TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E VARIABILIDADE DETECTADA POR RAPD EM ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Colletotrichum musae*

ADRIANA CRISTINA LONGO
Bióloga

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

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
Dezembro de 1995

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

Longo, Adriana Cristina
Transformação genética e variabilidade detectada por RAPD em isolados endofíticos de *Colletotrichum musae* / Adriana Cristina Longo. - - Piracicaba, 1995.
103 p. : il.

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

1. Fungo fitopatogênico 2. Marcador molecular 3. Podridão da banana (doença) 4. Transformação genética I. Título.

CDD 632.4
634.772

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E VARIABILIDADE DETECTADA POR RAPD EM ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Colletotrichum musae*

ADRIANA CRISTINA LONGO

Aprovada em 14/02/96

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo	ESALQ/USP
Profa. Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira	ESALQ/USP
Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati	ESALQ/USP
Profa. Dra. Marisa Vieira de Queiroz	Univ. Fed. Viçosa
Prof. Dr. José Odair Pereira	Fund. Univ. do Amazonas

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
- Orientador -

Ao meu F_1, Pedro Augusto,
Pelas alegrias que me tem feito viver

AGRADECIMENTOS

Agradeço com muito carinho todas as pessoas que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho e em especial:

* Ao meu orientador Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pelo exemplo de liderança;

* À Profª. Drª. Aline Ap. Pizzirani-Kleiner, pelo incentivo e alegre convívio;

* Ao Prof. Dr. Augusto Schrank, pelas sugestões e disponibilidade durante a etapa do trabalho desenvolvida em seu laboratório, no Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul;

* À Profª. Drª Maria Lúcia Carneiro Vieira, pelo auxílio no início do trabalho e pelas facilidades concedidas no Laboratório Central de Cultura de Tecidos;

* Ao meu querido Pedro D. Della Coletta, por entender a importância do meu trabalho e estimular a maioria das minhas decisões;

* Às amigas Maria Helena P. Fungaro e Marisa Vieira de Queiroz, pelas valiosas discussões;

* Ao amigo José Odair Pereira, por me apresentar o mundo dos endofíticos;

* Aos amigos Renata C. Pascon e Marcelo A. Vallin, pelo companheirismo em todas as horas;

* Aos colegas João, Alexandre, André, Wellington, Luciana Regitano e Luciana Ribeiro, Gilda, Chirlei, Regina, Carlos, Carmen, Iara, Margarete, Rose, Nirlei e ao técnico José Antônio, do Lab. de Genética de Microrganismos, pela convivência saudável;

* Ao técnico Carlos Alberto, do Lab. Central de Cultura de Tecidos, por toda a ajuda durante o trabalho;

* Aos colegas Márcia, Cristine, Hermides, Maurício, Cláudia Agostini e Cláudia Dornelles, Andréia, Sílvia e Bandi, do Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul, pela colaboração;

* Aos professores e funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP;

* À CAPES e ao Programa RHAE/CNPq, pela concessão de bolsas de estudo;

* A FAPESP, pelo financiamento do projeto "Microrganismos endofíticos: análise molecular de sua variabilidade e interações com o hospedeiro ao nível metabólico".

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS vii
LISTA DE TABELAS x
RESUMO xi
SUMMARY xiii
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1 Fungos endofíticos: considerações gerais 3
2.2 O gênero *Colletotrichum* 7
2.2.1 As estruturas de infecção, a patogenicidade e a interação planta-microrganismo. 9
2.2.2 Variabilidade detectada por marcadores moleculares em alguns fungos filamentosos 14
2.3 Os sistemas de transformação genética e a análise do genoma em fungos filamentosos 20
2.3.1 Os marcadores seletivos dominantes 23
2.3.2 Métodos alternativos de transformação 28
2.3.3 Fatores que interferem na transformação 30
3. MATERIAL E MÉTODOS 34
3.1 Isolados endofíticos de *Colletotrichum musae* 34
3.2 Meios de cultura 35
3.2.1 Meio completo (MC) (PONTECORVO *et al.*, 1953) 35
3.2.2 Meio de regeneração de protoplastos 35
3.2.3 Meio de seleção de transformantes 35
3.3 Soluções e Tampões 36
3.3.1 Solução de vitaminas 36
3.3.2 Solução de Tween 80 36
3.3.3 Solução salina 36
3.3.4 RNase A 36
3.3.5 Solução aquosa de acetato de potássio 36
3.3.6 Solução de KCl 37
3.3.7 Solução de brometo de etídio 37
3.3.8 Solução de EDTA 37
3.3.9 Solução de $MgCl_2$ 37

