor grau, anastomose de hifas para a obtenção de heterocários.

Os primeiros trabalhos, realizados em *T. viride* (WEINMAN-GREENSHPAN & GALUM, 1969; GREENSHPAN & GALUM, 1971 e FARGASOVA et al., 1985), evidenciaram a ocorrência de heterocariose, porém, diplóides e recombinantes não foram detectados. TOYAMA et al. (1984) realizaram fusão de protoplastos entre linhagens auxotróficas de *T. reesei* onde obtiveram segregantes não parentais, porém, não esclareceram o tipo de recombinação envolvida. STASZ et al. (1988a) também detectaram, por fusão de protoplastos em *T. harzianum*, segregantes não parentais e “possíveis diplóides” que em um segundo ciclo de crescimento segregavam parentais auxotróficos e raros prototróficos. A progênie não parental, segundo os autores, estaria se originando por cariogamia e recombinação e/ou por fatores citoplasmáticos, ou pela interação núcleo-citoplasma. OGAWA et al. (1987, 1989) por sua vez, afirmaram ter detectado o ciclo parassexual em *T. reesei*, utilizando-se também da fusão de protoplastos para estabelecimento de heterocários, dos quais, após tratamento com

cânfora a 0,1%, obtiveram um diplóide com praticamente o dobro (1,9%) da quantidade de DNA em relação aos núcleos haplóides.

Outro grupo de trabalho, liderado principalmente por Stasz, relata importantes aspectos sobre a parassexualidade de *Trichoderma*. Realizando fusão de protoplastos intra e interlinhagens e espécies (*T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii* e *T. viride*) com diferentes marcas auxotróficas e padrões isoenzimáticos (STASZ et al., 1989a, STASZ & HARMAN, 1990), observaram que: *i)* em cruzamentos intralinhagens a taxa de complementação e obtenção de heterocários era alta, porém, sem ocorrência de diplóides e/ou recombinantes; *ii)* em cruzamentos interlinhagens e interespecíficos a complementação era baixa com forte incompatibilidade pós-fusão, sendo que nos cruzamentos interlinhagens era comum ocorrer prototróficos de crescimento lento, altamente instáveis que geravam setores não parentais, diferentes quanto à morfologia, taxa de crescimento, esporulação e padrão isoenzimático, mas que, quando analisados monosporicamente, não forneciam indícios da ocorrência de diplóides, aneuplóides ou recombinantes haplóides. Estes autores basearam-se principalmente nos dados de isoenzimas, realizando mais de 5000 análises em pelo menos 1000 progênes segregantes, e concluíram que *i)* a parassexualidade não deve ocorrer em *Trichoderma*, ou ocorre muito raramente e/ou rapidamente; *ii)* outros mecanismos devem estar envolvidos no surgimento dos tipos não parentais, sendo que sugeriram a possibilidade de um dos núcleos do heterocário se degradar e seu material genético se incorporar ao núcleo remanescente e, também, o envolvimento de DNA mitocondrial, plasmídios e micovírus nos eventos pós-fusão. Outra observação, também realizada por este grupo (SIVAN et al., 1990), foi a de que em certos heterocários, obtidos pela transferência de núcleos isolados em protoplastos, um dos núcleos se expressa enquanto o outro permanece quiescente e, que esta expressão preferencial muda com o tempo.

Ainda relacionado à parassexualidade de *Trichoderma*, PE'ER & CHET (1990) utilizando linhagens com marcas auxotróficas e morfológicas de *T. harzianum* relataram ter obtido, por fusão de protoplastos, colônias prototróficas as quais foram classificadas como sendo do tipo parental ou recombinante, com base nas suas características de crescimento e esporulação. TOYAMA & TOYAMA (1990), fazendo o tratamento com colchicina reportaram a obtenção de autopoliplóides em *T. reesei*, os quais quando crescidos em meios contendo Benomyl emitiam setores que apresentavam variações com relação à conidiação e capacidade em degradar celulose.

SIVAN & HARMAN (1991) aumentaram a eficiência de colonização da rizosfera em *T. harzianum*, utilizando fusão de protoplastos entre dois mutantes auxotróficos de duas linhagens diferentes. Um dos recombinantes foi mais efetivo que as linhagens parentais em colonizar a rizosfera. Neste caso, a recombinação parassexual gerou variabilidade para o melhoramento de uma linhagem. SANDHU & BAWA (1992) também utilizaram fusão de protoplastos em mutantes auxotróficos de duas linhagens de *T. reesei* QM9414. Alguns segregantes apresentaram produção aumentada de celulase, indicando o uso de fusão de protoplastos no desenvolvimento de estratégias para o melhoramento de linhagens.

MOLNAR et al. (1990) investigaram as interrelações genéticas entre linhagens, raças e formaes especialis de *Fusarium oxysporum*. Os mutantes das linhagens testadas eram incapazes de formar heterocário, isto é, pertenciam a grupos de compatibilidade vegetativa diferentes. Através da fusão de protoplastos foram obtidos híbridos prototróficos em todas as combinações parentais infraespecíficas possíveis. Estes experimentos evidenciam a recombinação parassexual entre linhagens vegetativamente incompatíveis de *F. oxysporum*.

O ciclo parassexual em *Nectria haematococca* (a forma perfeita de *F. solani*) foi estudado, via fusão de protoplastos, por DABBOUSSI & GERLINGER (1992). Protoplastos de linhagens multiauxotróficas de *N. haematococca* foram fusionados e, heterocários de crescimento rápido foram formados a uma alta frequência (cerca de 1%). Coletando-se microconídios uninucleados destes heterocários, foi possível se isolar algumas colônias com novas combinações dos marcadores parentais, evidenciando a recombinação parassexual. A análise genética de híbridos em que seis fatores eram heterozigotos forneceram evidência para eventos de fusão nuclear. Estas colônias híbridas segregaram espontaneamente um grande número de recombinantes haplóides, permitindo a análise de ligação entre os marcadores.

A herança e alteração de DNA transformante durante um ciclo parassexual induzido no fungo imperfeito *Cladosporium fulvum* foram investigadas por ARNAU & OLIVER (1993). Protoplastos de um isolado transformado pAN7-1 de *C. fulvum* raça 4, contendo uma duplicação em tandem do vetor, e de um isolado da raça 5 não transformado foram fusionados, sem seleção para a presença de sequência vetor. Permitiu-se que os produtos de fusão haploidizassem espontaneamente. A herança da sequência pAN7-1 e a expressão do gene *hph* (resistência a higromicina) foram estudadas em 85 progênies. Uma proporção muito alta (80%) das progênies continham a sequência vetor e 70% das progênies eram resistentes a higromicina. A inativação do gene *hph* ocorreu em oito progênies. Rearranjos da sequência vetor podem colaborar para a inativação do gene.

A transmissão e modificação de marcadores de transformação durante um ciclo parassexual induzido em *Penicillium roqueforti* foram investigadas por DURAND et al. (1992). Protoplastos de duas linhagens selvagens de *P. roqueforti* foram transformadas para resistência a higromicina B e fleomicina usando-se genes de

resistência. Protoplastos das linhagens transformadas foram fusionados para produzir híbridos diplóides. Após indução de haploidização, segregantes caracterizados por um rearranjo dos marcadores parentais foram isolados indicando que ocorreu recombinação durante o ciclo parassexual. Experimentos de hibridização “Southern blot” revelaram que a transmissão do fenótipo transformado foi acompanhado por rearranjos extensivos e/ou deleções dependendo do número de cópias de plasmídios integradas. A metilação de resíduos de citosina do DNA integrado também foi detectada. As observações sugerem que as seqüências de DNA estranho transmitidas durante o ciclo parassexual sofreram modificações similares aos rearranjos de caracteres transformados induzidos premeioticamente (RIP = rearrangement induced premeiotically) através de cruzamento sexual.

TAHOUN (1993) e BUENO (1994) utilizaram fusão de protoplastos entre linhagens auxotróficas de *P. chrysogenum* para melhorar a produção de penicilina. Alguns segregantes apresentaram produção de penicilina aumentada em relação às linhagens parentais. Neste caso a recombinação parassexual também gerou variabilidade para propiciar o melhoramento de linhagens.

2.4 Parameiose

A parameiose foi proposta por BONATELLI JR et al. (1983) para explicar um certo tipo de instabilidade dos núcleos diplóides heterozigotos, os quais apresentam recombinação e haploidização nas hifas heterocarióticas, guardando semelhanças com o processo meiótico. Estes autores descreveram o fenômeno através do estudo de cruzamentos pelo ciclo parassexual de linhagens auxotróficas de *Aspergillus niger* utilizadas na produção de ácido cítrico. Utilizando-se da medida dos diâmetros dos conídios e do comportamento das colônias em meio contendo Benlate, observaram que

as colônias obtidas nos heterocários eram dos tipos diplóides heterozigotos para todas as marcas auxotróficas, heterozigotos para apenas algumas marcas, e também recombinantes haplóides. Segundo estes autores, a ocorrência de diplóides instáveis e estáveis em *A. niger*, relatadas por outros autores (LHOAS, 1967; CHANG & TERRY, 1973 e DAS & ILCZUK, 1978), bem como a instabilidade observada em *Penicillium patulum* (CALAM et al., 1973) e a alta instabilidade dos diplóides de *Cephalosporium acremonium* (BALL & HAMLYN, 1982) podem ser interpretadas com base na parameiose.

BALL & HAMLYN (1982) e HAMLYN et al. (1985), estando atentos para a ocorrência de recombinantes no heterocário, utilizaram meios seletivos com diferentes suplementações para detectá-los. Ambos os trabalhos foram realizados por meio de fusão de protoplastos entre linhagens auxotróficas de *Cephalosporium acremonium*, empregando meio mínimo com diferentes suplementações para seleção de produtos de fusão. As colônias regeneradas eram de dois tipos principais: recombinantes haplóides estáveis e aneuplóides ou diplóides heterozigotos instáveis. A maior parte era recombinante haplóide sendo este grau de ploidia sugerido pela análise da estabilidade destas colônias em meios com agentes haploidizantes, com confirmação através da medida de quantidade de DNA. Pela análise genética da frequência destes recombinantes, HAMLYN et al. (1985) obtiveram evidências da existência de 8 grupos de ligação, sendo que detectaram também uma alta taxa de permuta mitótica. A frequência de fusão nuclear, estimada por HAMLYN et al. (1985), foi de 1.10^{-4} em 10^5 protoplastos viáveis. Os diplóides obtidos, segundo estes autores, deveriam estar apresentando um crescimento não balanceado e lento, de forma que os produtos originados da não disjunção apresentariam uma velocidade de crescimento bem maior, fazendo com que rapidamente tomassem todas as colônias. Os autores (BALL & HAMLYN, 1982 e HAMLYN et al., 1985) relacionaram seus resultados obtidos em *C. acremonium* com a instabilidade dos

diplóides das espécies relacionadas de *Cephalosporium micophilum* e *Emericellopsis salmosynnemata* descritas por TUVESON & COY (1961) e FANTINI (1962), respectivamente, considerando a possibilidade de ser esta uma característica deste grupo de organismos.

Evidências da ocorrência de parameiose em *Metarhizium anisopliae* podem ser observadas já nos primeiros trabalhos sobre parassexualidade deste fungo (TINLINE & NOVIELLO, 1971; BERGERON & MESSING-AL-AIDROOS, 1982; SILVEIRA, 1983). Isto se confirmou a medida que o fenômeno foi estudado mais objetivamente, tanto em heterocários obtidos por fusão de hifas (BAGAGLI, 1987; BAGAGLI et al., 1991; VALADARES, 1989), como por fusão de protoplastos (SILVEIRA & AZEVEDO, 1987; COSTA, 1989; VEGA, 1990). De uma maneira geral, recombinantes haplóides e/ou aneuplóides sempre são detectados diretamente dos heterocários em frequências relativamente altas, comparado com a frequência de diplóides do ciclo parassexual de *A. nidulans*, sendo que diplóides, quando ocorrem, são altamente instáveis.

A parameiose, segundo BAGAGLI et al. (1991), também deve estar ocorrendo em *Verticillium albo atrum* e *V. dahliae* (HASTIE, 1962; 1964; TYPAS & HEALE, 1977; HASTIE & HEALE, 1984). Recentemente esta foi também detectada em *Beauveria bassiana* (PACCOLA-MEIRELLES & AZEVEDO, 1991).

Em *Trichoderma pseudokoningii* este fenômeno foi estudado por FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER (1992), que utilizaram linhagens com marcas auxotróficas e morfológicas e estabeleceram heterocários por anastomoses de hifas e fusão de protoplastos. Foram obtidos recombinantes de setores de colônias prototróficas e em colônias selecionadas diretamente em meios seletivos com suplementação. O número e tipos de recombinantes auxotróficos detectados foi alto, principalmente por fusão de protoplastos, onde a frequência destes foi 1000 vezes maior do que por

anastomose de hifas. Sugere-se evidências de ligação entre as marcas *leu-arg* e *leu-met*. Um aspecto interessante relatado por estes autores foi a ocorrência de conídios binucleados em colônias prototróficas, o que pode contribuir para a continuidade do crescimento heterocariótico e confundir a detecção de recombinantes.

A parameiose com sua rápida haploidização dos diplóides no heterocário, permutas cromossômicas mitóticas e geração de recombinantes pode representar um simples e eficiente mecanismo de amplificação da variabilidade genética dos fungos filamentosos imperfeitos (BAGAGLI et al., 1991). Ainda segundo estes autores, isto pode ter ocorrido de forma evolutiva, principalmente no grupo de fungos que sofreu pressão seletiva para se manter no estado haplóide devido a escassez de nutrientes, hipótese de LEWIS (1985), e perda ou diminuição da capacidade de reprodução sexuada devido a extinção ou desbalanceamento de tipos de reação sexual opostos (“mating types”) nos fungos heterotáticos, hipótese de THOMAS et al. (1983). Corroborando com esta especulação, citaram os fatos de que em *Neurospora crassa*, fungo heterotático com eficiente ciclo sexual, não se detecta a presença de ciclo parassexual, em *A. nidulans*, fungo homotático com ciclo sexual, ocorrer ciclo parassexual mas sem evidências de parameiose, enquanto que nos fungos hifomicetos como *A. niger*, *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *T. pseudokoningii* é onde vem sendo detectado este processo de recombinação.

A parameiose, por gerar recombinantes em frequências relativamente altas, demonstrou ser um importante processo na obtenção de novos recombinantes em *T. pseudokoningii* para a produção de celulasas (FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER, 1992).

2.5 RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao acaso)

WILLIAMS et al. (1990) descreveram uma técnica para detectar polimorfismo de DNA. Esta técnica está baseada na amplificação de segmentos de DNA randômicos com “primers” únicos de seqüências nucleotídicas arbitrárias. De acordo com os autores estes polimorfismos, detectados como segmentos de DNA que amplificam em um parental mas não no outro, são herdados de uma maneira mendeliana e podem ser usados para construção de mapas genéticos em uma variedade de espécies. Os autores denominaram estes polimorfismos de marcadores RAPD, de “Random Amplified Polymorphic DNA” (WILLIAMS et al., 1990).

O primeiro estudo de WILLIAMS et al. (1990) demonstrou que “primers” pequenos de seqüência nucleotídica arbitrária podem ser usados para amplificar reprodutivelmente segmentos de DNA genômico de uma ampla variedade de espécies. Polimorfismos entre os produtos de amplificação são freqüentemente detectados, são úteis como marcadores genéticos, e podem ser detectados através do exame de um gel de agarose corado com brometo de etídio.

WILLIAMS et al. (1990) acreditam que o ensaio RAPD pode detectar, em alguns casos, mudança de uma única base no DNA genômico. A maioria das mudanças de um único nucleotídeo na seqüência de um “primer” causou uma mudança completa no padrão de amplificação de segmentos de DNA. Outras fontes de polimorfismos podem incluir deleções de um sítio de “priming”, inserções que deslocam o sítio de “priming” impedindo a amplificação, ou inserções que mudam o tamanho de um segmento de DNA sem impedir sua amplificação (WILLIAMS et al., 1990).

De acordo com WAUGH & POWELL (1992), o número de fragmentos amplificados gerados pela PCR (polymerase chain reaction) depende do tamanho do “primer” e do genoma alvo, e está baseado na probabilidade que uma dada seqüência de

DNA (complementar àquela do “primer”) ocorrerá no genoma, na fita de DNA oposta, em uma orientação oposta dentro de uma distância que seja facilmente amplificável pela PCR.

O uso combinado de RAPDs e linhas quase isogênicas (NILs = near-isogenic lines) fornece uma rota para identificação rápida de marcadores ligados a um caráter de interesse. NILs são gerados por um processo de retrocruzamentos repetidos com seleção para o caráter desejado a cada ciclo de cruzamento. Este procedimento resulta na produção de genótipos que são essencialmente idênticos em todos os loci gênicos, com exceção da região ao redor do gene sob seleção. A alta probabilidade que algum polimorfismo detectado será na região de DNA ao redor do gene introduzido, fornece um meio poderoso de identificação de marcadores que estão ligados ao caráter de interesse (WAUGH & POWELL, 1992).

MARTIN et al. (1991) usaram RAPD para rastrear dois NILs de tomate, que diferiam quanto a presença ou ausência de um gene (**pto**) que confere resistência a *Pseudomonas*, com 144 primers randômicos. Um total de sete produtos de amplificação polimórficos foram identificados entre as duas linhas. Quatro destes produtos foram investigados posteriormente por análise de segregação, e três deles foram confirmados ser fortemente ligados ao gene **pto**.

MILCHELMORE et al. (1991) descreveram um processo alternativo usando DNAs agrupados (“bulked”) dos indivíduos homozigotos de uma população F2. Uma população de alface segregando para genes de resistência a “downy-mildew” (Dm) foi classificada com base na herança da resistência tipo Dm 5/8. Após o teste de progênie de plantas F2 para determinar seu genótipo ao locus Dm 5/8 (isto é, heterozigoto ou homozigoto) os dois grupos foram subdivididos, e duas amostras separadas de DNA foram preparadas para análise RAPD, uma agrupando DNA de pelo menos dez plantas

resistentes homozigotas, e a outra agrupando DNA do mesmo número de plantas homozigotas sensíveis. Estas duas amostras de DNA agrupados, embora homozigotas para alelos alternativos ao locus Dm 5/8, apresentam um “background” randômico heterozigoto por causa da contribuição de todos os outros alelos não selecionados de cada um dos indivíduos no “bulk”. Assim, qualquer produto polimórfico gerado pela análise RAPD deve se originar de DNA intimamente ligado ao locus alvo, uma vez que esta é a única região na amostra de DNA que difere significativamente entre os dois “bulks”. Apenas 300 reações foram requeridas por MILCHELMORE et al. (1991) para obter três marcadores ligados ao locus alvo, enfatizando a eficiência de RAPDs para localização de genes de interesse.