3.3.10 Solução de cálcio 37
3.3.11 Solução de PEG 38
3.3.12 Solução estabilizadora 38
3.3.13 Tampão fosfato 38
3.3.14 Tampão TEB (10x) 38
3.3.15 Tampão da amostra 38
3.3.16 Tampão Tris-EDTA (TE) 39
3.3.17 Tampão de extração de DNA 39
3.3.18 Tampão RAPD-PCR 39
3.3.19 Fenol saturado 39
3.3.20 dNTP 40
3.3.21 Enzima Taq polimerase 40
3.3.22 Oligonucleotídeos 40
3.4 Teste de sensibilidade dos isolados ao benomil 40
3.5 Obtenção e regeneração de protoplastos 40
3.6 Extração de DNA do fungo 41
3.7 Transformação 42
3.7.1 Transformação 1 (BERNIER *et al.*, 1989 modificado) 43
3.7.2 Transformação 2 (BALLANCE & TURNER, 1986 modificado) 43
3.7.3 Transformação 3 (BLAKEMORE *et al.*, 1989 modificado) 43
3.7.4 Transformação 4 (PUNT & VAN DEN HOLDEL, 1993 modificado) 44
3.7.5 Transformação 5 (GOLDMAN *et al.*, 1990 modificado) 44
3.8 Estabilidade mitótica 44
3.9 Determinação dos níveis de resistência dos transformantes 45
3.10 Análise dos transformantes baseada em "Southern blot" 45
3.11 Infecção de plantas axênicas de banana com o isolado selvagem e os transformantes 45
3.12 Análise de RAPD 46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 49
4.1 Transformação genética com o gene heterólogo de resistência ao benomil 49
4.1.1 A escolha do isolado e os testes de sensibilidade ao benomil 49
4.1.2 Produção e regeneração de protoplastos 50
4.1.3 Transformação 53
4.1.4 Análise dos transformantes e estabilidade mitótica 56
4.1.5 Nível de resistência dos transformantes 59

4.1.6 Hibridação e análise dos transformantes 59
4.1.7 Inoculação dos transformantes em plantas axênicas de banana 64
4.2 Análise da diversidade genética por RAPD 69
4.2.1 Padronização da técnica e seleção de oligonucleotídeos 69
4.2.2 Análise dos marcadores RAPD 72
5. CONCLUSÕES 83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 84

LISTA DE FIGURAS

Figura **Página**

1. Estruturas de infecção do gênero *Colletotrichum* (MENDGEN & DEISING, 1993)..... 10

2. Transformação com plasmídio circular de DNA. (A) Recombinação homóloga, resultado de um evento de permuta dupla ou conversão gênica; (B) Recombinação homóloga, resultado de um evento de permuta simples; (C) Recombinação heteróloga, resultado de recombinação dentro da seqüência gênica, que pode levar à inativação (TIMBERLAKE & MARSHALL, 1989)..... 23

3. Plasmídio pBT_6 utilizado nos experimentos de transformação de *Colletotrichum musae* (BALLANCE & TURNER, 1986)..... 42

4. Teste de sensibilidade do isolado 1.2 ao benomil. (a). Controle (MC); (b) MC + 0,1μg/ml ; (c) MC + 0,2μg/ml; (d) MC + 0,3μg/ml; (e) MC + 0,4μg/ml; (f) MC + 0,5μg/ml. 51

5. Influência da transformação na morfologia das colônias de *Colletotrichum musae*, crescidas em MC+1μg/ml de benomil. (a) T1.2; (b) T3.12; (c) T1.20; (d) T3.8; (e) T3.2; (f) T4.44..... 58