WAUGH & POWELL (1992) consideram que o uso mais apropriado de RAPDs será no mapeamento de fonte de variação poligênica. Caracteres controlados por sistemas poligênicos incluem produção, fatores qualitativos, resistência a fatores de estresse bióticos e abióticos. Além de sua importância biológica e econômica, estes caracteres são freqüentemente os de manipulação mais difícil em programas de melhoramento, uma vez que sua base genética é pobremente entendida. Fontes de variação determinadas poligênica ou quantitativamente são caracterizadas por uma série contínua de variação. Assim os membros aos extremos da distribuição (isto é, os genótipos dos indivíduos expressando alto ou baixo valor fenotípico para o caráter medido) são esperados diferir na maioria dos loci controlando os caracteres. Estes genótipos são provavelmente os mais informativos, uma vez que os alelos são esperados ser altamente associados. Amostras agrupadas compreendendo os membros extremos da distribuição podem ser rastreadas com RAPDs, e os marcadores ligados aos loci controlando caracteres quantitativos podem ser rapidamente identificados. A eficiência desta metodologia será melhorada se linhas recombinantes autofecundadas (RILs =

recombinant inbred lines) forem usadas na análise (BURR et al., 1988). Em particular, famílias de duplos haplóides são muito convenientes para mapeamento com RAPDs, uma vez que efeitos relacionados com dominância estão ausentes e, conseqüentemente, dados de ligação podem ser obtidos diretamente. Tais famílias podem ser extensivamente replicadas e isto facilita a separação da variação fenotípica total em componentes herdáveis e não herdáveis (POWELL et al., 1990; POWELL et al., 1992). Esta metodologia (denominada “mapeamento localizado”) já foi usada para mapear caracteres qualitativos em RILs de *Arabidopsis thaliana* (REITER et al., 1992).

BAIRD et al. (1992) utilizaram marcadores RAPDs para identificar híbridos resultantes de fusão de protoplastos de batata, onde pequenas amostras de regenerantes em desenvolvimento eram requeridas. Uma série de “primers” decâmeros foram triados para identificar aqueles capazes de gerar produtos de amplificação polimórficos dominantes de cada um dos parentais da fusão. Supostos híbridos inter e intraespecíficos foram analisados com os “primers” informativos e os heterocários inequivocamente identificados pelo seu perfil molecular, que representou uma combinação dos perfis dos genótipos doadores. Por identificar híbridos somáticos em estágios precoces do processo de regeneração, os RAPDs podem dar uma contribuição significativa para a eficácia de programas de hibridização somática (WAUGH & POWELL, 1992).

A identificação fenotípica de linhas endogâmicas e cultivares é uma atividade crítica para companhias e laboratórios de sementes. Permite não apenas controlar a propagação e comercialização do seu novo germoplasma, mas também serve para fazer o controle de qualidade de seus produtos. Por exemplo, antes de liberar para o mercado um cultivar híbrido F1, a companhia terá que determinar a pureza genética do produto. Os RAPDs seriam úteis nestes casos, devido a sua capacidade para detectar polimorfismos extensivos, pela sua simplicidade, rapidez e necessidade de quantidades

muito pequenas de DNA genômico, o que permite a análise de sementes individuais e plântulas jovens. HU & QUIROS (1991) utilizaram marcadores RAPDs gerados por 4 “primers” decâmeros arbitrários, para discriminar 14 cultivares de brócoli e 12 de couve-flor (*Brassica oleracea* L.) pelo perfil de bandas. Vinte e oito por cento dos marcadores estavam presentes em ambos brócoli e couve-flor, enquanto que 12,5% eram específicos para cada cultura. Os restantes eram polimórficos em ambas as culturas. Os marcadores gerados por dois e três primers eram suficientes para distinguir cada um dos cultivares de brócoli e couve-flor, respectivamente.

2.5.1 O RAPD em fungos filamentosos

A análise RAPD tem sido utilizada para estudos de variabilidade genética em espécies de fungos filamentosos de interesse econômico. HAYDEN et al. (1994) utilizaram marcadores RAPD para distinguir um biotipo de *Colletotrichum gloeosporioides* de manga de outros oito isolados de *C. gloeosporioides* obtidos de cinco espécies diferentes de frutas. Eles também distinguiram *C. acutatum* e *C. musae* um do outro, e de isolados de *C. gloeosporioides*.

PLUMMER et al. (1994) encontraram padrões de RAPD distintos para linhagens agressivas e não agressivas de *Leptosphaeria maculans*, o que já tinha sido observado por outros autores : SHÄFER & WOSTEMEYER (1992) e GOODWIN & ANNIS (1991). GOODWIN & ANNIS (1991) também observaram um coeficiente de similaridade relativamente alto para todos os isolados V (virulentos = agressivos), indicando que a separação geográfica não foi grande o suficiente para que eles divergissem significativamente.

HAMELIN et al. (1993) utilizaram sete marcadores de RAPD gerados por quatro “primers” decâmeros, para distinguir entre raças da América do Norte e da Europa de *Gremmeniella abietina*, o agente causal de câncer “scleroderris” de coníferas.

As duas raças mais importantes encontradas na América do Norte foram distinguidas pelos marcadores RAPD. Os autores confirmaram a provável origem comum da raça européia presente na América do Norte e a raça presente na Europa. Eles observaram um baixo nível de polimorfismo entre os representantes da raça européia na América do Norte e, alto nível de polimorfismo intra racial na raça norte americana. Estes resultados preliminares estão de acordo com a hipótese de uma introdução recente da raça européia na América do Norte e do efeito do fundador resultante de redução de variabilidade genética.

MCCUTCHON et al. (1993) utilizaram marcadores RAPD para estimar a diversidade genotípica em populações de um fungo endofítico (*Rhabdocline parkeri*) de Douglas fir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. Os autores confirmaram a hipótese de que a diversidade genética de *R. parkeri* é alta em árvores grandes e antigas; eles também mostraram que árvores jovens e pequenas podem adquirir diversidade fúngica comparável quando expostas a inóculo de árvores velhas.

CHEN et al. (1993) encontraram uma baixa associação entre virulência e padrões de RAPD em *Puccinia striiformis*, agente causal de ferrugem amarela do trigo, indicando que o polimorfismo de DNA é independente de virulência. O polimorfismo de DNA foi detectado entre raças e isolados dentro de raças.

AUFAVRE-BROWN et al. (1992) utilizaram sete primers que geraram RAPDs que permitiram a diferenciação de três isolados de *Aspergillus fumigatus*, causador de várias condições pulmonares, incluindo aspergilose broncopulmonar alérgica, aspergiloma, e aspergilose invasiva. Um destes “primers” também produziu um padrão único de RAPD em cada um dos seis isolados fúngicos adicionais, demonstrando a utilidade desta técnica para distinguir entre isolados de *A. fumigatus*.

STRONGMAN & MACKAY (1993) utilizaram análise RAPD para distinguir *Hirsutella longicolla* var. *cornuta* de *H. longicolla* var. *longicolla*. O gênero *Hirsutella* é heterogêneo e contém um grande número de espécies patogênicas para insetos. Os isolados usados nos estudos de STRONGMAN & MACKAY (1993) foram obtidos de larvas de insetos (spruce budworm = verme de abeto). Há alguma indicação de que a var. *cornuta* é mais frequentemente associada com o sexto ínstar e a var. *longicolla* com os primeiros estágios de desenvolvimento. Os dados de RAPD sustentam esta observação.

MEGNEGNEAU et al. (1993) encontraram um alto nível de polimorfismo intraespecífico revelado pela análise RAPD no grupo *Aspergilli* "black". As 17 linhagens examinadas pelos autores puderam ser subdivididas em 15 subgrupos distintos.

BIDOCHKA et al. (1994) utilizaram a análise RAPD para diferenciar espécies e linhagens de fungos entomopatogênicos. Foi verificada a variabilidade genômica de 24 isolados de fungos deuteromicetos (*Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride*, linhagens não identificadas de *Metarhizium* e *Beauveria bassiana*) que foram encontradas infectando gafanhotos. *M. flavoviride* apresentou pouca variabilidade intraespecífica em fragmentos amplificados pela PCR quando comparado a *M. anisopliae*. O alto nível de variabilidade de *M. anisopliae* foi similar a variabilidade total entre *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *M. flavoviride*, e sugere que *M. anisopliae* pode incluir várias espécies crípticas.

DOUDRICK et al. (1993) desenvolveram marcadores RAPD para *Cronartium quercuum* f. *sp. fusiforme*, agente causal de ferrugem fusiforme em pinheiros no sul dos Estados Unidos. Ligações genéticas foram identificadas entre 103 loci marcadores em uma população de 48 gametotalos e gotas espermacia produzidos de uma cultura única urediniospora. Um mapa genético preliminar com oito grupos de ligação e 12 pares de ligados foi apresentado. Baseados na extensão de ligação detectada entre os

loci, o tamanho do genoma nuclear de *C.q. f. sp. fusiforme* foi estimado ser aproximadamente 5100 unidades de recombinação. Os 103 loci marcadores caracterizados são estimados fornecer 40% de cobertura do genoma.

MANULIS et al. (1994) distinguiram através de RAPD isolados patogênicos e não patogênicos de *Fusarium oxysporum* recuperados de cravo. Cinquenta e oito isolados, que foram obtidos em Israel de diferentes cultivares de cravo, incluindo 42 isolados patogênicos da raça 2, um isolado patogênico da raça 4 e 15 isolados não patogênicos, foram examinados por RAPD com 30 “primers” decâmeros arbitrários. Os padrões de RAPD gerados por 22 primers tornou possível a distinção clara entre isolados patogênicos e não patogênicos.

KERSULYTE et al. (1992) distinguiram entre isolados de *Histoplasma capsulatum*, um fungo patogênico sistêmico e de trato respiratório, de uma única classe de RFLP. Cada um dos 29 isolados de classe 2 de RFLP, o grupo endêmico na América do centro-oeste foi distinguido usando-se três primers arbitrários. Em contraste, colônias de variantes morfológicas S e E de duas linhagens não foram distinguidas de seus parentais R pelo uso de 18 primers. Assim, os isolados clínicos de *H. capsulatum* são bastante diversos, mas seus genomas permanecem estáveis durante cultura em laboratório. Estes resultados sugerem novas possibilidades para análise epidemiológica e estudos de populações fúngicas em hospedeiros infectados. A diversidade de isolados clínicos de *H. capsulatum* demonstrada por KERSULYTE et al. (1992) está de acordo com o fato deste fungo residir em muitos tipos de solos e climas, e com sua capacidade de infectar muitas espécies animais. Sua estrutura genética populacional deve assim refletir deriva genética, pressões seletivas diferentes nos seus vários nichos e, mudanças genéticas seguindo cruzamentos em habitats naturais.

CORRELL et al. (1993) examinaram 24 isolados de *Colletotrichum orbiculare*, três isolados de *C. magna* e dois isolados de *Glomerella cingulata* var. *orbiculare*, representando diversas origens geográficas e de hospedeiros de cucurbita, grupos de compatibilidade vegetativa e raças, por RFLPs de DNA nuclear e mitocondrial e por RAPD. Cinco primers de RAPD resolveram os mesmos quatro grupos de RFLP. Um primer de RAPD resolveu dois grupos entre os isolados do haplótipo A de RFLP de mt DNA que correlacionou com origem de hospedeiro, grupo de compatibilidade vegetativa e raça. Assim, um primer de RAPD diferenciou as duas raças de *C. orbiculare*. Houve uma correspondência estrita entre haplótipo de RFLP de mt DNA, grupo de DNA “fingerprint” e grupo de RAPD entre os isolados examinados.

KHUSH et al. (1992) utilizaram primers decâmeros para gerar marcadores RAPD de linhagens comerciais e selvagens do cogumelo cultivado *Agaricus bisporus*. De 20 primers testados, 19 amplificaram DNA de *A. bisporus*, cada um produzindo de 5 a 15 marcadores variando de 0,5 a 3,0 kpb. Os marcadores RAPD identificaram sete genótipos distintos entre oito linhagens heterocarióticas; duas das linhagens comerciais estão relacionadas uma com a outra através de descendência de um único esporo. Homocários recuperados de protoplastos regenerados de linhagens heterocarióticas carregavam um subconjunto dos marcadores RAPD encontrados nos heterocários, e ambos os núcleos haplóides de dois heterocários eram distinguíveis. Os marcadores RAPD também serviram para identificar a criação de um heterocário híbrido e para analisar a progênie meiótica desta nova linhagem: a maior parte dos basidiosporos tiveram “fingerprints” RAPD idênticos àquele do parental heterocariótico, embora alguns de crescimento lento fossem homoalélicos em vários loci que eram heteroalélicos no parental, sugerindo que eles representavam basidiosporos homocarióticos raros. Eventos de “crossover” entre um locus marcador RAPD e seu respectivo centrômero parece ser

freqüente. Estes resultados demonstram que os marcadores de RAPD fornecem uma alternativa eficiente para “fingerprinting” de linhagens e, é uma ferramenta versátil para estudos genéticos e manipulação de *A. bisporus*.

CUBETA et al. (1993) utilizaram reações de incompatibilidade somática e marcadores genéticos para confirmar a confiabilidade de tufos como uma indicação para a heterocariotização em *Rhizoctonia solani*. Dezesesseis linhagens homocarióticas, monobasidiospóricas de 10 isolados heterocarióticos diferentes de *R. solani* do grupo 4 de anastomose foram pareados em todas as combinações possíveis em batata dextrose e 1% de ágar vegetal, e examinadas quanto a formação de tufos e heterocariotização. De um total de 136 pareamentos, 25% (7 de 28) de pareamentos intraestoque e 54% (58 de 108) de pareamentos interestoques produziram tufos visíveis. Os supostos heterocários de tufos aéreos se desenvolveram em colônias com micélio morfologicamente distinto de e somaticamente incompatível com ambos os homocários parentais. Similarmente heterocários distintos também foram isolados da zona de interação entre alguns homocários pareados que não formaram tufos. Os padrões de migração nuclear foram examinados por amostragem de hifas de ambos os lados da zona de interação das hifas. Heterocários foram detectados em um ou em ambos os lados do tufo heterocariótico em cerca de metade destes casos, indicando que a heterocariotização não se restringiu a zona correspondente a formação do tufo. Marcadores de RAPD foram usados para confirmar os supostos heterocários. Os resultados destes estudos mostram que a formação do tufo não é sempre indicativa de heterocariotização e sugere um papel limitado para a migração nuclear durante o cruzamento em *R. solani*.

YOON & GLAWE (1993) examinaram a variação genética dentro e entre seis populações de *Hypoxylum truncatum* através de marcadores RAPD. Nove isolados de cada população foram caracterizados. Os resultados foram analisados feneticamente.

Com 18 primers decâmeros escolhidos ao acaso, a variação genética foi examinada entre isolados de um único estroma, e entre isolados de estromas diferentes da mesma coleção. Vinte primers decâmeros randômicos foram usados para examinar a variação genética entre 54 isolados (nove de cada uma das seis populações) e foi gerada uma matriz de 99 caracteres por 54 isolados. A análise fenética separou os 54 isolados em dois grupos geneticamente distintos que corresponderam com tipos diferentes de estroma. Os resultados deste estudo sugerem que o tipo de estroma é um caráter taxonômico significativo para o fungo *H. truncatum* e que as duas formas de estroma em *H. truncatum* sensu Miller são indicativas de espécies distintas. O padrão de ramificação do fenograma não corresponde com populações geograficamente distantes. Segundo os autores, o fluxo gênico entre estas populações pode ser responsável por este achado.

VARGA & CROFT (1994) utilizaram marcadores de RAPD para estudar segregantes com substituição cromossômica de híbridos entre *Aspergillus nidulans* e *A. quadrilineatus*. Eles foram capazes de localizar seqüências amplificadas de vários cromossomos de *A. nidulans* e de *A. quadrilineatus*. Estas marcas de RAPD podem ser agora mapeadas em regiões específicas dos cromossomos pela análise genética clássica, ou usando-se biblioteca de DNA recombinante cromossomo-específica de *A. nidulans*.

ARNAU et al. (1994) obtiveram marcadores de RAPD em *Cladosporium fulvum* para estabelecer um mapa genético baseado em recombinação mitótica neste fungo imperfeito. A análise dos segregantes forneceu evidências moleculares de um alto grau de recombinação durante o ciclo parassexual. Um estudo molecular de 49 RAPDs mostrou que, com apenas uma exceção, todos os marcadores de RAPD estudados representavam DNA repetitivo. Esta situação impede o uso direto destes marcadores para iniciar o “chromosome walking” para um gene de interesse ou para designação dos grupos de ligação aos cromossomos separados eletroforicamente. Um teste simples de

reamplificação foi então aplicado, o que permitiu a discriminação rápida entre espécies de DNA de cópia única e repetitivo, sem a necessidade de análise Southern. Além disso, foi evidenciada a presença de espécies de DNA de fita simples nos produtos de amplificação e, estes podem estar presentes além de sua contrapartida de fita dupla. O teste de reamplificação pode também identificar estas espécies de DNA, evitando a falsa interpretação de bandas polimórficas.

DURAND et al. (1993) avaliaram o potencial de RAPDs como marcadores genéticos na análise do ciclo parassexual em *Penicillium roqueforti*. Para este propósito, DNA isolado das linhagens parentais, de um diplóide (um produto de fusão) e de uma linhagem haplóide escolhidas ao acaso de cada fenótipo recombinante foram analisados para fragmentos de DNA polimórficos gerados por amplificação pela PCR. Os dados dos autores revelaram que produtos que caracterizavam as linhagens parentais foram perdidos em alguns recombinantes. A perda de sítios de ligação do primer que produziram estes fragmentos pode ser consequência da distribuição de um dos pares do sítio por rearranjo cromossomal, isto é, por crossing-over; ou eles podem ter se originado de não disjunção durante a haploidização. Por outro lado, fragmentos que não existiam nas linhagens parentais foram produzidos em alguns recombinantes. Isto revela que novos sítios de ligação ao primer foram criados, isto é, seqüências foram rearranjadas em proximidade e orientação adequadas para permitir a amplificação pela PCR de um novo produto. Este rearranjo pode ser consequência de um crossing-over ou de uma translocação.

2.5.2 O RAPD em *Trichoderma*

MUTHUMEENAKSHI et al. (1994) separaram isolados de *T. harzianum* em três grupos. Dentro de um grupo a variação foi geralmente baixa, com valor de p similar àquele relatado dentro de espécies em gêneros tal como *Phytophthora* (FÖSTER et al., 1988), *Aspergillus* (MOODY & TYLER, 1990) e *Colletotrichum* (SRĒENIVASAPRASAD et

al., 1992). Entre grupos a variação foi alta, com poucas bandas compartilhadas, resultando em valores de F geralmente mais baixos que ou similares àqueles relatados para espécies diferentes de *Phytophthora* de 43-68% (FÖSTER et al., 1988) e *Pythium* spp de 20-67% (MARTIN - KISTLER, 1990).

ZIMAND et al. (1994) analisaram 47 linhagens de *Trichoderma* pelo procedimento de RAPD usando nove primers. Dentro de 23 linhagens de *T. harzianum*, dez compartilharam padrões de RAPD similares. As dez linhagens com padrões similares originaram-se de várias regiões geográficas. Entre linhagens testadas do grupo *T. viride*, não foi encontrada tal similaridade, apenas três pares de linhagens compartilharam padrões similares.