6. Crescimento dos transformantes de *Colletotrichum musae* em diferentes concentrações de benomil. (a) Controle; (b) MC + 1,0μg/ml; (c) MC + 2,0μg/ml; (d) MC + 3,0μg/ml; (e) MC + 4,0μg/ml..... 60

7. (A). DNA total do isolado selvagem e dos transformantes, clivados com a enzima de restrição *Hind*III. (B) Padrão de hibridação do DNA total do isolado selvagem e dos transformantes clivados com *Hind*III, tendo como sonda o

plasmídio pBT_6. (1) λ clivado com *Hind*III, (2) T1.2, (3) T1.20, (4) T3.12, (5) T4.8; (6) T4.44, (7) T3.19, (8) 1.2; (9) 7.1; (10) pBT_6 63

8. Freqüência de infecção em fragmentos de folha de bananeira, inoculados com o isolado selvagem e com os transformantes de *Colletotrichum musae*, reisolados de plantas axênicas, após 20 dias da inoculação. (S) Selvagem; (T1, T2, T3, T4, T5) Transformantes..... 65

9. Frequuência de infecção do isolado selvagem e dos transformantes de *Colletotrichum musae*. (A) Competitividade do selvagem em relação aos transformantes, (B) Competitividade entre os transformantes. (S) Selvagem; (T1, T2, T3, T4, T5) Transformantes..... 67

10. Resultado da amplificação de DNA do isolado 1.2 de *Colletotrichum musae* com diferentes oligonucleotídeos. (1) OPX-01, (2) OPX-02; (3) OPX-03, (4) OPX-04, (5) OPX-06, (6) OPX-11, (7) OPX-12, (8) OPX-14, (9) OPX-17, (10) OPX-18..... 71

11. Amplificação de DNA de *Colletotrichum musae*, com o iniciador OPF-02, para verificar a condição ótima de reação, em função da concentração de íons Mg^{++} : (1) 1,9 mM; (2) 2,0 mM; (3) 2,5 mM; (4) 3,0 mM; (5) 3,5mM, (6) 4,0mM; (7) 5,0mM; (M) fago λ / *Hind*III..... 72

12. Influência da concentração de DNA genômico na amplificação de fragmentos de DNA de *Colletotrichum musae*: (1) 20 ng; (2) 40 ng; (3) 60 ng; (4) 80 ng; (5) 100 ng; (6) 120 ng; (7) 140 ng; (M) fago λ / *Hind*III..... 73

13. Resultado da amplificação de DNAs de *Colletotrichum musae* com o oligonucleotídeo sintético OPX-03. (M) fago λ / *Hind*III; 1, 3, 5, 6, 10, 12, 17, 1.2, 1.4, 7.1, 1.3, 14, 21, 33 (Isolados)..... 74

14. Resultado da amplificação de DNAs de *Colletotrichum musae* com o oligonucleotídeo sintético OPX-06. (M) fago λ / *Hind*III; 1, 3, 5, 6, 10, 12, 17, 1.2, 1.4, 7.1, 1.3, 14, 21 (Isolados)..... 75

15. Resultado da amplificação de DNAs de *Colletotrichum musae* com o oligonucleotídeo sintético OPX-09. (M) fago λ / *Hind*III; 1, 3, 5, 6, 10, 12, 17, 1.2, 1.4, 7.1, 1.3, 14, 21, 33 (Isolados); (NA) não avaliado..... 76

16. Matriz de similaridades construída pelo método de agrupamento UPGMA..... 79

17. Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA, a partir de uma matriz de similaridades, considerando o coeficiente de "Simple Matching". Os valores indicados acima representam coeficientes de similaridades. À direita estão indicados os códigos dos isolados de *Colletotrichum musae*..... 80

LISTA DE TABELAS

Tabela **Página**

1. Algumas vantagens da utilização de endófitos como pesticidas naturais (CARLSON, 1988)..... 6

2. *Colletotrichum musae* isolados a partir de folhas de *Musae cavendish* var. Nanicão..... 34

3. Oligonucleotídeos sintéticos utilizados para o estudo de variabilidade de *Colletotrichum musae*..... 47

4. Teste de sensibilidade de isolados endofíticos de *Colletotrichum musae* ao benomil..... 50

5. Influência do estabilizador osmótico na regeneração dos protoplastos de *Colletotrichum musae*..... 53

6. Eficiência de transformação de *Colletotrichum musae* com DNA do plasmídio pBT_6..... 54

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA E VARIABILIDADE DETECTADA POR RAPD EM ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Colletotrichum musae*

Autora: Adriana Cristina Longo
Orientador: João Lúcio de Azevedo

RESUMO

Colletotrichum é um dos mais importantes gêneros de fungos fitopatogênicos, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. Espécies de *Colletotrichum* causam uma série de doenças nas plantas, sendo a antracnose a mais importante delas. No passado, a ausência de relatos sobre o ciclo sexual e a análise de mutações limitaram severamente o entendimento do processo patogênico destes e de muitos outros fungos filamentosos, porém com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular novas possibilidades surgiram. A transformação genética, por permitir a transferência de genes, tem se tornado um importante recurso para o entendimento da base genética da patogenicidade. Com este objetivo, isolados endofíticos de *C. musae* foram avaliados quanto à sensibilidade ao benomil e transformados com o gene heterólogo *tub2* de *Neurospora crassa*, presente no plasmídio pBT_6. Condições para a obtenção e a regeneração de protoplastos foram estabelecidas, sendo KCl 0,7 M e sacarose 0,7 M empregados respectivamente, para obtenção e regeneração. A eficiência de transformação não ultrapassou 6 transformantes / μg de DNA, nos cinco métodos estudados. Houve o aparecimento de transformantes morfologicamente idênticos ao selvagem, mas também aqueles com conidiação e crescimento comprometidos. Por terem sido capazes de reinfectar plantas axênicas de banana, pode se dizer que a transformação não alterou genes envolvidos com os mecanismos de patogenicidade. Os estudos de variabilidade, com marcadores RAPD, mostraram uma população geneticamente homogênea, com alto grau de similaridade (média de 65%). Sugerindo

que alguns isolados podem pertencer a grupos com compatibilidade vegetativa, sendo esta uma forma de geração de variabilidade. A própria reprodução clonal da bananeira pode contribuir para a distribuição de biótipos, uma vez que os fungos, pela capacidade de infectarem as plantas, acabam sendo propagados com a cultura. Mesmo os isolados fúngicos obtidos a partir de lesões do fruto mostraram, em resultados preliminares, um alto grau de similaridade sugerindo que endofíticos típicos e fitopatogênicos podem se constituir em uma mesma população.

GENETIC TRANSFORMATION AND VARIABILITY DETECTED BY RAPD IN ENDOPHYTIC ISOLATES OF *Colletotrichum musae*

Author: Adriana Cristina Longo
Adviser: João Lúcio de Azevedo

SUMMARY

Colletotrichum is one of the most important genera of phytopathogenic fungi, especially in tropical and subtropical regions. *Colletotrichum* species cause many plant diseases, having anthracnose as the most serious of them. In the past, the lack of the sexual cycle and mutation analyses limited the comprehension of pathogenic process of *Colletotrichum* and other filamentous fungi. The development of molecular biology techniques opened new possibilities up. The genetic transformation, by allowing gene transfers, became one important alternative for the understanding of the genetic bases of pathogenicity. With this aim, endophytic isolates of *C. musae* were evaluated concerning benomyl sensitivity and after that, transformed with the heterologous gene *tub2* from *Neurospora crassa*, present in the plasmid pBT_6. Conditions for protoplasts formation and regeneration were estabilished, using KCl 0.7 M e sucrose 0.7 M as osmotic stabilizers, respectively. The transformation efficiency was not more than 6 transformants / μg of plasmid DNA, as result of the five methods tested. There were transformants morphologically identical to the wild strain, but also some of them with conidiation and growth affected. Reinoculation of axenic banana plants showed that the transformation did not interfer on the genes envolved with the pathogenicity mechanisms. On the the other hand, variability studies, with RAPD markers, showed a genetically homogeneous population, with high degree of similarity (65%), suggesting that some isolates may be part of vegetative compatibility groups, being this one way

to get variability. The clonal reproduction of banana trees may contribute for biotype distribution, since the fungi due to their capacity of infecting plants, can also be propagated with the banana tissues. Even the fungal isolates obtained from fruit lesions showed, in preliminary results, high degree of similarity, suggesting that typical endophytes and pathogenic fungi can be the same population.

1. INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos, aqueles que crescem no interior das plantas e, pelo menos, aparentemente, não produzem sintomas de doenças nos hospedeiros, têm sido isolados e caracterizados nas mais diversas espécies vegetais. E apesar das interações entre plantas e endófitos, ainda não estarem completamente elucidadas, há relatos sobre a relação simbiótica, antagonista ou neutra que eles estabelecem com seus hospedeiros.

Com o progresso dos estudos surgiram então, as potencialidades de aproveitamento dos endófitos na agricultura. Atualmente, eles representam um grupo de microrganismos importante no controle natural de doenças e pragas vegetais.

Colletotrichum spp são fungos comumente isolados em várias espécies de plantas, formando um dos mais importantes gêneros de fungos fitopatogênicos, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, causando uma série de doenças, sendo a antracnose a mais importante delas. Há um grande interesse em espécies deste gênero, do ponto de vista bioquímico, fitopatológico e genético. No entanto, a escassez de relatos sobre a caracterização do ciclo sexual e, consequentemente a dificuldade em se analisar mutantes limitaram severamente o entendimento do processo patogênico destes e de muitos outros fungos filamentosos.

A importância que a genética molecular vem alcançando nos últimos anos, se deve principalmente, ao avanço dos estudos com marcadores moleculares e das técnicas de transferência de genes. Com os marcadores moleculares, a obtenção de informações sobre os mecanismos responsáveis pela variabilidade tem sido intensificada e, pela transformação genética, tornou-se possível introduzir linhagens modificadas nas plantas hospedeiras e monitorar o comportamento dos endófitos em seus hospedeiros naturais.

O interesse em estudar a espécie *Colletotrichum musae* surgiu de estudos desenvolvidos no Laboratório de Genética de Microrganismos (ESALQ/USP), quando vários isolados foram descritos em plantas sadias de *Musa cavendish* var. Nanicão (PEREIRA, 1993).

Apesar de ser conhecido como fitopatógeno do gênero, desconhece-se a interação que estes fungos estabelecem com seus hospedeiros, na condição endofítica. Dessa forma, a aquisição de novas informações sobre *Colletotrichum,* será importante para melhorar o conhecimento das interações que estes fungos estabelecem com suas plantas hospedeiras.

Considerando esses aspectos, os objetivos deste trabalho foram:

1. Desenvolver um sistema de transformação genética, para isolados endofíticos de *Colletotrichum musae*, utilizando um marcador de resistência;

2. Avaliar o comportamento de isolados selvagens e de transformantes de *Colletotrichum musae*, após sua inoculação em plantas axênicas de bananeira;

3. Estudar a variabilidade genética dos isolados endofíticos de *Colletotrichum musae*, utilizando marcadores moleculares revelados pela técnica de RAPD.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fungos endofíticos: considerações gerais

Um tema comum na evolução de plantas superiores tem sido a formação de associações simbióticas com microrganismos heterotróficos. Plantas em associação com bactérias fixadoras de nitrogênio ou com fungos micorrízicos, freqüentemente exibem uma maior capacidade para captar nutrientes ou tolerar estresses físicos (LEWIS, 1973).

Nos últimos 20 anos um tipo de associação, já descrito anteriormente mas pouco estudado, tem despertado o interesse de pesquisadores. Trata-se da associação de plantas com microrganismos endofíticos, ou seja, aqueles encontrados no interior de tecidos vegetais e especialmente na parte aérea. Apesar das suas relações com o hospedeiro ainda não estarem bem definidas, acredita-se que se trata de uma relação simbiótica, neutra ou até mesmo antagonista.