SANTOS (1992) analisou 14 linhagens diferentes de *Trichoderma* usando dois primers de RAPD. As linhagens puderam ser divididas em grupos de similaridade e diferenciações de linhagens da mesma espécie mas de locais diferentes puderam ser detectadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 Linhagens de *Trichoderma pseudokoningii* var. *rifai*

Foram utilizadas as seguintes Linhagens de *Trichoderma pseudokoningii* var. *rifai*

1. Linhagem Est-3 verde, cedida pelo Dr. Itamar Soares de Melo, do Centro Nacional de Pesquisa e Defesa da Agricultura (CNPDA-EMBRAPA) localizado em Jaguariuna, identificada pela Prof^a. Maria José dos Santos Fernandes, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.
2. Linhagem M verde, isolada na Reserva Ecológica do CPATU, Belém, pelo Biólogo Aparecido Osdimir Bertolin e identificada pela Prof^a Maria José dos Santos Fernandes, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, e os mutantes da linhagem M:
 - mutante *whi4 leu bio* branco obtido pela Dr^a Marcia Furlaneto no Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ/USP, Piracicaba (SP).
 - mutante T35 *g nic met inos arg* verde, obtido pela Bióloga Margarete F.C. Nadaline no Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ/USP, Piracicaba (SP).

3.2 Meios de Cultura e Soluções Utilizadas

3.2.1 Meio Mínimo

O meio mínimo foi preparado segundo PONTECORVO et al. (1953), com a seguinte constituição:

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,001 g
ZnSO ₄	0,001 g
Glicose	10,0 g
Ágar difco	15,0 g
Água destilada	completar até 1000 ml

e ajustando-se o pH para 5,5 com HCl 1N.

3.2.2 Meio Completo

O meio completo foi preparado conforme PONTECORVO et al. (1953), modificado por AZEVEDO & COSTA (1973), adicionando-se meio mínimo:

Peptona	2,0 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Extrato de levedura	0,5 g
Solução de vitaminas	1,0 ml

e ajustando-se o pH para 5,5 com HCl 1N.

3.2.3 Meio Mínimo Líquido

Foi preparado segundo o item 3.2.1, não adicionando-se o ágar (PONTECORVO et al., 1953)

3.2.4 Meio Completo Líquido

Foi preparado segundo o item 3.2.2, não adicionando-se o ágar. (PONTECORVO et al., 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973)

3.2.5 Meio Completo 2 x concentrado

Foi preparado segundo o item 3.2.2, onde cada componente foi colocado em quantidade dobrada, exceto água.

3.2.6 Meio Mínimo mais 4% de Meio Completo

Ao Meio Mínimo (item 3.2.3) foi adicionado Meio Completo (item 3.2.4) numa proporção de 4% (V/V). Em seguida, foram distribuídos 2,5 ml por tubo de ensaio e esterilizados.

3.2.7 Solução de vitaminas

Biotina.....	0,20 mg
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	10,0 mg
Tiamina.....	50,0 mg
Piridoxina	50,0 mg
Ácido nicotínico.....	100,0 mg
Riboflavina.....	100,0 mg
Água destilada esterilizada	100,0 ml

A solução foi esterilizada em banho-maria durante 15 minutos e guardada no refrigerador em frasco escuro, sob clorofórmio.

3.2.8 Solução de Ácido Nucleico de Leveduras

2 g de ácido nucleico de leveduras em 15 ml de solução 1N de HCl.

2 g de ácido nucleico de leveduras em 15 ml de solução 1N de NaOH.

Ambas as soluções foram aquecidas em banho-maria durante 20 minutos, misturadas e o pH ajustado para 6,0 com NaOH 10% (P/V). A solução foi filtrada e o volume completado para 40 ml, conservando-se em refrigerador.

3.2.9 Solução de Caseína Hidrolisada

100 mg de caseína hidrolisada foram dissolvidos em 10 ml de água destilada esterilizada. A solução foi aquecida em banho-maria durante 15 minutos e conservada em refrigerador.

3.2.10 Suplementos Adicionados ao Meio Mínimo

Os estoques de suplementos, componentes das soluções de vitaminas, ácido nucleico e caseína hidrolisada (AZEVEDO & COSTA, 1973), foram preparados adicionando-se cada um deles em frascos escuros contendo 10 ml de água destilada esterilizada. Estes foram aquecidos durante 15 minutos e conservados em refrigerador.

3.2.11 Solução Salina

A solução salina (0,85% P/V) foi preparada adicionando-se água destilada a 0,85 g de NaCl até completar-se 100,00 ml de volume total. Em seguida, ela foi distribuída em frascos (9 ml por frasco) e a seguir autoclavada.

3.2.12 Solução de “Tween-80”

Preparou-se a solução de “Tween-80” (0,1% V/V) adicionando-se 99,9 ml de água destilada a 0,1 ml de “Tween-80”. A solução foi distribuída em tubos de ensaio (2,5 ml por tubo), que foram a seguir autoclavados e mantidos no refrigerador.

3.2.13 Solução de Desoxicolato de Sódio

A solução de desoxicolato de sódio (10% P/V) foi preparada adicionando-se água destilada a 10,0 g de desoxicolato de sódio até completar-se 100,00 ml de volume total. Em seguida, ela foi autoclavada e mantida em refrigerador.

3.2.14 Adesivo de Haupts

Dissolveu-se 1 g de gelatina em 100 ml de água destilada a 30°C. 2 g de cristais de fenol e 15 ml de glicerina foram adicionados e dissolvidos. O conjunto foi agitado bem e filtrado.

3.2.15 Solução de Giemsa

Diluiu-se uma parte de Giemsa em 66 partes de glicerina a 60°C e, após resfriamento, misturou-se 66 partes de metanol. Esta solução foi mantida a temperatura ambiente.

3.2.16 Solução de HCl

HCl concentrado.....	82,50 ml
Água destilada	completar até 1000 ml

A solução foi conservada em frasco escuro, a temperatura ambiente.

3.2.17 Tampão Fosfato 0,125 M pH 7,0.

KH_2PO_4	5,304 g
K_2HPO_4	10,614 g
Água destilada	completar até 1000 ml

A solução foi distribuída em frascos (9 ml por frasco), autoclavada e conservada em refrigerador.

3.2.18 Tampão Fosfato 0,02 M pH 5,8

Solução A

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,76 g
Água destilada	completar até 1000 ml

Solução B

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	3,56 g
Água destilada	completar até 1000 ml

Para a obtenção da solução 0,02 M pH 5,8, foram misturados 920,0 ml da solução A e 80,0 ml da solução B. O pH foi ajustado com as soluções A e B.

3.2.19 Tampão Fosfato pH 7,0

Solução A

NaH_2PO_4	27,8 g
Água destilada	completar até 1000 ml

Solução B

Na_2HPO_4	63,65 g
Água destilada	completar até 1000 ml

Misturou-se 45,0 ml da solução A e 55,0 ml da solução B, completando-se o volume para 1000,0 ml com água destilada.

3.2.20 Tampão Mc Ilvaine's pH 5,8

Solução de ácido cítrico: 21,0 g em 1000,0 ml de água destilada.

Solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 32,0 g em 1000,0 ml de água destilada.

Para a obtenção do tampão, misturou-se 184,25 ml da solução de ácido cítrico e 315,75 ml da solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

3.2.21 Solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,2 M

Dissolveu-se 158,4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pequeno volume do tampão de Mc Ilvaine (item 3.2.20). Ajustou-se o pH com a solução de Na_2HPO_4 e completou-se o volume para 1000,0 ml com o referido tampão. No momento do uso, foi adicionado ao meio completo 2 x concentrado (item 3.2.5) na proporção de 1:1.

3.2.22 Solução de enzimas para Produção de Protoplastos

A solução de enzimas foi preparada segundo HAMLYN et al. (1981). Para cada 1 ml de tampão $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6 M pH 5,8 foram adicionados 5,0 mg de complexo lítico, sendo 2,5 mg de “celulase CP” (John & Sturges, Selby, Yorkshire, UK) e 2,5 mg de “novozym 234” (Novo Industri Denmark).

3.2.23 Solução de Polietilenoglicol 6000 (PEG)

Solução A

CaCl_2 11,0 g

Água destilada completar até 1000 ml

Solução B

Glicina 3,75 g
 Água destilada completar até 1000 ml

Foi adicionado 10 ml da solução A em 10 ml da solução B. O pH foi corrigido para 8,0 com NaOH 4% e foi adicionado PEG 6000 na concentração final de 30%. A solução foi autoclavada e mantida em refrigerador a 4°C.

3.2.24 Tampão de extração

100 mM Tris, pH 8,0; 50 mM EDTA, pH 8,0; 500 mM NaCl

Foram feitas as seguintes soluções estoque:

Tris 1M, pH 8,0

Trizma base 121,1 g
 Água destilada 800 ml

O pH foi ajustado para 8,0 com HCl concentrado. A solução foi aquecida, resfriada a temperatura ambiente, foi adicionada água destilada para um volume final de 1000 ml. Foram feitas alíquotas de 100 ml que foram autoclavadas.

EDTA 0,5 M, pH 8,0

EDTA..... 186,1 g
 NaOH..... 20,0 g
 Água destilada 800 ml

Após o ajuste do pH o volume foi completado para 1000 ml. Foram feitas alíquotas de 100 ml que foram autoclavadas.

NaCl 5 M

NaCl 292,24 g
 Água destilada 800 ml

O volume foi ajustado para 1000 ml. Foram feitas alíquotas de 100 ml que foram autoclavadas.

Tampão de extração

Tris 1 M, pH 8,0 100 ml
 EDTA 0,5 M, pH 8,0 100 ml
 NaCl 5 M 100 ml
 Água destilada 700 ml

O tampão foi autoclavado e armazenado a temperatura ambiente.

3.2.25 SDS (20%)

SDS 20 g
 Água destilada 80 ml

A água foi aquecida a medida que o SDS foi adicionado. Após resfriamento completar-se-á o volume para 100 ml com água destilada. A solução foi armazenada a temperatura ambiente.

3.2.26 Acetato de potássio 5 M

Acetato de potássio.....	49 g
Água destilada	70 ml

Foram adicionados 60 ml de solução de acetato de potássio 5 M, 11,5 ml de ácido acético glacial e 28,5 ml de água destilada. Filtrou-se com filtro millipore de 0,45 μ m, e armazenou-se a solução à temperatura ambiente.

3.2.27 TE pH 8,0

Tris 1 M.....	5 ml
EDTA 0,5 M	1 ml

O volume foi completado para 500 ml com água destilada, e a solução foi autoclavada.

3.2.28 Tampão de amplificação 10x

Tris-HCl 100 mM, pH 8,3; KCl 500 mM; MgCl₂ 15 mM. O tampão é provido com a Taq polimerase preparada para uso e contendo os componentes acima mencionados, mantido a -20°C, fornecidos pela Gibco BRL.

3.2.29 Primers

Os primers foram diluídos a uma concentração estoque de 4 μ M em água milli Q esterelizada, usando o peso molecular do primer individual dado pelo fornecedor (OPERON). Os primers diluídos foram mantidos a -20°C.

3.2.30 MgCl₂ 6,25 mM

MgCl ₂ .6H ₂ O	0,13 g
Água HPLC	80 ml

O volume foi completado para 100 ml e a solução foi autoclavada.

3.2.31 Taq polimerase

A polimerase foi fornecida pela Gibco BRL, pronta para uso em 5 U/ μ l, armazenada em tampão apropriado com 50% de glicerol.

3.2.32 dNTPs

Os dNTPs foram fornecidos pela Gibco BRL. ATP, CTP, GTP e TTP estavam armazenados em quatro soluções a 10 mM. Preparou-se um estoque 12,5x pela mistura de quantias iguais de cada solução de nucleotídio, dividiu-se a mistura em alíquotas de 70 μ l que foram mantidas a -20°C.

3.2.33 Tris-Borato-EDTA 10x

Trisma base 108,0 g

Ácido Bórico..... 55,0 g

EDTA 0,5 M (pH 8,0) 40,0 ml

Foi completado o volume para 1000 ml com água destilada.

3.2.34 Solução corante para eletroforese

Azul de bromofenol 6 mg

Ficoll 625 mg

Água destilada 5 ml

Adicionou-se o azul de bromofenol em ficoll em um frasco ambar, em seguida foi adicionado água destilada, misturando-se bem para dissolver.

3.2.35 Brometo de etídio

Brometo de etídio	1 g
Água destilada	100 ml

Agitou-se durante 1 hora com agitador magnético e armazenou-se em frasco ambar sob refrigeração.

3.2.36 Gel de agarose 1,4%

Agarose	0,14 g
Tampão TAE	10,0 ml

Colocou-se a agarose em um erlenmeyer, adicionou-se o TBE 1x, aqueceu-se a suspensão agarose-tampão até iniciar a ebulição.

3.3 Determinação da redução de colônia

A redução do diâmetro de colônias foi estimada em seis concentrações diferentes de desoxicolato de sódio e em cinco pHs diferentes, usando-se meio completo.

3.4 Verificação do número de núcleos por conídios

Para a verificação do número de núcleos por conídios utilizou-se o método de TANAKA et al. (1979). O material a ser corado foi aderido a lamínulas, através de adesivo de Haupts. O material foi fixado durante 30 minutos em solução de álcool etílico-ácido acético 3:1, a temperatura ambiente. A hidratação foi efetuada por tratamento sucessivo em álcool etílico 95% durante 5 minutos e álcool etílico 70% durante 30 minutos. Procedeu-se a hidrólise em solução de ácido clorídrico 1 N a 60°C durante 12 minutos. Após este período as lamínulas foram lavadas três vezes com água destilada e

colocadas numa solução de Giemsa com tampão fosfato pH 7,0 (1:5), durante 30 minutos. O excesso do corante foi retirado por lavagem com o tampão e as lamínulas foram colocadas em lâminas e observadas em microscópio óptico.

3.5 Sobrevivência a luz ultravioleta

Foi feita uma suspensão de conídios da linhagem Est-3 de *Trichoderma pseudokoningii* em solução tween e diluída em solução salina para a concentração de 10^6 conídios por ml. O volume de 10 ml dessa suspensão de conídios foi colocado numa placa de Petri, previamente esterilizada, à distância de 19 cm da fonte de luz ultravioleta da marca “Mineralight” 115 V, 60 mA, da Ultra-Violet Prod. Inc. (San Gabriel - Calif., USA). O controle foi obtido retirando-se 1,0 ml do volume da placa antes do início da irradiação. A placa foi exposta durante 7, 9 e 11 minutos à fonte de luz ultravioleta. Foi retirado 1,0 ml da placa após cada período de irradiação. Diluições apropriadas de cada tempo de irradiação, assim como a do controle, foram feitas em solução salina e 0,1 ml de cada diluição foi semeada em placas com meio completo contendo 0,3% de desoxicolato de sódio (reductor). Toda a irradiação e as posteriores diluições foram feitas no escuro. As placas foram incubadas durante aproximadamente 48 horas. A contagem de colônias isoladas foi feita após este período.

3.6 Obtenção de mutantes morfológicos e auxotróficos

Foi feita uma suspensão de conídios da linhagem Est-3 de *T. pseudokoningii* em solução tween e diluída em solução salina para a concentração de 10^6 conídios por ml. Esta suspensão foi exposta à luz ultravioleta durante 9 minutos, a partir da mesma fonte de luz ultravioleta do item 3.5. Após a irradiação, 0,1 ml de

diluições apropriadas foram semeadas em meio completo com 0,3 % de desoxicolato de sódio e incubadas durante 120 horas.

As colônias resultantes dos conídios sobreviventes foram transferidas uma a uma, com auxílio de palitos esterilizados, para placas com meio mínimo com 0,2% de desoxicolato de sódio (26 pontos). Após 48 horas de incubação, os pontos que não cresceram foram transferidos em blocos de ágar para meio completo. Após 120 horas de incubação, os conídios dessas colônias foram transferidos novamente para meio mínimo. Não havendo crescimento em meio mínimo, as colônias foram consideradas como sendo mutantes auxotróficos.

Os mutantes morfológicos foram selecionados através da observação visual da morfologia das colônias.

Para o ensaio das deficiências nutricionais dos mutantes obtidos fez-se placas com meio mínimo sólido com 0,1 ml de cada uma das soluções de caseína hidrolisada, de ácidos nucleicos de leveduras e de vitaminas. Os mutantes auxotróficos foram inoculados nestas placas e estas incubadas durante 48 horas. O crescimento dos mutantes em uma das soluções indicou sua deficiência, sendo então ensaiados para cada um dos componentes da solução individualmente.

Para a obtenção de duplos mutantes seguiu-se o mesmo critério acima com exceção de que o requisito nutricional referente a mutação simples foi adicionado ao meio mínimo.

3.7 Teste de reversão

Suspensões de conídios dos mutantes de *T. pseudokoningii* Est-3 foram feitas em solução Tween 80. Concentrações em torno de 10^7 a 10^8 por ml foram obtidas, sendo 0,1 ml da suspensão de cada um dos mutantes semeado em 10 placas de meio

mínimo. No caso de mutantes com dupla deficiência cada um dos respectivos suplementos foi adicionado separadamente ao meio mínimo. O crescimento de colônias foi verificado após 120 horas de incubação.

3.8 Obtenção de protoplastos

A obtenção de protoplastos foi feita segundo metodologia descrita por HAMLYN et al. (1981). Foi feita uma suspensão de conídios em solução tween e diluída em solução salina para a concentração 10^6 conídios por ml. Um mililitro dessa suspensão foi inoculado em erlenmeyer com 50 ml de meio completo líquido e incubado durante 18 horas a 28°C com agitação rotatória (150 rpm). Após esse período, o micélio foi filtrado a vácuo, em papel de filtro, e lavado duas vezes com 3,0 ml de solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6 M. Determinou-se o peso úmido do micélio (utilizou-se 1 g) e montou-se o sistema lítico (item 3.2.22).

Incubou-se durante 3 horas a 28°C com agitação rotatória (150 rpm). Após este período, os protoplastos foram coletados através de centrifugação, a aproximadamente 400 g/25 segundos. Coletou-se o sobrenadante e centrifugou-se a 2900 g /15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 3,0 ml de solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6 M. Repetiu-se o procedimento, sendo que após a última lavagem, o sedimento foi ressuspenso em 2,0 ml de solução estabilizadora [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6 M] e feita a contagem em câmara de Neubauer. Os protoplastos foram semeados em placas com meio de regeneração [meio completo + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6 M] e em placas com meio completo, e incubados durante 72 horas. Após este período, a viabilidade dos protoplastos foi estimada. Foram utilizadas as seguintes diluições: 10^5 , 10^4 e 10^3 protoplastos por mililitro.

3.9 Fusão de protoplastos

Protoplastos dos mutantes a serem cruzados, obtidos segundo o item 3.8, foram misturados em quantidades iguais (cerca de 10^6 protoplastos/ml) e centrifugados a 2900 g/10 minutos.

Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 1 ml de solução do agente fusogênico (PEG) o qual foi mantido a 28°C durante 10 minutos. Após este período, foi adicionado cerca de 10 ml de solução estabilizadora (item 3.2.21) e centrifugou-se a 2900 g/10 minutos.

Repetiu-se o procedimento por mais duas vezes, para retirada do PEG, sendo o sedimento finalmente ressuspenso em 4 ml de estabilizador. Procedeu-se diluições apropriadas e colocou-se 0,1 ml em placa de cultura.

Os produtos de fusão foram semeados em meio mínimo + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, meios seletivos para as marcas envolvidas no cruzamento + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, meio completo + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e meio completo. Após 8 dias de incubação à 28°C avaliou-se as frequências de recombinantes e procedeu-se a análise genética.

3.10 Obtenção de heterocários

Conídios de mutantes duplo auxotróficos foram colocados em tubos de ensaio contendo meio mínimo líquido com 4% de meio completo líquido. Após 5-6 dias de incubação à 28°C, a película desenvolvida na superfície do meio líquido foi transferida para placas contendo meio mínimo sólido, em quatro pontos. Após 7 dias de incubação à 28°C, observou-se o crescimento das colônias heterocarióticas.

Obs.: como não houve formação de película, as outras etapas não foram realizadas.

3.11 Extração do DNA

A extração de DNA foi feita de acordo com SPECHT et al. (1982) com algumas modificações.

Triturou-se 0,5-1,0 g de micélio com nitrogênio líquido para obter um pó.

Transferiu-se o micélio triturado para um tubo de centrifuga de 50 ml e adicionou-se 10 ml de tampão de extração, incubou-se a amostra a 60-70°C durante 30 minutos.

Após a incubação, foi adicionado 5 ml de acetato de potássio 5 M (item 3.2.26) e inverteu-se suavemente os tubos para uniformizar a dispersão do material. Colocou-se as amostras imediatamente no gelo durante 30 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm em uma centrífuga refrigerada durante 10 minutos.

O sobrenadante foi filtrado através de uma gaze e transferido para um tubo de centrifuga e estimou-se visualmente o volume ocupado pela amostra. Foi adicionado aproximadamente 1/3 a 1/2 do volume de isopropanol a amostra. Inverteu-se o tubo suavemente até formar um precipitado visível de DNA. Incubou-se durante duas horas a -20 °C e seguiu-se centrifugação a 10.000 rpm durante 20 minutos.

O precipitado foi deixado secar e foi ressuspenso em 1 ml de TE. Foram adicionados 5 µl de RNase e feita incubação a 37 °C durante uma hora. Este volume foi dividido em dois tubos de microcentrifuga de 1,5 ml e foram adicionados 500 µl de fenol. Os tubos foram agitados em vortex e centrifugados a 10.000 rpm durante 5 minutos. A fase superior foi retirada e foram adicionados 250 µl de fenol e 250 µl de clorofórmio, feita a agitação em vortex e centrifugação a 10.000 rpm durante 5 minutos. A fase superior foi retirada e foram adicionados 500 µl de clorofórmio. Após agitação em vortex e centrifugação a 10.000 rpm durante 5 minutos, a fase superior foi retirada e foram

adicionados 500 µl de isopropanol e feita incubação a -20 °C durante 2 horas. Foi feita centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos, deixou-se secar o precipitado e ressuspendeu-se em 100 µl de TE. As amostras foram estocadas a -4°C.

3.12 Quantificação do DNA

Foram feitas diluições dos DNAs a 1:200 e feitas leituras em espectrofotômetro a 260 nm. Foi utilizado um fator de correção de 50, a leitura obtida foi multiplicada pelo fator de correção e pela diluição, e assim obteve-se a concentração do DNA em µg/µl.

3.13 Amplificação do DNA

Para a amplificação do DNA seguiram-se as seguintes etapas: (1) as quantidades de reagentes necessários para cada primer estão apresentadas na Tabela 1, necessitou-se multiplicar as quantidades dos reagentes pelo número total de reações que foram utilizados adicionando-se dois ao total como margem de segurança. (2) misturou-se as quantidades apropriadas de água, tampão 10x, dNTPs, primers, MgCl₂ e Taq polimerase em um único tubo. (3) Foi adicionado 20 µl da solução (para reações de 25 µl) a cada tubo para amplificação. O material restante da solução foi utilizado para uma reação controle (contendo todos os componentes exceto o DNA genômico). (4) Imediatamente após a adição da mistura de reação, foi adicionado 5 µl das amostras de DNA. Foram adicionadas duas gotas de óleo mineral a cada tubo de modo que este cubra a superfície da solução para evitar a evaporação.

Tabela 1 - Quantidades de reagentes para cada amostra de DNA para reações de 25 µl, para reação de RAPD.

Reagentes	volume (µl)	conc. estoque	conc. final
<i>Água MilliQ</i>	11,2	--	--
<i>Tampão</i>	2,5	10x	1x
<i>dNTPs</i>	2,0	2,5 mM	0,2 mM
<i>Primer</i>	2,5	4 µM	0,4 µM
<i>MgCl₂</i>	1,5	25 mM	1,5 mM
<i>Taq polimerase</i>	0,3	5 U/µl	0,06 U/µl

Colocaram-se as amostras no termociclador programado com a sequência apresentada na Tabela 2. Em seguida, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,4% (item 3.2.36).

Tabela 2 - Sequência de temperaturas utilizadas no termo-ciclador, para amplificação de DNA por RAPD.

Passo	Temperatura	Tempo
1	93 °C	3 min.
2	93 °C	1 min.
3*	37 °C	1 min.
4*	72 °C	2 min.
5*	93 °C	1 min.
6	72 °C	7 min.
7	4 °C	indefinido

* Repetiram-se os passos 3-5 durante 40 ciclos

3.14 Eletroforese

Preparou-se o gel em uma cuba de eletroforese. Preparou-se as amostras a serem aplicadas, misturando-se 20 µl de amostra a 5 µl de corante. As amostras, sempre 2 parentais e 9 ou 10 recombinantes, além de um marcador de peso molecular e um controle sem DNA, misturadas ao corante, foram aplicadas ao gel. O marcador de peso

molecular utilizado foi o λ Hind III, que apresenta fragmentos de 23130, 9416, 6551, 4361, 2322, 2027 e 564 pares de bases.

Após a aplicação de todas as amostras procedeu-se a eletroforese do DNA sob voltagem constante de 75 V. As bandas de DNA do gel, corado com brometo de etídio, foram visualizadas sob luz ultravioleta. O gel foi fotografado com filme preto e branco, 50 ASA e filtro laranja. Para possibilitar a medição da distância percorrida por cada fragmento no gel, posicionou-se uma régua paralela à corrida e com o zero na altura das canaletas.

3.15 Análise da eletroforese

Determinou-se a distância percorrida por cada fragmento de DNA do λ Hind III e dos produtos de amplificação de RAPD, e assim pôde-se deduzir o número de pares de bases de cada fragmento. A relação entre o número de pares de bases (n) de um fragmento e a distância por ele percorrida no gel (d , cm) pode ser descrita pela equação (STRYER, 1992)

$$n = e^{\frac{1}{\alpha + \beta d}} \quad (1)$$

onde α e β (cm^{-1}) são os coeficientes de ajuste da equação. A equação 1 pode ser escrita como

$$\frac{1}{\ln(n)} = \alpha + \beta.d \quad (2)$$

e a determinação de α e β para cada eletroforese pode, portanto, ser feita pela regressão linear entre o inverso do logaritmo do número conhecido de pares de bases dos fragmentos do λ Hind III e a distância por eles percorrida. Conhecidos α e β , o número de pares de bases dos produtos de amplificação do RAPD pôde ser calculado pela equação 1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação de redução de colônia

No presente trabalho foram empregadas duas linhagens contrastantes quanto a origem e em função disso houve necessidade de se avaliar alguns parâmetros como condições adequadas de crescimento para ambas. Dessa forma, procurou-se estabelecer a redução do crescimento com desoxicolato de sódio e crescimento em função do pH para estabelecimento de condições ideais para as duas linhagens. Inicialmente também fez-se a determinação do número de núcleos por conídio na linhagem selvagem Est-3, uma vez que dela seriam obtidos mutantes para os próximos passos.

Foram inoculados Est-3 e M nas seguintes concentrações de desoxicolato de sódio em meio completo pH 5,5 : 0,0; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5% e 0,6%. Foram feitas três repetições. A Tabela 3 apresenta os diâmetros das colônias da linhagem Est-3 crescendo em MC com diferentes concentrações de desoxicolato de sódio. Pode-se observar que a melhor redução de colônia foi obtida com 6,0 g/l de desoxicolato de sódio em MC. FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER (1992) obtiveram redução de colônias da linhagem M com 2,0 g/l de desoxicolato de sódio. A Tabela 4 mostra resultados similares aos obtidos para a linhagem M pelas autoras acima citadas.

A substância redutora desoxicolato de sódio tem sido utilizada com sucesso na obtenção de colônias isoladas de espécies do gênero *Trichoderma* (SCHIMENTI et al., 1983; ZALDIVAR et al., 1987 e CARVALHO, 1989), e outros fungos filamentosos (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1977). CARVALHO (1989) analisou o efeito de desoxicolato de sódio sobre o crescimento das colônias, e observou o desenvolvimento micelial e conidiação em *Trichoderma reesei* QM 9414 e *Trichoderma* sp, determinando a utilização de 0,5% de redutor em todos os ensaios. Constatou ainda, que o desoxicolato de sódio atua à nível de metabolismo primário, retardando o desenvolvimento das hifas e a formação dos conídios. Em presença do indutor, observou também a ocorrência de clamidosporos, em *Trichoderma* sp, após 72 horas de incubação.

A linhagem Est-3 de *T. pseudokoningii*, mostrou-se menos sensível ao efeito redutor do desoxicolato de sódio, em comparação com a linhagem M de *T. pseudokoningii*, e aos resultados de CARVALHO (1989). Em outros fungos como *Aspergillus nidulans*, concentrações menores, 0,08%, são suficientes para a obtenção de colônias isoladas (PIZZIRANI, 1977). Em *Humicola* sp, a concentração de 0,12% de desoxicolato de sódio foi capaz de reduzir em 100% o crescimento das colônias (RODRIGUES, 1987).

Tabela 3 - Diâmetro das colônias (mm) da linhagem Est-3 com adição de desoxicolato de sódio ao meio completo, após diferentes intervalos de tempo de crescimento a 28 °C.

concentração de desoxicolato (g/l)	tempo (h)			
	24	48	72	96
0,0	17	69*	90	90*
1,0	2	18*	30	48*
2,0	2	17*	28	43*
3,0	2	15	27*	43*
4,0	1	14	24*	39*
5,0	1	13	20*	33*
6,0	1	12	19*	30*

* = esporulação

Tabela 4 - Diâmetro das colônias (mm) da linhagem M com adição de desoxicolato de sódio ao meio completo, após diferentes intervalos de tempo de crescimento a 28 °C.

concentração de desoxicolato (g/l)	tempo (h)			
	24	48	72	96
0,0	33	86*	90	90*
1,0	5	19*	28*	42*
2,0	4	15*	21*	31*
3,0	3	13	21*	31*
4,0	5	13	18	20*
5,0	3	10	13	16*
6,0	4	9	10	13*

* = esporulação

4.2 Teste com desoxicolato de sódio em diferentes pHs

As linhagens Est-3 e M foram testadas nos pHs 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0 com 0,6% de desoxicolato de sódio em meio completo. A Tabela 5 apresenta os diâmetros das

colônias da linhagem Est-3 em diferentes pHs com 0,6 % de desoxicolato. Pode-se observar que a melhor redução ocorreu a pH 7,0. A Tabela 6 mostra os resultados do mesmo teste com a linhagem M, onde também a melhor redução foi obtida a pH 7,0.

A esporulação (número de esporos/ml) das colônias, tanto da linhagem Est-3 quanto da linhagem M de *T. pseudokoningii* foi medida da seguinte maneira: foi recortado um círculo de 1 cm de diâmetro do meio de cultura das placas contendo o fungo, os esporos deste fragmento foram suspensos em 2,0 ml de Tween-80 (0,1%). A seguir foram feitas diluições seriadas em salina até que se obtivesse uma suspensão com ao redor de 10^6 esporos/ml. A contagem foi feita em câmara de Neubauer (com 25 campos), foram contados 5 campos, o número resultante foi multiplicado por 5×10^4 , para se obter a concentração final de esporos/ml.

Tabela 5 - Diâmetro e esporulação das colônias da linhagem Est-3 em 4 diferentes pHs com adição de desoxicolato de sódio ao meio completo, após diferentes intervalos de tempo de crescimento a 28°C.

Tempo (h)	pH							
	5,5		6,0		6,5		7,0	
	Ø (mm)	Esp.*	Ø (mm)	Esp.	Ø (mm)	Esp.	Ø (mm)	Esp.
60	14	237	10	137	8	27	5	17
84	20	295	18	417	12	362	10	300
108	30	820	25	942	18	1060	12	677
132	35	897	30	1025	25	1305	20	3147

* Número de esporos por ml $\times 10^3$

Tabela 6 - Diâmetro e esporulação das colônias da linhagem M em 4 diferentes pHs com adição de desoxicolato de sódio, ao meio completo, após diferentes intervalos de tempo de crescimento a 28°C.

Tempo (h)	pH							
	5,5		6,0		6,5		7,0	
	Ø (mm)	Esp. *	Ø (mm)	Esp.	Ø (mm)	Esp.	Ø (mm)	Esp.
60	7	2	5	4	5	14	4	2
84	10	367	10	287	5	127	6	260
108	14	1107	12	1022	6	130	8	680
132	17	1195	15	1290	10	910	11	815

* Número de esporos por ml x 10³

Determinou-se então que as condições ideais para obtenção de colônias isoladas da linhagem Est-3 de *T. pseudokoningii*, que seriam importantes no processo de obtenção de mutantes, foram pH 7,0 para o meio de cultura e adição de 0,6% de desoxicolato de sódio a este meio. Também foi verificado que estas condições não afetaram a esporulação das colônias.

4.3 Verificação do número de núcleos por conídio

A partir da avaliação de 1000 conídios de *T. pseudokoningii* Est-3, após coloração pelo método descrito no item 3.4, observou-se uma frequência de 100% de conídios uninucleados. O número de núcleos por conídio é um dado importante em estudos genéticos, pois a obtenção e seleção de mutantes ocorre mais facilmente a partir de conídios uninucleados. FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER (1992) também observaram conídios uninucleados na linhagem M de *T. pseudokoningii*. A Figura 1 mostra a coloração dos núcleos de conídios de *T. pseudokoningii* Est-3.

Figura 1 - Coloração dos núcleos de conídios de *T. pseudokoningii* Est-3, pelo método de Giemsa. Aumento = 1500x.

4.4 Sobrevivência a luz ultravioleta

Suspensões de conídios de *T. pseudokoningii* Est-3 foram irradiados com luz ultravioleta. O melhor tempo foi o de 9 minutos de tratamento permitiu 1% de sobrevivência. FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER (1992), trabalhando com a linhagem M de *T. pseudokoningii*, utilizaram 7 minutos para 5% de sobrevivência. No presente trabalho foi utilizado um tempo maior de exposição, com uma porcentagem menor de sobrevivência devido a baixa taxa de mutação obtida.

O tempo de tratamento utilizado para a linhagem Est-3 de *T. pseudokoningii* foi então superior ao utilizado para a linhagem M da mesma espécie

(FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER, 1992), e também superior àqueles utilizados para *Humicola* sp (RODRIGUES, 1987) e *Aspergillus niger* (GOLDMAN, 1988). Foi ainda superior em relação a outros fungos como *Aspergillus* sp (PEREIRA, 1978), *Metarhizium anisopliae* (BAGAGLI, 1987) e *Beauveria bassiana* (PACCOLA-MEIRELLES, 1988, 1994). A penetração da luz ultravioleta pode ser dificultada pelo fato dos conídios se apresentarem pigmentados (RIFAI, 1969). A luz ultravioleta tem sido utilizada com sucesso na obtenção de mutantes em espécies do gênero *Trichoderma* (WEIMAN-GREENSHPAN & GALUN, 1969; SHIMENTI et al., 1983; TOYAMA et al., 1984; KAWAMORI et al., 1985; NEVALAINEN, 1985 e CARVALHO, 1989).

4.5 Obtenção de mutantes morfológicos e auxotróficos

A partir do fungo selvagem verde foi obtido apenas um mutante morfológico para o caráter cor, sendo este marrom. FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER (1992) obtiveram mutantes morfológicos para cor, com fungo selvagem verde, e mutantes morfológicos brancos e amarelos. GREENSHPAN & GALUN (1971) e CARVALHO (1989) também obtiveram mutantes de coloração branca, amarela e marrom em *T. viride* e *Trichoderma spp*, respectivamente. CASTRO (1982) obteve somente mutante branco a partir de *T. reesei* QM9414.

GREENSHPAN & GALUN (1971), sugeriram que os genes designados W^c , Y^a , Y^b e Br apresentam um papel estrutural seqüencial na biossíntese do pigmento verde em *T. viride*.

Os mutantes auxotróficos simples foram obtidos a partir do mutante marrom (M4), como descrito no item 3.6. A Tabela 7 apresenta os mutantes auxotróficos com uma deficiência simples.

Tabela 7 - Mutantes auxotróficos simples de *T. pseudokoningii* Est-3 obtidos com luz ultravioleta pelo método do isolamento total.

Mutante	Fenótipo
A1	<i>brw[*] pa6</i>
A2	<i>g[*] nic</i>
A3	<i>brw ade</i>
A4	<i>brw met</i>
A5	<i>g pyr</i>

* *brw* = marrom

* *g* = verde

Os símbolos *ade*, *pa6*, *nic*, *pyr*, *met* representam respectivamente deficiências nutricionais para adenina, ácido paraminobenzóico, ácido nicotínico, piridoxina e metionina.

FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER (1992) obtiveram dezenove mutantes auxotróficos simples em *T. pseudokoningii* da linhagem M. As marcas obtidas foram *ade*, *arg*, *leu*, *lis*, *met*, *nic* e *rib* representando respectivamente deficiências nutricionais para adenina, arginina, leucina, lisina, metionina, ácido nicotínico e riboflavina.

Os mutantes auxotróficos duplos foram obtidos como descrito no item 3.6. A Tabela 8 apresenta os mutantes auxotróficos isolados com dupla deficiência.

Tabela 8 - Mutantes auxotróficos duplos de *T. pseudokoningii* Est-3 obtidos com luz ultravioleta pelo método do isolamento total.

Mutante	Fenótipo
A3.1	<i>brw[*] ade arg</i>
A3.2	<i>brw ade leu</i>
A3.3	<i>brw ade nic</i>
A4.1	<i>brw met tia</i>

* *brw* = marrom

Os símbolos *ade*, *arg*, *leu*, *nic*, *met*, *tia* representam respectivamente deficiências nutricionais para adenina, arginina, leucina, ácido nicotínico, metionina e tiamina.

Os mutantes A3.1 e A3.2 foram selecionados para os próximos passos relacionados aos processos de recombinação.

A Figura 2 apresenta um esquema de obtenção dos mutantes de *Trichoderma pseudokoningii* da linhagem Est-3 por isolamento total.

Figura 2 - Esquema de obtenção dos mutantes simples e duplos auxotróficos de *Trichoderma pseudokoningii* da linhagem Est-3 por isolamento total.

FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER (1992) obtiveram dezoito mutantes auxotróficos duplos com *T. pseudokoningii* da linhagem M. As marcas foram as seguintes : *arg rib*, *arg leu*, *leu lis*, *rib ade*, *rib lis*, *rib arg*, *leu tio*, *leu arg*, *leu bio*, *nic ade*, *nic arg*, *nic met*, os símbolos *ade*, *arg*, *bio*, *leu*, *lis*, *met*, *nic*, *rib*, *tio* representam respectivamente deficiências nutricionais para adenina, arginina, biotina, leucina, lisina, metionina, ácido nicotínico, riboflavina e tiosulfato.