Muitas espécies vegetais são infectadas por fungos endofíticos (CLAY, 1987), sendo as gramíneas e as coníferas os principais grupos até agora investigados, com mais de 300 espécies de fungos já encontradas. Estes estudos revelaram que a maioria dos fungos endofíticos são Ascomicetos ou fungos imperfeitos (CARROLL, 1988). Há sempre uma predominância de uma ou poucas espécies em um determinado hospedeiro, mostrando uma variabilidade reduzida da flora micótica. A composição das espécies varia de acordo com o hospedeiro, distribuição geográfica, idade da planta e condições do ambiente (AGOSTINI *et al.*, 1992).

De acordo com a maioria das definições prevalecentes, esses fungos habitam o interior de seus hospedeiros, sem causar qualquer sintoma de doença (PETRINI, 1984). Isso não implica necessariamente que esteja descartada a possibilidade de se tornarem patogênicos, quando a planta se encontra sobre qualquer tipo de estresse (CARROLL, 1988). A maioria desses microrganismos é de fácil isolamento e por isso, têm sido encontrados em vários órgãos da planta como folha, xilema, caule (PETRINI, 1986) e em todas as espécies vegetais até então, investigadas.

Em trabalhos com populações naturais de fanerógamas, PETRINI (1991) encontrou comunidades de fungos que geralmente são consideradas patogênicas para a planta. Entre elas incluem-se *Hypoxylon mammatum*, responsável pelo cancro da haste em espécies arbóreas, *Cryphonectria parasitica*, agente causal da queima das castanheiras e uma série de espécies patogênicas do gênero *Fusarium*, em culturas como milho e trigo. PEREIRA (1993) encontrou em *Stylosanthes* e *Musa cavendish*, uma grande quantidade de *Colletotrichum* spp, o fungo responsável pela antracnose nessas espécies.

O que se acredita atualmente, é que apesar de ter sido encontrado um grande número de organismos que sob certas condições se comportam como patógenos, sob outras condições, estes mesmos organismos, permanecem inócuos e talvez promovam uma relação benéfica com seus hospedeiros. O mais conhecido e desenvolvido sistema é o dos endófitos de gramíneas, principalmente *Acremonium*, onde a resistência à herbivoria ou a repelência a insetos e artrópodes, assim como um aumento na produtividade, sob certas condições de campo, estão entre as vantagens que as plantas infectadas têm com relação às não infectadas (SIEGEL, 1993).

Várias pesquisas referentes ao aspecto ecológico do endofitismo têm sido publicadas e em alguns casos, formuladas hipóteses da simbiose fungo-hospedeiro. Os endófitos são capazes de produzir em cultura, compostos com propriedades antibióticas ativas contra bactérias e fungos, patogênicos a plantas e ao homem. Essas substâncias são usualmente produzidas por um grande número de espécies, tornando esse grupo de fungos de especial interesse para a agricultura e indústria farmacêutica (PETRINI, comunicação pessoal). A produção de taxol, um agente anti tumoral, empregado em tratamentos de câncer de seio e ovário, é um exemplo disso. Apesar de produzido tanto pela planta *Taxus brevifolia,* quanto pelo fungo *Taxomyces andreanae*, atualmente encontra-se vantagens na sua produção por fungos, uma vez que esse diterpenóide pode ser extraído em meio sintético, evitando os inconvenientes da extração a partir da planta, que tem crescimento lento e baixo rendimento (STIERLE *et al.*, 1993).

A proposta de muitos grupos de pesquisa utilizando a natureza ambivalente dos endófitos, como patógenos e simbiontes inócuos, é explorar seu potencial também como agentes de biocontrole. CLARK, C.L. *et al.* (1989) isolaram espécies endofíticas (*Phyllosticta* sp e *Hormonema dematioides*) de coníferas, capazes de produzir

compostos metabólicos com efeito citotóxico para as células HeLa e células das espécies de larva que parasitam tais pinheiros. Esses metabólitos podem ainda, aumentar a suscetibilidade dos parasitas a fungos e bactérias patogênicas, conferindo maior resistência aos hospedeiros. CARLSON (1988) aponta várias vantagens em se realizar estudos com endofíticos para o desenvolvimento de pesticidas sistêmicos. Entre elas encontram-se vantagens econômicas, ambientais e tecnológicas que podem ser avaliadas no esquema apresentado na Tabela 1.