A frequência de obtenção de mutantes auxotróficos duplos em *T. pseudokoningii* Est-3 foi de 0,001%, enquanto que FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER (1992) obtiveram uma frequência de 0,01% em *T. pseudokoningii* da linhagem M.

4.6 Teste de reversão

Os mutantes auxotróficos duplos foram ensaiados quanto a reversão de suas marcas, como descrito no item 3.7. A frequência de reversão espontânea foi menor que uma colônia para 10^6 a 10^7 conídios/ml dos mutantes auxotróficos duplos de *T. pseudokoningii* Est-3 (*brw ade leu*, *brw ade arg*, *brw ade nic*). Os resultados demonstram estabilidade genética nos mutantes obtidos, permitindo a utilização destes em técnicas genéticas.

FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER (1992) também obtiveram os mesmos índices de reversão com os mutantes auxotróficos duplos de *T. pseudokoningii* da linhagem M.

4.7 Técnicas genéticas para obtenção de heterocários

Foram feitas tentativas de obtenção de heterocários como descrito no item 3.10. O meio mínimo contendo 4% de meio completo não foi efetivo para a formação de películas heterocarióticas. A linhagem Est-3 *brw ade leu* foi misturada com a linhagem M *whi4 leu bio*, como não houve formação de película e conseqüentemente, de heterocários, utilizou-se a fusão de protoplastos como método alternativo para se obter recombinantes.

FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER (1992) obtiveram recombinantes por fusão de hifas cruzando dois mutantes auxotróficos duplos da linhagem M, tendo sido

observado complementação das marcas auxotróficas e um sistema de regulação não autônomo para a pigmentação dos conídios.

4.8 Protoplastos de *T. pseudokoningii* Est-3

4.8.1 Obtenção e regeneração de protoplastos

A porcentagem de regeneração dos protoplastos da linhagem A3.2 (*brw ade leu*) foi de 6,25% e da linhagem A3.1 (*brw ade arg*) foi de 8,32%. A porcentagem de regeneração da linhagem *whi4 leu bio* foi de 5,84% e da linhagem T35 *g nic met inos arg* foi de 4,25%.

FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER (1992) observaram uma grande variação nas porcentagens de regeneração em mutantes auxotróficos duplos de *T. pseudokoningii* da linhagem M, variando de 0,001% a 14,48%. LAURILA et al.(1985) também observaram diferenças na obtenção e regeneração de protoplastos entre mutantes de *T. reesei*. Os autores atribuíram estes resultados à diferenças morfológicas entre as amostras. Em *Penicillium pinophilum* (BROWN et al., 1986) e em *M. anisopliae* (BAGAGLI, 1987 e VALADARES, 1989) resultados semelhantes foram obtidos.

O estabilizador osmótico $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi eficiente para a obtenção e regeneração de protoplastos de *T. pseudokoningii*, como observado anteriormente por FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER (1992), o que condiz com o observado por MELO & HEALE (1989). Tal estabilizador também foi efetivo para *T. reesei* (BENITEZ et al., 1975 e PICATAGGIO et al., 1983).

4.8.2 Fusão de protoplastos

Protoplastos dos mutantes *brw ade arg* e *whi4 leu bio* foram fusionados com PEG, como descrito no item 3.9. Os possíveis produtos de fusão foram semeados em MC + (NH₄)₂SO₄, MM + (NH₄)₂SO₄ e MM + (NH₄)₂SO₄ com complementação combinada das marcas auxotróficas parentais. A Tabela 9 mostra a contagem de colônias obtidas nos diferentes meios seletivos.

Tabela 9 - Média da contagem de colônias obtidas por placa de *brw ade arg* + *whi4 leu bio*, via fusão de protoplastos em diferentes meios seletivos.

Meios seletivos	Contagem
MM	0
MM + <i>ade leu</i>	45,8
MM + <i>ade bio</i>	41,0
MM + <i>arg leu</i>	24,1
MM + <i>arg bio</i>	20,8

Procedendo-se a análise genética de 500 colônias, obtidas diretamente dos produtos de fusão, nos diferentes meios seletivos, pode-se observar uma baixa frequência de tipos recombinantes (Tabela 10). Tais resultados sugerem a ocorrência de baixa frequência de recombinação mitótica. Ao contrário, FURLANETO E PIZZIRANI-KLEINER (1992) observaram uma baixa frequência de tipos parentais, o que sugere a ocorrência de alta frequência de recombinação mitótica.

Tabela 10 - Números e frequências de produtos recombinantes e parentais em 500 colônias analisadas quanto às marcas, obtidos no cruzamento *whi4 leu bio* + *brw ade arg* via fusão de protoplastos.

Marcadores genéticos	Número observado	Frequência (%)
<i>brw ade</i>	15	3
<i>whi leu</i>	20	4
<i>brw ade arg</i>	280	56
<i>whi leu bio</i>	185	37

Protoplastos dos mutantes *brw ade leu* e T35 *g nic met inos arg* foram fusionados com PEG, como descrito no item 3.9. Os possíveis produtos de fusão foram semeados em MC + (NH₄)₂SO₄, MM + (NH₄)₂SO₄ e MM + (NH₄)₂SO₄ com complementação combinada das marcas auxotróficas parentais. A Tabela 11 mostra a contagem de colônias obtidas nos diferentes meios seletivos.

Tabela 11 - Média da contagem de colônias obtidas por placa de *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg*, via fusão de protoplastos em diferentes meios seletivos.

Meios seletivos	Contagem
MM	0
MM + <i>ade nic met inos</i>	23,4
MM + <i>ade nic met arg</i>	34,1
MM + <i>ade nic inos arg</i>	23,4
MM + <i>ade met inos arg</i>	23,6
MM + <i>leu nic met inos</i>	25,4
MM + <i>leu nic met arg</i>	26,2
MM + <i>leu nic inos arg</i>	24,4
MM + <i>leu met inos arg</i>	28,6

Procedendo-se a análise genética de 500 colônias, obtidas diretamente dos produtos de fusão, nos diferentes meios seletivos, pode-se observar uma baixa frequência de tipos recombinantes (Tabela 12). Tais resultados sugerem a ocorrência de baixa frequência de recombinação mitótica.

Tabela 12 - Números e frequências de produtos recombinantes e parentais em 500 colônias analisadas quanto às marcas, obtidos no cruzamento *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* via fusão de protoplastos.

Marcadores genéticos	Número observado	Frequência (%)
<i>brw ade leu arg</i>	4	0,8
<i>brw ade leu nic</i>	6	1,2
<i>brw ade leu</i>	285	57
<i>g nic met inos arg</i>	205	41

Figura 3 - Linhagens selvagens Est-3 e M, e respectivos mutantes utilizados nos cruzamentos via fusão de protoplastos. a = linhagem selvagem M, b = T35 *g nic met inos arg*, c = *whi4 leu bio*, d = Est-3 e e = *brw ade leu*.

A Figura 3 mostra uma foto das linhagens selvagens e os respectivos mutantes utilizados nos cruzamentos via fusão de protoplastos. O mutante *brw ade arg* não está representado porque é morfologicamente idêntico ao mutante *brw ade leu*.

4.9 Análise dos recombinantes por RAPD

Anterior à análise dos recombinantes por RAPD determinou-se as concentrações ótimas de DNA e $MgCl_2$. Foram testadas as seguintes concentrações de DNA : 20, 40, 60, 80 e 100 ng, sendo que a melhor foi de 40 ng. As concentrações de $MgCl_2$ ensaiadas foram 1,5 ; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; e 5,0 mM, sendo que a melhor foi a de 3,0 mM.

Em seguida foi feita uma seleção de primers. Entre os primers E_1 a E_{20} selecionou-se os seguintes: E_2 , E_3 , E_4 , E_7 , E_{14} , E_{15} , E_{17} , E_{18} , E_{19} e E_{20} . A sequência e massa molecular destes primers encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 - Sequência e massa molecular dos primers, utilizados para amplificar DNA das linhagens parentais e recombinantes por RAPD.

primer	seqüência	massa molecular (u)
E_2	GGTGCGGGAA	3124
E_3	CCAGATGCAC	2988
E_4	GTGACATGCC	3019
E_7	AGATGCAGCC	3028
E_{14}	TGCGGCTGAG	3075
E_{15}	ACGCACAACC	2957
E_{17}	CTACTGCCGT	2970
E_{18}	GGACTGCAGA	3068
E_{19}	ACGGCGTATG	3059
E_{20}	AACGGTGACC	3028

Para verificar se os mutantes eram similares aos selvagens com relação aos padrões RAPD, foi feito um teste destes com três primers, e foi verificado que os mutantes e os respectivos parentais têm padrões de RAPD idênticos.

Foi feita a análise RAPD dos recombinantes e parentais de dois cruzamentos, via fusão de protoplastos. O primeiro cruzamento, denominado “cruzamento 1”, envolveu os parentais *brw ade arg* (P1) e *whi4 leu bio* (P2). Nas Figuras 4 a 10 são mostrados os resultados deste cruzamento. O segundo cruzamento, denominado “cruzamento 2”, envolveu os parentais *brw ade leu* (P1) e T35 *g nic met inos arg* (P2), cujos resultados são apresentados nas Figuras 11 a 20. Nestas Figuras (4 a 20), os números 1 e 2 referem-se aos parentais 1 e 2, respectivamente. Os números 3 a 12 representam os recombinantes, que nesta discussão são denominados *R1* a *R10*. Número 13 é o controle e número 14 é o marcador λ Hind III.

Os valores de α e β da equação 1, calculados conforme item 3.15, bem como os coeficientes de determinação das regressões (r^2) estão na Tabela 14. Conhecidos os valores de α e β , o número de pares de bases de outras bandas na mesma eletroforese foi calculado com base na distância percorrida pela equação 1. Na Tabela 15 apresentam-se os valores assim calculados para os números de pares de bases dos fragmentos produzidos nos parentais dos cruzamentos 1 (*brw ade arg* + *whi4 leu bio*) e 2 (*brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg*) com os diferentes primers.

Tabela 14 - Valores de α e β (equação 1), bem como os coeficientes de determinação das regressões (r^2) para as eletroforeses realizadas.

cruza- mento	primer	α	β (cm ⁻¹)	r^2
1	E ₂	0,09101	0,01202	0,887
2	E ₂	0,08160	0,01409	0,912
1	E ₃	0,08367	0,01170	0,869
2	E ₃	0,08852	0,01192	0,946
1	E ₄	0,08814	0,01094	0,913
2	E ₄	0,09657	0,00871	0,931
1	E ₇	0,08842	0,01231	0,882
2	E ₇	0,08321	0,01396	0,920
2	E ₁₄	0,08989	0,01113	0,914
2	E ₁₅	0,09452	0,00755	0,920
2	E ₁₇	0,08357	0,01152	0,889
1	E ₁₈	0,09361	0,01214	0,884
2	E ₁₈	0,09835	0,00866	0,911
1	E ₁₉	0,09808	0,00747	0,933
2	E ₁₉	0,09693	0,00809	0,900
1	E ₂₀	0,09610	0,00850	0,910
2	E ₂₀	0,09905	0,00897	0,895

Comparando os dois cruzamentos amplificados com o mesmo primer, observa-se na Tabela 15 que, em alguns casos, há grande discrepância entre os números de pares de bases dos *P1* e *P2*. No caso do primer E₃, por exemplo, os números de *P1* do cruzamento 1 são em torno de duas vezes maiores que os do cruzamento 2. Para o primer E₁₈, a diferença chega a ser da ordem de três vezes. Pode-se atribuir estes erros em primeiro lugar à imprecisão na leitura. Da equação 1 deduz-se que a derivada do número de pares de bases em relação à distância percorrida ($\partial n / \partial d$, cm⁻¹) é função do número de pares de bases e do coeficiente β , pela seguinte equação:

$$\frac{\partial n}{\partial d} = -\beta \cdot n \cdot \ln^2(n) \quad (3)$$

Tabela 15 - Número de pares de bases dos fragmentos gerados pelo RAPD nos dois parentais (p) dos cruzamentos 1 e 2 com os diferentes primers.

cruza- mento	primer	p	fragmento																	
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	M	N	O	P	Q	R	S
1	E ₂	PI			1965	1174	1043	931	749	554										
		P2			1505	1327	985	711	554											
2	E ₂	PI	5795	3872	2258	1134		926	677	481										
		P2	3872	3209	2681	1636	1307	989	638	481										
1	E ₃	PI			4180	2453		1636	1442		958	549	386	342	293					
		P2	3856		1992	1745	1535	1356		774	501									
2	E ₃	PI	3378	3125	2163	1281	1072	769	694	627	494		194							
		P2	3378	3125	2163		1281	1072		627	518		194	138						
1	E ₄	PI	2725		1963	1539	1295	1225	1042	808	534	242								
		P2	3897	2920	2382	2092	1539	1371		939	700	534	434							
2	E ₄	PI	3267	2919	2617	2121	1825	1738	1507	1256	896	422	264							
		P2	4132		2919	2617	2121	1917	1438	1102	896	340	287	271						
1	E ₇	PI			2696		1629	1256	986	879	453	363								
		P2		6315	3418	1524	1338	1046	786		453	395	347	243						
2	E ₇	PI	3560	2966	2289	1540	1238	1007	733	650		241	163							
		P2	7241	5839	2716	1154	1007	829	580	548	329	274	163							
1	E ₁₈	PI	3743	2036	1454	1205					652		225							
		P2	3186		1551	1068	805													
2	E ₁₈	PI	7956	5331	4162	3294	2788	2142	1390	1216		1116	907	776	644	578				
		P2	6483	5685	4422	2788	2142	1674	1329	907	367									
1	E ₁₉	PI		4236		3291	2987	2848	2368	1902		1271	1136	1056		855	773	658		361
		P2			4968	4464	3822		2368	1902	1749	1546					885	424		
2	E ₁₉	PI	7607	5405	4534	3627		3091	2788	2651	2286		1514	1389	1278			722	589	534
		P2	8390	6491	6101	5093	4283	3831	2935	2078	1652	1278	1177	1087	1045	864	803	697	457	
1	E ₂₀	PI	6471	5340				3146		1971		1245		828		520				
		P2	7391	5688	4186	3146	2822		2289	1877		1420	1245	828		617	538	472		
2	E ₂₀	PI	5509	4532	3541	3146	2970	2652	2252	2026	1829	1502	1245	1138	780	555	517	319		
		P2	6306	4532	3541	2652	2376	2252	2026	1739	1502	1304	1089	780	721	555	517			
2	E ₁₄	PI	3335	2059	1509	1382	916	566	420	373	332	268	234							
		P2	4894	3335	2888	1931	1704	1509	1382	1268	965	787	749	496	388	345				
2	E ₁₅	PI	4111	3191	2761	2194	1923	1559	1230	1022	724	486								
		P2	6027	4570	3903	3039	2295	1842	1693	1625	1497	886	486							
2	E ₁₇	PI	5613	4034	3200	2395	1263	952	550											
		P2	1513	1006	856	698	550	481	319											

Como exemplo da aplicação da equação (3), apresenta-se na Tabela 16 qual o erro no cálculo do número de pares de bases ao se errar 1 mm na leitura da posição da banda, calculado pela equação (3) para alguns valores de n , considerando $\beta = 0,01 \text{ cm}^{-1}$. Este erro pode se propagar, pois ocorre tanto na medição da distância percorrida pelos fragmentos do λ Hind III quanto pelos produtos de amplificação. Observa-se que o erro para valores grandes de n é muito maior, e mesmo em números

relativos ele cresce com o aumento de n . Como isto não acontece, sistematicamente, nos desvios encontrados na Tabela 15, onde o erro relativo dos fragmentos maiores dos produtos de amplificação tende a ser menor em vez de maior, ao que parece, não foi esse o único tipo de erro que causou tais discrepâncias.

Uma fonte alternativa de erros está na medição da distância percorrida pelos fragmentos do marcador molecular λ Hind III. Em alguns casos, nem todas as suas bandas apareceram com nitidez no gel, tendo-se dificuldade em identificar todas as sete bandas, em especial a menor, de 564 pb. Nestes casos, perdeu-se significância da regressão e as bandas menores que 2027 pb foram calculados por extrapolação.

Tabela 16 - Erro no cálculo do número de pares de bases ao se errar 1 mm na leitura da posição da banda, calculado pela equação (3) para alguns valores de n , considerando $\beta = 0,01 \text{ cm}^{-1}$

n	$\partial n / \partial d (\text{mm}^{-1})$	%
100	-2	2,1
300	-10	3,3
1000	-48	4,8
3000	-192	6,4
10000	-848	8,5

Pode-se observar pela Figura 4 que com o primer E_2 foram amplificados 6 fragmentos no parental *brw ade arg* e 5 fragmentos no parental *whi4 leu bio*, sendo 10 polimórficos e 1 monomórfico. Nos recombinantes $R4$ e $R5$ (*brw ade*) não foi amplificado um fragmento de 749 pb, presente no parental *brw ade arg*. Nos recombinantes $R6$ e $R8$ (*whi leu*) não foram amplificados os fragmentos de 711 pb e 554 pb, ambos presentes no parental *whi4 leu bio*. No recombinante $R7$ (*whi leu*) não foi amplificado um fragmento de 711 pb e no $R10$ (*whi leu*) um de 554 pb, ambos presentes no parental *whi4 leu bio*. Nestes casos ocorreu ausência de determinadas bandas (fragmentos) parentais em alguns recombinantes.

(a)

(b)

Figura 4 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₂ dos parentais *brw ade arg* + *whi4 leu bio* (cruzamento 1) e seus segregantes *brw ade* e *whi leu*. 1 = *brw ade arg*, 2 = *whi4 leu bio*, 3 a 7 = *brw ade*, 8 a 12 = *whi leu*, 13 = controle e 14 = λ Hind III.

(a)

(b)

Figura 5 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₃ dos parentais *brw ade arg* + *whi4 leu bio* (cruzamento 1) e seus segregantes *brw ade* e *whi leu*. 1 = *brw ade arg*, 2 = *whi4 leu bio*, 3 a 7 = *brw ade*, 8 a 12 = *whi leu*, 13 = controle e 14 = λ Hind III.

(a)

(b)

Figura 6 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E_4 dos parentais *brw ade arg* + *whi4 leu bio* (cruzamento 1) e seus segregantes *brw ade* e *whi leu*. 1 = *brw ade arg*, 2 = *whi4 leu bio*, 3 a 7 = *brw ade*, 8 a 12 = *whi leu*, 13 = controle e 14 = λ Hind III.

(a)

(b)

Figura 7 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₇ dos parentais *brw ade arg* + *whi4 leu bio* (cruzamento 1) e seus segregantes *brw ade* e *whi leu*. 1 = *brw ade arg*, 2 = *whi4 leu bio*, 3 a 7 = *brw ade*, 8 a 12 = *whi leu*, 13 = controle e 14 = λ Hind III.

Figura 8 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₁₈ dos parentais *brw ade arg* + *whi4 leu bio* (cruzamento 1) e seus segregantes *brw ade* e *whi leu*. 1 = *brw ade arg*, 2 = *whi4 leu bio*, 3 a 7 = *brw ade*, 8 a 12 = *whi leu*, 13 = controle e 14 = λ Hind III.

Figura 9 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₁₉ dos parentais *brw ade arg* + *whi4 leu bio* (cruzamento 1) e seus segregantes *brw ade* e *whi leu*. 1 = *brw ade arg*, 2 = *whi4 leu bio*, 3 a 7 = *brw ade*, 8 a 12 = *whi leu*, 13 = controle e 14 = λ Hind III.

Figura 10 -Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₂₀ dos parentais *brw ade arg* + *whi4 leu bio* (cruzamento 1) e seus segregantes *brw ade* e *whi leu*. 1 = *brw ade arg*, 2 = *whi4 leu bio*, 3 a 7 = *brw ade*, 8 a 12 = *whi leu*, 13 = controle e 14 = λ Hind III.

Na Figura 5 pode-se observar que com o primer E₃ foram amplificados 9 fragmentos no parental *brw ade leu* e 7 fragmentos no parental *whi4 leu bio*, sendo que todos são polimórficos. Nos recombinantes *R6*, *R7*, *R8* e *R9* (*whi leu*) foi amplificado um fragmento de 4180 pb, presente no parental *brw ade arg*. Nos recombinantes *R6* a *R10* (*whi leu*) foi amplificado um fragmento de 1636 pb, presente também no parental *brw ade arg*. Nestes dois casos temos uma mistura de bandas parentais nos recombinantes.

Observa-se na Figura 6 que com o primer E₄ foram amplificados 9 fragmentos no parental *brw ade arg* e 10 no parental *whi4 leu bio*, sendo 15 polimórficos e 2 monomórficos. No recombinante *R9* (*whi leu*) não foi amplificado um fragmento de 534 pb, presente no parental *whi4 leu bio*. Nos recombinantes *R7*, *R9* e *R10* não foi amplificado um fragmento de 434 pb, também presente no parental *whi4 leu bio*. Nestes dois casos tem-se ausência de bandas parentais nos recombinantes.

A Figura 7 mostra que com o primer E₇ ocorreu amplificação de 7 fragmentos no parental *brw ade arg* e 10 fragmentos no parental *whi4 leu bio*, sendo 15 polimórficos e 1 monomórfico. No recombinante *R6* (*whi leu*) não foram amplificados os fragmentos de 3418 pb e de 453 pb, ambos presentes no parental *whi4 leu bio*. Nos recombinantes *R7*, *R9* e *R10* não foram amplificados os fragmentos de 347 pb e de 243 pb, também presentes no parental *whi4 leu bio*. Nestes casos tem-se novamente ausência de bandas parentais nos recombinantes.

Conforme pode ser observado pela Figura 8, com o primer E₁₈ foram amplificados 6 fragmentos no parental *brw ade arg* e 4 fragmentos no parental *whi4 leu bio*, sendo os 10 polimórficos. Nos recombinantes *R7*, *R8*, *R9* e *R10* (*whi leu*) foram amplificados os fragmentos de 2036 pb e de 652 pb, ambos presentes no parental *brw ade arg*. No recombinante *R6* (*whi leu*) não ocorreu a amplificação de um fragmento de

1551 pb, presente no parental *whi4 leu bio*. Nos recombinantes *R6*, *R7*, *R8*, *R9* e *R10* foi amplificado um fragmento de 850 pb que não está presente em nenhum dos parentais. Os recombinantes *R8* e *R9* apresentaram uma banda não parental de 535 pb, e o recombinante *R7* apresentou uma banda não parental de 292 pb. Nos recombinantes *R6* e *R7* (*whi leu*) ocorreu a amplificação de um fragmento de 225 pb, presente no parental *brw ade arg*. Neste caso ocorreu mistura de bandas parentais nos recombinantes, ausência de banda parental nos recombinantes e aparecimento de bandas não parentais nos recombinantes.

Na Figura 9 observa-se que com o primer E₁₉ foram amplificados 14 fragmentos no parental *brw ade arg* e 9 fragmentos no parental *whi4 leu bio*, sendo 19 polimórficos e 2 monomórficos. No recombinante *R5* não foi amplificado nenhum fragmento, devido a uma eventual falha técnica. Neste caso os recombinantes *R1*, *R2*, *R3* e *R4* (*brw ade*) têm o mesmo padrão de RAPD que o parental *brw ade arg*, e os recombinantes *R6*, *R7*, *R8*, *R9* e *R10* (*whi leu*) têm o mesmo padrão de RAPD que o parental *whi4 leu bio*.

Pode-se observar na Figura 10 que com o primer E₂₀ foram amplificados 7 fragmentos no parental *brw ade arg* e 13 fragmentos no parental *whi4 leu bio*, sendo 14 polimórficos e 3 monomórficos. Os recombinantes *R1*, *R2*, *R3*, *R4* e *R5* têm o mesmo padrão de RAPD que o parental *brw ade arg* e os recombinantes *R6*, *R7*, *R8*, *R9* e *R10* têm o mesmo padrão de RAPD que o parental *whi4 leu bio*.

Neste cruzamento foram obtidos, com os sete primers utilizados, 46 (66,6%) padrões de RAPD nos recombinantes idênticos ao do parental com o qual havia maior similaridade genética (recombinantes *brw ade* com *brw ade leu* e *whi leu* com *whi4 leu bio*). Em 8 (11,6%) dos padrões ocorreu falta de uma banda e em 10 (14,5%) de duas bandas do parental com maior similaridade genética. Em 3 (4,3%) padrões uma banda do

parental sem similaridade genética aparente estava presente. Seis (8,7%) padrões de recombinantes apresentaram bandas não parentais. Um (1,4%) recombinante apresentou simultaneamente falta de banda do parental com maior similaridade genética e banda não parental. Em 4 (5,7%) padrões de recombinantes ocorreram simultaneamente bandas não parentais e bandas do parental sem similaridade genética aparente. Um (1,4%) recombinante apresentou um padrão que continha banda não parental, falta de banda do parental com maior similaridade genética e presença de banda do parental sem similaridade genética aparente, simultaneamente. De 120 bandas amplificadas, 4 (3,3%) eram bandas não parentais, 9 (7,5%) estavam ausentes em alguns recombinantes e presentes nos respectivos parentais com maior similaridade genética e, 5 (4,2%) estavam presentes em recombinantes e parentais sem similaridade genética aparente. Portanto, um total de 18 (15%) das bandas amplificadas apresentaram alguma alteração.

Na Figura 11 observa-se que com o primer E₂ foram amplificados 7 fragmentos no parental *brw ade leu* e 8 no parental T35 *g nic met inos arg*, sendo 11 polimórficos e 2 monomórficos. Os dez recombinantes (*R1*, *R2*, *R3*, e *R8* = *brw ade leu arg* e *R4*, *R5*, *R6*, *R7*, *R9* e *R10* = *brw ade leu nic*) apresentaram padrão RAPD idêntico ao do parental *brw ade leu*.

A Figura 12 mostra que com o primer E₃ foram amplificados 10 fragmentos no parental *brw ade leu* e 9 no parental T35 *g nic met inos arg*, sendo 5 polimórficos e 7 monomórficos. Os nove recombinantes (*R1*, *R2*, *R3*, e *R8* = *brw ade leu arg* e *R4*, *R5*, *R6*, *R7* e *R9* = *brw ade leu nic*) apresentaram padrão RAPD idêntico ao do parental *brw ade leu*.

(a)

(b)

Figura 11 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₂ dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*. 1 = *brw ade leu*, 2 = T35 *g nic met inos arg*, 3,4,5 e 10 = *brw ade leu arg*, 6,7,8,9,11 e 12 = *brw ade leu nic*, 13 = controle e 14 = λ Hind III.

(a)

(b)

Figura 12 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₃ dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*. 1 = *brw ade leu*, 2 = T35 *g nic met inos arg*, 3,4,5 e 10 = *brw ade leu arg*, 6,7,8,9 e 11 = *brw ade leu nic*, 13 = controle e 14 = λ Hind III.

(a)

(b)

Figura 13 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₄ dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*. 1 = *brw ade leu*, 2 = T35 *g nic met inos arg*, 3,4,5 e 10 = *brw ade leu arg*, 6,7,8,9,11 e 12 = *brw ade leu nic*, 13 = controle e 14 = λ Hind III.

(a)

(b)

Figura 14 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₇ dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*. 1 = *brw ade leu*, 2 = T35 *g nic met inos arg*, 3,4,5 e 10 = *brw ade leu arg*, 6,7,8,9 e 11 = *brw ade leu nic*, 13 = controle e 14 = λ Hind III.

(a)

(b)

Figura 15 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E_{14} dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*. 1 = *brw ade leu*, 2 = T35 *g nic met inos arg*, 3,4,5 e 10 = *brw ade leu arg*, 6,7,8,9 e 11 = *brw ade leu nic*, 13 = controle e 14 = λ Hind III.

(a)

(b)

Figura 16 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₁₅ dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*. 1 = *brw ade leu*, 2 = T35 *g nic met inos arg*, 3,4,5 e 10 = *brw ade leu arg*, 6,7,8,9 e 11 = *brw ade leu nic*, 13 = controle e 14 = λ Hind III.

(a)

(b)

Figura 17 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₁₇ dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*. 1 = *brw ade leu*, 2 = T35 *g nic met inos arg*, 3,4,5 e 10 = *brw ade leu arg*, 6,7,8,9 e 11 = *brw ade leu nic*, 13 = controle e 14 = λ Hind III.

(a)

(b)

Figura 18 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E_{18} dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*. 1 = *brw ade leu*, 2 = T35 *g nic met inos arg*, 3,4,5 e 10 = *brw ade leu arg*, 6,7,8,9 e 11 = *brw ade leu nic*, 13 = controle e 14 = λ Hind III.

(a)

(b)

Figura 19 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₁₉ dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*. 1 = *brw ade leu*, 2 = T35 *g nic met inos arg*, 3,4,5 e 10 = *brw ade leu arg*, 6,7,8,9 e 11 = *brw ade leu nic*, 12 = controle e 13 = λ Hind III.

Figura 20 - Foto (a) e diagrama (b) do RAPD com primer E₂₀ dos parentais *brw ade leu* + T35 *g nic met inos arg* (cruzamento 2) e seus segregantes *brw ade leu arg* e *brw ade leu nic*. 1 = *brw ade leu*, 2 = T35 *g nic met inos arg*, 3,4,5 e 10 = *brw ade leu arg*, 6,7,8,9 e 11 = *brw ade leu nic*, 12 = controle e 13 = λ Hind III.

Pode-se observar na Figura 13 que com o primer E₄ foram amplificados 11 fragmentos no parental *brw ade leu* e 11 no parental T35 *g nic met inos arg*, sendo 14 polimórficos e 4 monomórficos. Nove recombinantes (*R1, R2, R3, e R8 = brw ade leu arg* e *R4, R6, R7, R9 e R10 = brw ade leu nic*) apresentaram padrão RAPD idêntico ao do parental *brw ade leu*. No recombinante *R5 (brw ade leu nic)* não foram amplificados os fragmentos de 1507 pb e de 1256 pb, ambos presentes no parental *brw ade leu*.

Observa-se na Figura 14 que com o primer E₇ foram amplificados 10 fragmentos no parental *brw ade leu* e 11 no parental T35 *g nic met inos arg*, sendo 17 polimórficos e 2 monomórficos. Quatro recombinantes (*R1 e R8 = brw ade leu arg* e *R5 e R6 = brw ade leu nic*) apresentaram padrão RAPD idêntico ao do parental *brw ade leu*. Os outros cinco recombinantes (*R2 e R3 = brw ade leu arg* e *R4, R7 e R9 = ade leu nic*) apresentaram uma banda não parental de 300 pb.

Conforme observa-se na Figura 15, com o primer E₁₄ foram amplificados 11 fragmentos no parental *brw ade leu* e 14 no parental T35 *g nic met inos arg*, sendo 19 polimórficos e 3 monomórficos. Os nove recombinantes (*R1, R2, R3, e R8 = brw ade leu arg* e *R4, R5, R6, R7 e R9 = brw ade leu nic*) apresentaram padrão RAPD idêntico ao do parental *brw ade leu*.

Na Figura 16 observa-se que com o primer E₁₅ foram amplificados 10 fragmentos no parental *brw ade leu* e 11 no parental T35 *g nic met inos arg*, sendo 19 polimórficos e 1 monomórficos. Sete recombinantes (*R1, R2, e R8 = brw ade leu arg* e *R5, R6, R7 e R9 = brw ade leu nic*) apresentaram padrão RAPD idêntico ao do parental *brw ade leu*. Nos recombinantes *R3 (brw ade leu arg)* e *R4 (brw ade leu nic)* não foram amplificados os fragmentos de 4111 pb e de 2761 pb, ambos presentes no parental *brw ade leu*.

Pela Figura 17 pode-se observar que com o primer E₁₇ foram amplificados 7 fragmentos no parental *brw ade leu* e 7 no parental T35 *g nic met inos arg*, sendo 12 polimórficos e 1 monomórfico. Nos recombinantes R2, R3 e R8 (*brw ade leu arg*) e R4, R5, R6 e R7 (*brw ade leu nic*) foi amplificado um fragmento de 698 pb, presente no parental T35 *g nic met inos arg*. Nos recombinantes R1, R3, R8 (*brw ade leu arg*), R4, R7 e R9 (*brw ade leu nic*) foi amplificado um fragmento de 441 pb, que não estava presente em nenhum dos parentais.

Na Figura 18 observa-se que com o primer E₁₈ foram amplificados 13 fragmentos no parental *brw ade leu* e 9 no parental T35 *g nic met inos arg*, sendo 16 polimórficos e 3 monomórficos. Oito recombinantes (R1, R2, R3, e R8 = *brw ade leu arg* e R4, R6, R7, R9 e R10 = *brw ade leu nic*) apresentaram padrão RAPD idêntico ao do parental *brw ade leu*. O recombinante R5 (*brw ade leu nic*) apresentou uma banda não parental de 402 pb.

A Figura 19 mostra que com o primer E₁₉ foram amplificados 14 fragmentos no parental *brw ade leu* e 17 no parental T35 *g nic met inos arg*, sendo 29 polimórficos e 1 monomórfico. Nos nove recombinantes (R1, R2, R3, e R8 = *brw ade leu arg* e R4, R5, R6, R7, R9 e R10 = *brw ade leu nic*) foram amplificados os fragmentos de 8390 pb e de 803 pb, ambos presentes no parental T35 *g nic met inos arg*, e não foi amplificado um fragmento de 7607 pb presente no parental *brw ade leu*. Nos recombinantes R4 e R5 (*brw ade leu nic*) não foi amplificado um fragmento de 4534 pb, presente no parental *brw ade leu*. No recombinante R8 não foram amplificados os fragmentos de 1514 pb e de 589 pb, ambos presentes no parental *brw ade leu*.

Na Figura 20 pode-se observar que com o primer E₂₀ foram amplificados 16 fragmentos no parental *brw ade leu* e 15 no parental T35 *g nic met inos arg*, sendo 13 polimórficos e 9 monomórficos. Os dez recombinantes (R1, R2, R3, e R8 = *brw ade leu arg*

e *R4, R5, R6, R7, R9 e R10 = brw ade leu nic*) apresentaram padrão RAPD idêntico ao do parental *brw ade leu*.

Nos parentais do cruzamento *brw ade leu + T35 g nic met inos arg* os 10 primers utilizados produziram um total de 221 bandas (109 no parental *brw ade leu* e 112 no parental *T35 g nic met inos arg*). Destas 155 foram polimórficas e 33 monomórficas. Em média cada primer produziu 11 bandas em cada parental, sendo que em média 8 eram polimórficas e 3 monomórficas.

Neste segundo cruzamento, com os dez primers utilizados foram produzidos 67 (72,8%) padrões nos recombinantes idênticos ao do parental com maior similaridade genética (*brw ade leu arg* e *brw ade leu nic* com *brw ade leu*). Seis (6,5%) padrões não apresentaram uma banda, 5 (5,4%) duas bandas e 1 (1,1%) três bandas do parental com maior similaridade genética. Em dois (2,2%) padrões apareceu uma banda e em nove (9,8%) duas bandas que estavam presentes no parental com menor similaridade genética (*T35 g nic met inos arg*). Em um total de 224 bandas produzidas, 8 (3,6%) estavam ausentes em alguns recombinantes e presentes no parental com maior similaridade genética, 3 (1,3%) estavam presentes em alguns recombinantes e no parental com menor similaridade genética, e 3 (1,3%) eram bandas não parentais. Neste caso 6,25% das bandas apresentaram alguma anormalidade.

Os fenômenos observados na análise RAPD dos cruzamentos 1 (*brw ade arg + whi4 leu bio*) e 2 (*brw ade leu + T35 g nic met inos arg*) já foram relatados na literatura. Segue-se uma abordagem destes relatos e sua correlação com o trabalho aqui apresentado.

VARGA & CROFT (1994) utilizaram primers decâmeros randômicos para amplificar DNA dos parentais de *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus quadrilineatus* e seus segregantes com substituição cromossômica. Os resultados da análise RAPD das

linhagens parentais e dos segregantes tornaram possível localizar seqüências amplificadas de vários cromossomos de *A. nidulans* e *A. quadrilineatus*. Por exemplo, com o primer OPC-02 foram observadas duas bandas fortes no gel. Uma banda de 420 pb estava presente no padrão de *A. nidulans* e estava ausente em três dos segregantes (1, 12 e 15), que carregavam os cromossomos de *A. quadrilineatus* correspondentes aos grupos de ligação I, I + II e I + V, respectivamente, de *A. nidulans*. Esta seqüência de DNA está localizada no cromossomo I de *A. nidulans* (VARGA & CROFT, 1994). Neste caso então, pode-se correlacionar a ausência de uma banda parental com a ausência do respectivo grupo de ligação.

FRANCIS & CLAIR (1993) usaram marcadores RAPD para confirmar que o cruzamento pode ocorrer entre isolados de *Pythium ultimum*, um oomiceto homotático. Marcadores genéticos baseados em RAPD foram usados para distinguir isolados em uma coleção de *P. ultimum*. Dois isolados que desempenharam um alto nível de polimorfismo foram misturados e colocados sobre um meio que permite o desenvolvimento do estágio sexual. Os marcadores RAPD foram usados para selecionar progênes monospóricas a fim de se identificar híbridos potenciais entre os dois isolados parentais. Após a autofertilização de um suposto F₁, foi originada uma população F₂ que apresentou segregação e distribuição independente de marcadores RAPD. Estes resultados sugerem que outros oomicetos homotáticos podem ser capazes de cruzar, e podem se reproduzir sexuadamente, desempenhando um papel importante na geração de variabilidade em oomicetos homotáticos (FRANCIS & CLAIR, 1993).

ARNAU et al. (1994) observaram um alto grau de recombinação durante o ciclo parassexual em *Cladosporium fulvum* utilizando marcadores de RAPD. A análise da herança de seqüências transformantes presentes em uma das linhagens parentais mostrou um alto grau de rearranjo da seqüência, e uma porcentagem surpreendentemente alta de

progênie contendo a seqüência. Foram obtidas progênies que apresentavam todas as combinações possíveis de RAPDs, indicando um alto nível de recombinação ou rearranjo (ARNAU et al., 1994).

DURAND et al. (1993) também observaram segregantes que foram caracterizados por um rearranjo dos marcadores genéticos parentais em recombinantes de *Penicillium roqueforti*, utilizando marcadores RAPD.