Considerando os prováveis benefícios futuros do emprego dos endófitos, torna-se cada dia mais importante o desenvolvimento de estudos para tentar esclarecer as relações que esses fungos estabelecem com seus hospedeiros e quais as conseqüências ao nível metabólico que podem surgir. Eles são encontrados em todo o Reino Vegetal. Endófitos naturais existem e podem trazer inúmeros benefícios para as plantas as quais estão associados. Com os recursos da biotecnologia, será possível adicionar características aos microrganismos endofíticos, e assim tentar resolver alguns dos problemas da agricultura. A maior vantagem, sem dúvida, é a utilização de um sistema biológico que existe há milhões de anos.

Tabela 1. Algumas vantagens da utilização de endófitos como pesticidas naturais (CARLSON, 1988).

Vantagens	Endófitos	Químicos e Biológicos
Econômicas	* Fácil aplicação (sementes ou plantas jovens), resultando na rápida colonização das plantas. * Aplicação em menor dosagem: após a aplicação os microrganismos se multiplicam, produzindo as substâncias de interesse. * Uma vez inoculado, os endófitos produzem as substâncias por todo o ciclo de vida da planta.	* Produtos aplicados externamente são afetados pelo ambiente e pelo crescimento da planta, necessitando de várias aplicações. * A quantidade de substâncias aplicadas externamente é consideravelmente maior (miligramas x toneladas).
Ambientais	* O produto aplicado fica confinado à planta. * Endófitos não sobrevivem fora dos seus hospedeiros; portanto não se espalham no ambiente ou permanecem ativos após a colheita. * Produtos gerados por endófitos são ambientalmente seguros e degradáveis.	* O produto é disperso no ambiente a cada aplicação. * A maioria dos pesticidas deve resistir à degradação para serem efetivos.
Tecnológicas	* Alterações genéticas em microrganismos são mais simples que alterações genéticas em plantas. * Desenvolvimento de produtos baseados em microrganismos não requer programas de melhoramento, como os das plantas. * Introdução dos endófitos nas plantas causa impacto mínimo para o hospedeiro (qualidade, produção, vigor). * Muitos endófitos não são transmitidos via semente, o que obriga o agricultor a ter que comprar produtos a cada estação.	* Programas de melhoramento são muito longos, levando anos para o lançamento de um cultivar. * Alterações genéticas nas plantas causam, em geral, redução substancial na produção.

2.2 O gênero *Colletotrichum*

Colletotrichum é um dos mais importantes gêneros de fungos fitopatogênicos, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. Espécies desse gênero, causam doenças significantes economicamente em cereais, gramíneas, legumes, hortaliças e até em culturas perenes, incluindo frutíferas. Os sintomas da doença são conhecidos como antracnose, a qual afeta todos os estágios de desenvolvimento da planta.

A taxonomia de *Colletotrichum* é complexa, pois há uma grande variação nas características de cultura, temperatura ótima de crescimento, produção de estruturas reprodutivas e patogenicidade. Somente para *C. gloeosporioides* cerca de 600 sinônimos têm sido descritos, dando a impressão de se tratar de um grupo de espécies, devido à dificuldade em se separar alguns elementos, de forma satisfatória, pelos critérios clássicos (SUTTON, 1992).

DENOYES & BAUDRY (1995) fizeram um estudo para classificar espécies de *Colletotrichum*, presentes em morangos, considerando forma e tamanho de conídio, resposta à temperatura e presença de peritécio. Entre os critérios ensaiados, verificou-se que a forma do conídio pareceu ser a melhor forma de discriminação, conforme também fora discutido por GUNNELL & GUBLER (1992). Todas as outras características apresentaram grande variação, à medida que as condições ambientais foram alteradas.