A formação de heteroduplex entre produtos alélicos de RAPD no trabalho de AYLIFFE e colaboradores (1994), que usaram primers decâmeros de seqüências randômicas para amplificar bandas de RAPD de DNA genômico de uma linhagem F₁ de ferrugem de linho (*Melampsora lini*) e suas duas linhagens parentais, foi responsável pela identificação de bandas não parentais. A observação deste fenômeno não deve ser muito freqüente, pois vários critérios devem reunir-se para viabilizar a formação de uma molécula heteroduplex. Primeiro, em geral, marcas RAPD são dominantes e apenas raramente são seqüências alélicas de diferentes comprimentos amplificadas para produzir marcadores codominantes (WILLIAMS et al., 1990), diminuindo a probabilidade de formação de heteroduplex. Para que uma molécula heteroduplex seja observável deve ser derivada de produtos de amplificação relativamente abundantes, uma vez que o heteroduplex é formado de apenas uma proporção destes produtos. Além disso, a molécula heteroduplex deve ter uma mobilidade eletroforética alterada em relação às seqüências alélicas das quais ela é derivada. Presumivelmente, esta mobilidade alterada é uma função da diferença total de comprimento existente entre as duas seqüências alélicas. Alternativamente, duas seqüências alélicas idênticas em comprimento mas diferindo por uma inversão podem potencialmente produzir uma molécula heteroduplex com uma mobilidade eletroforética única. A quantidade de similaridade de seqüência existente entre

produtos de amplificação alélicos deve também afetar a estabilidade do heteroduplex e portanto a probabilidade de sua formação (AYLIFFE et al., 1994).

A molécula heteroduplex identificada no estudo de AYLIFFE e colaboradores (1994) estava ocasionalmente ausente em alguns experimentos. Todavia, naqueles experimentos onde estava presente, o heteroduplex sempre foi encontrado nos mesmos indivíduos e sempre ocorreu em todos estes indivíduos durante os mesmos experimentos. Presumivelmente, mudanças secundárias nas condições de reação influenciam a formação e/ou a estabilidade desta molécula.

Apenas uma única banda não parental foi amplificada dos 160 primers triados contra o pedigree de *M. line*, no trabalho de AYLIFFE e colaboradores (1994). Assumindo-se que em média quatro produtos de PCR foram amplificados por primer, das 640 bandas geradas apenas 0,16 % foram detectadas como não parentais. Uma baixa frequência de bandas não parentais também foi gerada entre meio irmãos de *Nicrophorus tomentosus* (besouro) e *Fragaria vesca* (morango) (SCOTT et al., 1992). Todavia, neste último estudo, as bandas não parentais, quando observadas, ocorreram em muito poucos meio irmãos e não apresentaram uma razão de segregação de 1:1 como deve ser esperado se elas se originarem de heteroduplex formados entre seqüências alélicas em indivíduos heterozigotos. Em contraste, uma média de 2,7 e 4,4 bandas não parentais foram geradas por cinco primers decâmeros de seqüência randômica triados contra pedigree de babuínos e humanos, respectivamente (REIDY et al., 1992). Uma frequência menor de tais bandas foi identificada entre progênes de abelhas, onde 10 % das marcas segregantes examinadas pareciam se originar de heteroduplex (HUNT & PAGE, 1992).

A análise RAPD de progênes de abelhas feita por HUNT & PAGE (1992), demonstrou que uma banda de RAPD “diplóide específica” pode ser gerada pelo anelamento de produtos de RAPD derivados de zangões haplóides que possuíam alelos

alternados de RAPD. Três outros primers de RAPD produziram bandas não parentais em progênie fêmeas diplóides, que estavam ausentes em ambas as linhagens parentais e nos zangões haplóides (HUNT & PAGE, 1992). Estas bandas anômalas foram sugeridas serem moléculas heteroduplex formadas entre alelos alternados de RAPD (HUNT & PAGE, 1992). AYLLIFFE e colaboradores (1994) confirmaram esta observação clonando dois supostos alelos de RAPD responsáveis pela formação de uma banda não parental e, demonstraram que estes dois alelos podem produzir uma molécula heteroduplex, que é idêntica à banda não parental observada nas reações RAPD de DNA genômico total. A mobilidade eletroforética reduzida da banda não parental foi devida a presença de uma alça de fita simples na molécula heteroduplex que pode ser removida com tratamento com nuclease de feijão mungo (AYLLIFFE et al., 1994).

Segundo BAGAGLI (1994), *T. pseudokoningii* apresenta um sistema de recombinação parassexual claramente detectável quando se obtém heterocários entre linhagens parentais com marcadores genéticos e condições seletivas apropriadas. As evidências experimentais indicam que o processo parassexual de recombinação envolvido nesta espécie difere do ciclo parassexual típico observado em *A. nidulans* e diversos outros fungos, principalmente com relação à ocorrência e estabilidade de diplóides, bem como à frequência de surgimento de recombinantes (BAGAGLI, 1994). A parameiose, por envolver cariogamia instantaneamente seguida de haploidização por aneuploidias com ocorrência de permutas cromossômicas (BONATELLI JR. et al., 1983), parece explicar melhor os dados obtidos por BAGAGLI (1994), sendo que sua ocorrência já foi investigada e admitida para *T. pseudokoningii* (FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER, 1992).

Outra possibilidade, já mencionada por STASZ & HARMAN (1990) e não discordante dos dados experimentais obtidos por BAGAGLI (1994), é do surgimento de

recombinantes sem formação de diplóides por fusão nuclear, num sistema que pode ser denominado de transformação intra-heterocariótica, onde apenas cromossomos ou fragmentos de DNA de um dos núcleos se funde e sofre recombinação com o outro núcleo do heterocário. Um fato que apoia esta hipótese, segundo BAGAGLI (1994), é o do estado haplóide ser o mais estável na maioria dos fungos, e também a observação de que eventos de fusão nuclear em certos grupos de fungos parecem ser particularmente evitados, mesmo em situações onde núcleos geneticamente diferentes ocorrem lado a lado, como na fase dicariótica de Ascomicetos e Basidiomicetos (ALEXOPOULOS et al., 1979; FINCHAM et al., 1979). O surgimento de eventos de fusão nuclear no processo evolutivo da reprodução sexuada, segundo HICKEY & ROSE (1988, apud BAGAGLI, 1994), pode ter sido induzido pela presença de elementos genéticos parasitas ("selfish genetic element"), os quais teriam assim maiores chances de transmissão. BAGAGLI (1994) observou, com base na literatura, que dentre os eucariotos, os fungos são organismos que possuem os menores genomas, com muito pouco DNA repetitivo, sendo que em certos grupos (Ascomicetos com fase dicariótica) já foi inclusive demonstrada a ocorrência mecanismos (recombinação pré-meiótica e mutação de ponto repetida-induzida) que atuam no sentido de eliminar ou "limpar" o genoma de seqüências repetidas e/ou parasitas (FINCHAM et al., 1979; SELKER, 1990). Segundo BAGAGLI (1994), esta tendência no sentido da não-fusão nuclear poderia propiciar condições para que outros processos de recombinação independentes de fusão, como a transformação, ocorresse, principalmente nos fungos que apresentam fase heterocariótica mas que não se reproduzem sexualmente, ou o fazem em condições muito restritivas. A transformação intra-heterocariótica, além de possibilitar recombinação, assegura a identidade genética da espécie, uma vez que a formação de heterocário normalmente só ocorre entre indivíduos geneticamente relacionados (BAGAGLI, 1994).

Alguns dados da literatura aqui abordados (ARNAU et al., 1994; DURAND et al., 1993) estão de acordo com o ciclo parassexual típico, onde ocorre a fusão dos núcleos heterocarióticos. Os recombinantes haplóides apresentam uma mistura generalizada dos padrões de RAPD dos parentais. No trabalho aqui apresentado essa mistura de padrões já é mais restrita, sugerindo a ocorrência de parameiose. Os resultados deste trabalho indicam que a parameiose envolve um processo semelhante à transformação intra-heterocariótica, abordada por Bagagli (1992), quando se utiliza fusão de protoplastos na obtenção dos recombinantes.

O trabalho de FRANCIS & CLAIR (1993) mostra que, como no ciclo parassexual, há mistura generalizada de bandas no ciclo sexual.

A ausência de banda parental observada neste trabalho não foi correlacionada com perda do respectivo grupo de ligação, como relatado no trabalho de VARGA & CROFT (1994), o que fica como sugestão para trabalhos futuros.

As bandas não parentais foram observadas a uma frequência total de 2 % nos dois cruzamentos, num total de 344 bandas. Esse valor é intermediário ao encontrado por AYLIFFE e colaboradores (1994) (0,16%) e ao encontrado por HUNT & PAGE (1992) (10%), e é menor do que o encontrado por REIDY e colaboradores (1992). Não podemos descartar a hipótese de formação de moléculas heteroduplex, mas como os fungos são organismos haplóides, estas moléculas não seriam formadas por produtos alélicos.

Neste trabalho a maioria (70,2%) dos padrões de RAPD dos recombinantes foram idênticos aos dos parentais aos quais eles mais se assemelhavam geneticamente. Na menor parte dos casos (29,8%) encontramos ausência de banda do parental geneticamente mais relacionado, presença de banda do parental com menor similaridade genética ou presença de banda não parental, ou ainda uma combinação destas três situações. Estes resultados indicam que ocorre um processo semelhante a

transformação genética durante a parameiose. No primeiro cruzamento os recombinantes apresentam apenas um marcador auxotrófico, no segundo cruzamento eles apresentam três marcadores, provenientes de ambos os parentais, demonstrando mais claramente a ocorrência de transformação. Não se pode, de qualquer maneira, descartar a hipótese de fusão de núcleos com perda preferencial de um dos genomas, como já descrito anteriormente para explicar a parameiose.

5. CONCLUSÕES

Os resultados dos experimentos conduzidos no contexto desta tese permitem as seguintes conclusões:

1. A linhagem utilizada de *Trichoderma pseudokoningii* Est-3 se mostrou mais resistente a luz ultravioleta, do que outras linhagens da mesma espécie, obtendo-se mutantes em baixa frequência.
2. As linhagens de *Trichoderma pseudokoningii* Est-3 e M apresentaram-se incompatíveis em cruzamentos via anastomose de hifas. Com fusão de protoplastos, recombinantes podem ser obtidos em baixa frequência.
3. As linhagens acima citadas mostraram ser geneticamente diferentes pelo padrão de RAPD.
4. A maioria (70,2%) dos recombinantes de dois cruzamentos envolvendo linhagens parentais com padrões de RAPD contrastantes, apresentaram padrões RAPD idênticos ao do parental com o qual havia maior similaridade genética, sugerindo ocorrência de incorporação de seqüências específicas na paramiiose, um fenômeno semelhante a transformação genética.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C.J. & MIMS, C.W. Introductory mycology. New York, John Wiley & Sons, 1979. 632p.
- ARNAU, J.; HOUSEGO, A.P.; OLIVER, R.P. The use of RAPD markers in the genetic analysis of the plant pathogenic fungus *Cladosporium fulvum*. Current Genetics, Berlin, 25: 438-44, 1994.
- ARNAU, J. & OLIVER, R.P. Inheritance and alteration of transforming DNA during an induced parasexual cycle in the imperfect fungus *Cladosporium fulvum*. Current Genetics, Berlin, 23: 508-11, 1993.
- ARNOLD, M.L.; BUCKNER, C.M.; ROBINSON, J.J. Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Washington, 88: 1398-1402, 1991.
- AUFAVRE-BROWN, A.; COHEN, J.; HOLDEN, D.W. Use of Randomly Amplified Polymorphic DNA Markers To Distinguish Isolates of *Aspergillus fumigatus*. Journal of Clinical Microbiology, Washington, 30: 2991-3, 1992.
- AYLIFFE, M.A.; LAWRENCE, G.J.; ELLIS, J.G.; PRYOR, A.J. Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. Nucleic Acids Research, Oxford, 22: 1632-6, 1994.
- AZEVEDO, J.L. O ciclo parassexual em fungos. Revista Microbiologica, 3: 157-68, 1972.
- AZEVEDO, J.L. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 2: 3-15, 1976.
- AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. Exercícios práticos de genética. São Paulo, EDUSP, 1973. 288p.
- BAGAGLI, E. Parameiose em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin Piracicaba, 1987. 124p. (Tese de Mestrado - USP/ESALQ).
- BAGAGLI, E.; VALADARES, M.C.C.; AZEVEDO, J.L. Parameiosis in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 14: 261-71, 1990.
- BAGAGLI, E.; FURLANETO, M.C.; PIZZIRANI-KLEINER, A.; AZEVEDO, J.L. Genetic recombinants in *Trichoderma pseudokoningii* (Rifai) without typical parasexuality. Canadian Journal of Microbiology, 41: 1132-1134, 1995.

- BAIRD, E.; COOPER-BLAND, S.; WAUGH, R.; DE MAINE, M.; POWELL, W. Molecular characterization of inter- and intra-specific somatic hybrids of potato using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Molecular and General Genetics. Berlin, 233: 469-75, 1992.
- BALL, C. & HAMLYN, P.F. Genetic recombination studies with *Cephalosporium acremonium* related to the production of the industrially important antibiotic Cephalosporin C. Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 5: 1-13, 1982.
- BARAK, R. & CHET, I. Serological methods as a tool for characterization of *Trichoderma* isolates. In: INTERNATIONAL *TRICHODERMA GLIOCADIMUM* WORKSHOP, 2º, Salford, 1988. Resumo. Salford, University of Salford, 1988 p.3.
- BENITEZ, T.; RAMOS, S.; GARCIA ACHA, I. Protoplasts of *Trichoderma reesei* formation and regeneration. Archives of Microbiology, Berlin, 103: 199-203, 1975.
- BERGERON, D. & MESSING-AL-AIDROSS, K. Haploidization analysis of heterozygous diploids of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Canadian Journal of Genetics and Cytology, Ottawa, 24: 643-51, 1982.
- BERTOLIN, A.O. Isolamento e biologia de novos fungos celulolíticos. Piracicaba, 1987. 63p. (Tese de Mestrado - USP/ESALQ).
- BETINA, V. & SPISIAKOVA, J. Supression of photo-induced sporulation in *Trichoderma viride* by inhibitors. Folia Microbiologica, Praga, 21: 362-70, 1976.
- BIDOCHKA, M.J.; McDONALD, M.A.; LEGER, R.J.St.; ROBERTS, D.W. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) Current Genetics, Berlin, 25: 107-13, 1994.
- BISSET, J.A. Revision of the genus *Trichoderma*. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 62: 924-31, 1984.
- BISSET, J.A. A revision of the genus *Trichoderma*. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 69: 2357-420, 1991.
- BONATELLI, JR. R. Parassexualidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, 1981. 91p. (Tese de Doutorado - USP/ESALQ).
- BONATELLI, JR. R.; AZEVEDO, J.L.; VALENT, G.V. Parasexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 6: 399-405, 1983.
- BROWN, J.A.; OGAWA, K.; WOOD, T.M. Studies on the preparation and regeneration of protoplasts from the cellulolytic fungus *Penicillium pinophilum*. Enzyme and Microbial Technology, Stoneham, 9: 547-52, 1986.
- BUENO, R. Obtenção de mutantes e fusão de protoplastos em *Penicillium cryzogenum*. Rio Claro, 1994. 128p. (Tese de Mestrado - Unesp).
- BURR, B.; BURR, F.A.; THOMPSON, K.H.; ALBERTSEN, M.C.; STUBER, C. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. Genetics, Baltimore, 118: 519-26, 1988.

- BUXTON, E.W. Heterokaryosis and parasexual recombination in pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. Journal of General Microbiology, Berkshire, 15: 133-9, 1956.
- BUXTON, E.W. Parasexual recombination in the banana wilt *Fusarium*. Transaction of the British Mycological Society, London, 45: 274-9, 1962.
- CALAM, C.T.; DAGLISH, L.B.; GAITSKELL, W.S. Hibridization experiments with *Penecillium patulum* and *Fusarium moniliforme* In: VANEK, Z.; HOSTAKEL, Z.; CUDIN, J. eds. Genetic of Industrial Microorganisms. Amsterdam, Elsevier, 1973, V. I., p.265-82.
- CARVALHO, C.M.V. Conidiação, obtenção de mutantes, hetrocariose e atividade celulolítica na linhagem selvagem de *Trichoderma sp.* Belo Horizonte, 1989, 14 lp. (Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais).
- CASTRO, U.G. Aspectos básicos da biologia e genética do *Trichoderma reesei*. Belo Horizonte, 1982. 134p. (Tese de Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais).
- CHANG, L.T. & TERRY, C.A. Intergenic complementation of glucoamylase and citric acid production in two species of *Aspergillus*. Applied Microbiology, Baltimore, 25: 890-2, 1973.
- CHEN, X.; LINE, R.F.; LEUNG, H. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. Phytopathology, Lancaster, 83: 1489-97, 1993.
- CORRELL, J.C.; RHOADS, D.D.; GUERBER, J.C. Examination of mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms, DNA fingerprints, and randomly amplified polymorphic DNA of *Colletotrichum orbiculare*. Phytopathology, Lancaster, 83: 1199-1204, 1993.
- COSTA, C.V. Diversidade biológica em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1989. 177p. (Tese de Doutorado - USP/ESALQ).
- CUBETA, M.A.; BRIONES-ORTEGA, R.; VIGALYS, R. Reassessment of heterokaryon formation in *Rhizoctonia solani* anastomosis group 4. Mycologia, New York, 85: 777-87, 1993.
- DABOUSSI, M.J. & GERLINGER, C. Parasexual cycle and genetic analysis following protoplast fusion in *Nectria haematococca*. Current Genetics, Berlin, 21: 385-92, 1992.
- DANIELSON, R.M. & DAVEY, C.B. Effects of nutrients and acidity on phialospore germination of *Trichoderma* in vitro. Soil Biology Biochemistry, Oxford, 5: 517-24, 1973.
- DAS, A. & ILCZUK, Z. Spontaneous segregation of a heterozygous diploid of *Aspergillus niger*. Folia Microbiologica, Praga, 23: 362-5, 1978.
- DOUDRICK, R.L.; NELSON, C.D.; NANCE, W.L. Genetic analysis of a single urediniospore culture of *Cronartium quercuum f.sp. fusiforme* using random amplified polymorphic DNA markers. Mycologia, New York, 85: 902-11, 1993.
- DOY, Y. Revision of the Hypocreales with cultural observations. III. Three species of the genus *Podostromo* with *Trichoderma* or *Trichoderma* like conidial states. Transactions of the Mycological Society of Japan, Tokio, 8: 54-60, 1967.

- DURAND, N.; REYMOND, P.; FÈVRE, M. Transmission and modification of transformation markers during an induced parasexual cycle in *Penicillium roqueforti*. Current Genetics, Berlin, 21: 377-83, 1992.
- DURAND, N.; REYMOND, P.; FÈVRE, M. Randomly amplified polymorphic DNAs assess recombination following an induced parasexual cycle in *Penicillium roqueforti*. Current Genetics, Berlin, 24: 417-20, 1993.
- FANTINI, A.A. Genetics and antibiotic production of *Emericellopsis* species. Genetics, Baltimore, 47: 161-77, 1962.
- FARGASOVA, A.; SPICZK, M.; BETINA, V. Morphological and colour mutants of *Trichoderma viride*. Characterization and complementation. Folia Microbiologica, Praga, 30: 433-42, 1985.
- FINCHAM, J.R.S. Transformation in fungi. Microbiological Reviews, Washington, 53: 1-70, 1989.
- FINCHAM, J.R.S.; DAY, P.R.; RADFORD, A. Fungal Genetics. Berkeley and Los Angeles, University of California Press, 1979. 636p.
- FORBES, E. Use of mitotic segregation for assigning genes to linkage groups in *Aspergillus nidulans*. Heredity, Oxford, 13: 66-80, 1959.
- FÖSTER, H. KINSCHERF, T.G.; LEONG, S.A.; MAXWELL, D.P. Estimation of relatedness between *Phytophthora* species by analysis of mitochondrial DNA. Mycologia, New York, 80: 466-78, 1988.
- FRANCIS, D.M.; CLAIR, D.A.St. Outcrossing in the homothalic oomycete, *Pythium ultimum*, detected with molecular markers. Current Genetics, Berlin, 24: 100-6, 1993.
- FURLANETO, M.C. & PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Intraspecific hybridisation of *Trichoderma pseudokoningii* by anastomosis and by protoplast fusion. FEMS Microbiological Letters, Amsterdam, 90: 191-6, 1992.
- GOLDMAN, G.H. Estudos genéticos e produção de celulases em *Aspergillus niger*. Piracicaba, 1988. 153p. (Tese de Mestrado, ESALQ/USP).
- GOODWIN, P.H. & ANNIS, S.L. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, 57: 2482-6, 1991.
- GREENSHPAN, D. & GALUN, E. Complementation in nonconidating mutants of *Trichoderma*. Journal of Bacteriology, Washington, 99: 802-6, 1969.
- GREENSHPAN, D. & GALUN, E. Morphogenesis in *Trichoderma*: autonomous and nonautonomous pigmentation in heterokaryons of color mutants in *Trichoderma viride*. American Journal of Botany, New York, 58: 287-91, 1971.
- GRESSEL, J.B. & HARTMANN, K.M. Morphogenesis in *Trichoderma*: Action spectrum of photoinduced sporulation. Planta, Berlin, 79: 271-4, 1968.

- HAMELIN, R.C.; OUELLETTE, G.B.; BERNIER, L. Identification of *Gremmeniella abietina* races with random amplified polymorphic DNA markers. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, 59: 1752-5, 1993.
- HAMLYN, P.F.; BRADSHAW, R.E.; MELLON, F.M.; SANTIAGO, C.M.; WILSON, J.M.; PEBERDY, J.F. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. Enzyme and Microbial Technology, Guildford, 3: 321-25, 1981.
- HAMLYN, P.F.; BIRKETT, J.A.; PEREZ, G.; PEBERDY, J.F. Protoplast fusion as a tool for genetic analysis in *Cephalosporium acremonium*. Journal of General Microbiology, Berkshire, 131: 2813-23, 1985.
- HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of microorganisms. Journal of General Microbiology, Berkshire, 98: 109-15, 1977.
- HASTIE, A.C. Genetic recombination in the hop-wilt fungus *Verticillium albo-atrum*. Journal of General Microbiology, Berkshire, 27: 373-82, 1962.
- HASTIE, A.C. The parasexual cycle in *Verticillium albo-atrum*. Genetical Research, Cambridge, 5: 305-15, 1964.
- HASTIE, A.C. & HEALE, J.B. Genetics of *Verticillium*. Phytopathologia Mediterranea, Bologna, 22: 130-62, 1984.
- HAYDEN, H.L.; PEGG, K.G.; AITKEN, E.A.B.; IRWIN, J.A.G. Genetic relationships as assessed by molecular markers and cross-infection among strains of *Colletotrichum gloeosporioides*. Australian Journal of Botany, Melbourne, 42: 9-18, 1994.
- HU, J. & QUIROS, E. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Reports, Berlin, 10: 505-11, 1991.
- HUNT, G.J. & PAGE, R.E.JR. Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 85: 15-20, 1992.
- KÄFER, E. An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, New York, 9: 105-45, 1958.
- KAWAMORI, M.; MORIKAWA, Y.; SHINSHA, Y.; TAKAYAMA, K.; TAKASAWA, S. Preparation of mutants resistant to catabolic repression of *T. reesei*. Agricultural Biological Chemistry, Tokyo, 49: 2875-9, 1985.
- KERSULYTE, D.; WOODS, J.P.; KEATH, E.J.; GOLDMAN, W.E.; BERG, D.E. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. Journal of Bacteriology, Washington, 174: 7075-9, 1992.
- KHUSH, R.S.; BECKER, E.; WACH, M. DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, 58: 2971-7, 1992.

- LAURILA, H.O.; NEVALAINEN, H.; MAKINEN, V. Production of protoplasts from the fungi *Curvularia inaequalis* and *Trichoderma reesei*. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, 21: 210-12, 1985.
- LEWIS, JR. W.M. Nutrient scarcity as an evolutionary cause of haploid. American Naturalist, Chicago, 125: 692-701, 1985.
- LEWIS, J.A. & PAPAVIDAS, D.C. Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma spp* in liquid and solid growth media. Soil Biology Biochemistry, Oxford, 15: 351-7, 1983.
- LEWIS, J.A. & PAPAVIDAS, D.C. Chlamydospore formation by *Trichoderma spp* in natural substrates. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 30: 1-7, 1984.
- LHOAS, P. Genetic analysis by means of the parasexual cycle in *Aspergillus niger*. Genetics Research, Cambridge, 10: 45-61, 1967.
- MANULIS, S.; KOGAN, N.; REUVEN, M.; BEN-YEPHET, Y. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* from carnation. Phytopathology, Lancaster, 84: 98-101, 1994.
- MARTIN-KEARLEY, J. & GOW, J.A. Numerical analysis and the application of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction to the differentiation of *Vibrio* strains from a seasonally cold ocean. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 40: 446-55, 1994.
- MARTIN, G.B.; WILLIAMS, J.G.K.; TANKSLEY, S.D. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Washington, 88: 2336-40, 1991.
- MCCULLY, K.S. & FORBES, E. The use of p-fluorofenil-alanine with "mestra strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. Genetics Research, Cambridge, 6: 352-9, 1965.
- MCCUTCHEON, T.L. & CARROLL, G.C. Genotypic diversity in populations of a fungal endophyte from Douglas Fir. Mycologia, New York, 85: 180-6, 1993.
- MEGNEGNEAU, P.; DEBETS, F.; HOEKSTRA, R.F. Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergilli* based on random amplification of polymorphic DNA. Current Genetics, Berlin, 23: 323-9, 1993.
- MELO, I.S. & HEALE, J.B. Isolamento e regeneração de protoplastos de *Trichoderma pseudokoningii*, um agente de biocontrole de fitopatógenos. In: Congresso Paulista de Fitopatologia, 12, Araras. 1989. Resumos. Araras, 1989, p.34.
- MESSIAS, C.L. Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsh.) Sorokin. Piracicaba, 1979. 73p. (Tese de Doutorado - USP/ESALQ).
- MILCHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELL, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Washington, 88: 9828-32, 1991.

- MILLER, J.J. & REID, J. Stimulation by light of sporulation in *Trichoderma lignorum* (Tode). Harz. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 39: 259-61, 1961.
- MOLNAR, A.; SULYOK, L.; HORNOK, L. Parasexual recombination between vegetatively incompatible strains in *Fusarium oxysporum*. Mycological Research, Cambridge, 94: 393-8, 1990.
- MOODY, S.F. & TYLER, B.M. Use of nuclear DNA restriction fragment length polymorphisms to analysis the diversity of the *Aspergillus flavus* group : *A. flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius*. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, 56: 2453-61, 1990.
- MUTHUMEENAKSHI, S.; MILLS, P.R.; BROWN, A.E.; SEABY, D.A. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British isles. Microbiology, Berkshire, 140: 769-77, 1994.
- NEVALAINEN, H. Genetic improvement of enzyme production in industrially important fungal strains. Helsinki, 1985. 243p. (Tese de Doutorado - Ph.D., University of Helsinki).
- NIFFINEGER E SOUZA, D.R. Aspectos genéticos e citológicos da instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1979. 244p. (Tese de Mestrado - USP/ESALQ).
- OGAWA, K.; BROWN, J.A.; WOOD, T.M. Intraspecific hybridization of *Trichoderma reesei* QM 9414 by protoplast fusion using colour mutants. Enzyme and Microbial Technology, Stoneham, 9: 229-32, 1987.
- OGAWA, K.; HITOSHI, O.; TAKAO, K. Intraspecific hybridization of *Trichoderma reesei* by protoplast fusion. Journal of Fermentation and Bioengineering, Osaka, 67: 207-9, 1989.
- PACCOLLA-MEIRELES, L.D. Variabilidade e recombinação genética no Deuteromiceto *Beauveria bassiana* (Vuill.). Piracicaba, 1988. 193p. (Tese de Doutorado - EASALQ/USP).
- PACCOLLA-MEIRELES, L. & AZEVEDO, J.L. Parasexuality in *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology, Duluth, 57: 172-6, 1991.
- PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, 23: 23-54, 1985.
- PE'ER, S. & CHET, I. *Trichoderma* protoplast fusion: a tool for improving biocontrol agents. Canadian Journal Microbiology, Ottawa, 36: 6-9, 1990.
- PEREIRA, J.O. Ocorrência do ciclo parassexual em uma espécie do gênero *Aspergillus*. Piracicaba, 1978. 108p. (Tese de Mestrado, ESALQ/USP).
- PICATAGGIO, S.K.; SCHAMHART, M. D.H.J.; MONTENECOURT, B.S.; EVELEIGH, D.E. Sphaeroplast formation and regeneration in *Trichoderma reesei*. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, 17: 121-8, 1983.
- PIZZIRANI, A.A. Características, propriedades e estabilização de dissômicos em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, 1977. 111p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- PLUMMER, K.M.; DUNSE, K.; HOWLETT, B.J. Non-aggressive strains of the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, are present in Australia and can be distinguished from aggressive strains by molecular analysis. Australian Journal of Botany, Melbourne, 42: 1-8, 1994.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; McDONALD, K.F.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, New York, 5: 141-8, 1953.
- PONTECORVO, G. The parasexual cycle in fungi. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, 10: 393-400, 1956.
- PONTECORVO, G. & ROPER, J.A. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, Berkshire, 6: vii, 1952.
- POWELL, W.; ELLIS, R.P.; MACAULAY, M.; McNICOL, J.; FOSTER, B.P. Molecular analysis of quantitative traits in doubled haploid populations of barley. Heredity, Berlin, 65: 115-22, 1990.
- POWELL, W.; THOMAS, W.T.B.; TOMPSON, D.M.; SWANSTON, J.S.; WAUGH, R. Association between rDNA alleles and quantitative traits in doubled haploid populations of barley. Genetics, Baltimore, 130: 187-94, 1992.
- REITER, R.S.; WILLIAMS, J.G.K.; FELDMANN, K.A.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V.; SCOLNIK, P.A. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Washington, 89: 1477-81, 1992.
- RIEDY, M.F.; HAMILTON, 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, Kew Surrey, 116: 1-56, 1969.
- RODRIGUES, E.C. Caracterização citogenética e bioquímica do fungo celulolítico *Humicola* sp. Piracicaba, 1987. 152p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- ROPER, J.A. The parasexual cycle. In: AINSWORTH, G. & SUSSMAN, A.S., ed. The Fungi. New York, Academic Press, 1966, vol. 2, p. 589-617.
- SANDHU, D.K. & BAWA, S. Improvement of cellulase activity in *Trichoderma*. Proceedings of the 13th symposium on biotechnology for fuels and chemicals, Denver, 34/35: 175-84, 1992.
- SANTOS, I.C. Avaliação da variabilidade genética de *Trichoderma* por isoenzimas, RFLP e RAPD. Piracicaba, 1992. 92p. (Tese de Mestrado - ESALQ/USP).
- SCOTT, M.P.; HAYMES, K.M.; WILLIAMS, S.M. Parentage analysis using RAPD PCR. Nucleic Acids Research, Oxford, 20: 5493, 1992.
- SERMONTI, G. Genetics of antibiotic producing microorganisms. London, Wiley Inter-Science, 1969. 389p.

- SHÄFER, C. & WÖSTEMEYER, J. Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). Journal of Phytopathology, Berlin, 136: 124-36, 1992.
- SELKER, E.U. Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. Annual Review of Genetics, Palo Alto, 24: 579-613, 1990.
- SHIMENTI, J.; GARRET, T.; MONTENECOURT, B.S.; EVELEIGH, D.E. Selection of hypercellulolytic mutants of *Trichoderma reesei* based on resistance to nystatin. Mycologia, New York, 75: 876-80, 1983.
- SILVEIRA, W.D. Obtenção e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1983. 153p. (Tese de Mestrado - USP/ESALQ)
- SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. Protoplast fusion and genetic recombination in *Metarhizium anisopliae*. Enzyme and Microbial Technology, Stoneham, 9: 149-52, 1987.
- SIVAN, A. & HARMAN, G.E. Improved rhizosphere competence in a protoplast fusion progeny of *Trichoderma harzianum*. Journal of General Microbiology, Berkshire, 137: 23-9, 1991.
- SIVAN, A.; HARMAN, G.E.; STASZ, T.E. Transfer of isolated nuclei into protoplasts of *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, 56: 2404-9, 1990.
- SPECHT, C.A.; DIRUSSO, C.C.; NOVOTNY, C.P.; ULLRICH, R.C. A method for extrating high-weight deoxyribonucleic acid from fungi. Analytical Biochemistry, New York, 119: 158-63, 1982.
- REENIVASAPRASAD, S. BROWN, A.E.; MILLS, P.R. DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. Physiological and Molecular Plant Pathology, London, 41: 265-81, 1992.
- STASZ, T.E.; HARMAN, G.E.; WEEDEN, N.F. Protoplast preparation and fusion in two biocontrol strains of *Trichoderma harzianum*. Mycologia, New York, 80: 141-50, 1988a.
- STASZ, T.E.; WEEDEN, N.F.; HARMAN, G.E. Methods of isoenzyme electrophoresis for *Trichoderma* and *Giocladium* species. Mycologia, New York, 80: 870-4, 1988b.
- STASZ, T.E.; HARMAN, G.E.; GULLINO, M.L. Limited vegetative compatibility following intra- and interspecific protoplast fusion in *Trichoderma*. Experimental Mycology, Orlando, 13: 364-71, 1989a.
- STASZ, T.E.; NIXON, K.; HARMAN, G.E.; WEEDEN, N.F. Evaluation of phenetic species and phylogenetic relationship in the genus *Trichoderma* by cladistic analysis of isoenzyme polymorphism. Mycologia, New York, 81: 391-403, 1989b.
- STASZ, T.E. & HARMAN, G.E. Nonparental progeny resulting from protoplast fusion in *Trichoderma* in the absence of parasexuality. Experimental Mycology, Orlando, 14: 145-59, 1990.
- STRYER, L. Explorando os genes: analisando, construindo e clonando o DNA. In: STRYER, L. Bioquímica. 3ª edição. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1992. cap.6, p.95-114.

- STRONGMAN, D.B. & MACKEY, R.M. Discrimination between *Hirsutella longicolla* var. *longicolla* and *Hirsutella longicolla* var. *cornuta* using random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Mycologia, New York, **85**: 65-70, 1993.
- TAHOUN, M.K. Gene manipulation by protoplast fusion and penicillin production by *Penicillium chrysogenum*. Applied Biochemistry and Biotechnology, Baltimore, **39-40**: 445-53, 1993.
- TANAKA, Y.; MURATA, N.; KATO, K. Behavior of nuclei and chromosomes during ascus development in the mating between either rive-strain or weeping lavegrass-strain and ragi-strain of *Pyricularia*. Annual of the Phytopathology Society of Japan, Tokio, **45**: 182-91, 1979.
- THOMAS, D.S.; SURYANARAYANA, K.; MANAVATHU, E.K. Asexual reproduction couplet with heterothalism possible consequences for fungi. Journal of Theoretical Biology, London, **105**: 373-8, 1983.
- TINLINE, R.D. & NOVIELLO, C. Heterocaryosis in the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. Mycologia, New York, **63**: 701-12, 1971.
- TOYAMA, H. & TOYAMA, N. Autopolyploid formation of *Trichoderma reesei* QM 9414 by colchicine treatment. Journal of Fermentation and Bioengineering, Osaka, **69**: 51-3, 1990.
- TOYAMA, H.; YAMAGUCHI, K.; SHINMYO, A.; OKADA, H. Protoplast fusion of *Trichoderma reesei* using immature conidia. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, **47**: 363-8, 1984.
- TUVESON, R.W. & COY, D.O. Heterocaryosis and somatic recombination in *Cephalosporium mycophilum*. Mycologia, New York, **53**: 244-53, 1961.
- TYPAS, M.A. Heterokaryon incompatibility and interspecific hybridization between *Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae* following protoplast fusion and microinjection. Journal of General Microbiology, Berkshire, **129**: 3043-56, 1983.
- TYPAS, M.A. & HEALE, J.B. Analysis of ploidy levels in strains of *Verticillium* using a Coulter Counter. Journal of General Microbiology, Berkshire, **101**: 177-80, 1977.
- VALADARES, M.C.C. Genética e produção de exoenzimas em linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1989, 160p. (Tese de Mestrado - USP/ESALQ).
- VARGA, J. & CROFT, J.H. Assignment of RFLP, RAPD and isoenzyme markers to *Aspergillus nidulans* chromosomes, using chromosome-substituted segregants of a hybrid of *A. nidulans* and *A. quadrilineatus*. Current Genetics, Berlin, **25**: 311-17, 1994.
- VEGA, M.E. Aspectos genéticos da parameiose via fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1990, 95p. (Tese de Mestrado - USP/ESALQ).
- VICENTE, V.S. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos. Piracicaba, 1989. 173p. (Dissertação de Mestrado - USP/ESALQ).
- YOON, C.-S. & GLAWE, D.A. Association of random amplified polymorphic DNA markers with stromatal type in *Hypoxylon truncatum* sensu Miller. Mycologia, New York, **85**: 369-80, 1993.

- WAUGH, R. & POWELL, W. Using RAPD markers for crop improvement. Trends in Biotechnology, Cambridge, 10: 186-91, 1992.
- WEIMAN-GREENSHPAN, D. & GALUN, E. Complementation in nonconidiating mutants of *Trichoderma*. Journal of Bacteriology, Washington, 99: 802-6, 1969.
- WEIMAN-GREENSHPAN, D. & GALUN, E. Morphogenesis in *Trichoderma*: autonomous and nonautonomous pigmentation in heterokaryons of color mutants in *Trichoderma viride*. American Journal of Botany, New York, 58: 287-91, 1971.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, Oxford, 18: 6531-5, 1990.
- ZALDIVAR, M.; STEINER, J.; MUSALEM, M.; CONTRERAS, I. Aislamiento de un mutante de *Trichoderma pseudokoningii* hiperprodutor de celulasas. Microbiologia, Santiago, 3: 33-44, 1987.
- ZIMAND, G.; VALINSKY, L.; ELAD, Y.; CHET, I.; MANULIS, S. Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. Mycological Research, Cambridge, 98: 531-4, 1994.