Quando se considera o estágio sexual, o problema da nomenclatura é mais evidente. O correto seria utilizar o estado teleomórfico. Entretanto, muitas das dúvidas relacionadas a *Colletotrichum* podem ser estendidas a *Glomerella* (teleomórfico). Com exceção de alguns isolados típicos de *G. cingulata*, a produção do estágio sexual por algumas espécies de *Colletotrichum* é rara, ou nem tem sido descrita. Mesmo nas espécies que formam peritécio em condições de laboratório, como *C. lindemuthianum* e *C. graminicola*, não se observou essa condição na natureza (VAILLANCOURT & HANAU, 1991). Em *C. graminicola*, o estágio sexual pode ser induzido, por inoculação de esporos em folhas de milho e incubação sob luz contínua, durante 3 semanas. Já para *C. lindemuthianum*, a luz parece inibir a formação do peritécio (KIMATI & GALLI, 1970). No entanto, qualquer que seja a condição ambiental aplicada, a formação de peritécio não é comum a todas as espécies do gênero e, nem mesmo a réplicas de culturas, aparentemente idênticas (VAILLANCOURT & HANAU, 1991).

CISAR *et al.* (1994) analisaram a capacidade de *C. gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene,* isolado de *Aeschynomene virginica,* cruzar com outras espécies de *Colletotrichum* e *G. cingulata* isolados de hospedeiros como *Ludwigia (Jussiaea) decurrens* e *Carya illinoensis.* Na maioria dos cruzamentos-teste realizados, não se obteve sucesso. No entanto, observou-se que alguns isolados produziram peritécios em cultura, quando cruzados com C. *gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene.* Para descartar a hipótese de autoduplicação, nove isolados, resultantes de um mesmo peritécio, escolhido ao acaso na progênie F1, foram analisados por RFLP. Hibridações com DNA mitocondrial mostraram que o genoma foi herdado uniparentalmente, provavelmente maternalmente; enquanto que os experimentos com DNA nuclear, com sondas para glutamato sintetase e cutinase, mostraram que a progênie F1, herdou somente um dos genes parentais. Três dos isolados herdaram o gene da glutamato sintetase de um dos parentais e 6 deles, o gene da cutinase do outro parental. Nenhum isolado da progênie apresentou padrão de restrição idêntico a um dos parentais. Quando foi avaliada a patogenicidade da progênie, verificou-se que somente alguns dos isolados foram capazes de causar doença em *Aeschynomene virginica.* Os autores acreditam que a compatibilidade sexual entre isolados de diferentes hospedeiros pode explicar a variabilidade observada dentro do gênero *Colletotrichum.*

A literatura sobre o gênero *Colletotrichum* dá a impressão de que a maioria das espécies não forma peritécios maduros, seja na natureza ou em cultura. Com isso, não tem sido observado o estado teleomórfico, o que leva a considerar muitas das espécies como assexuais. No entanto, sabe-se que a recombinação sexual é a maior fonte de variabilidade entre e dentro das espécies e a escassez de relatos sobre a existência do estado perfeito de *Colletotrichum* na natureza é surpreendente, haja vista a variabilidade existente no gênero (BRYSON *et al.*,1992).

2.2.1 As estruturas de infecção, a patogenicidade e a interação planta-microrganismo

A interação planta-microrganismo é um fenômeno comum, mas muito pouco conhecido. O reconhecimento do fungo e a resposta do hospedeiro são essenciais para determinar se uma infecção vai ou não, ocorrer (DICKMAN *et al.* 1995). Dependendo da extensão com que infectam seus hospedeiros, os fungos desenvolvem estratégias de penetração e crescimento dentro das plantas.

No gênero *Colletotrichum*, a infecção ocorre com a germinação do conídio, formação do tubo germinativo, desenvolvimento do apressório e subsequente penetração cuticular (Figura 1). A adesão do esporo e sua germinação, na superfície do tecido do hospedeiro, é uma etapa essencial para o sucesso da infecção. Diferenças na hidrofobicidade e outras características dos órgãos das plantas, faz com que os fungos desenvolvam diferentes mecanismos para se ligarem à superfície da planta. Espécies do gênero *Colletotrichum* apresentam um material mucilaginoso que reveste o conídio, composto por várias enzimas (protease, celulase, endo e exo-poligalactorunidase, invertase, peroxidase, DNase e esterases não específicas) que devem ser importantes no processo de infecção do hospedeiro (MENDGEN & DEISING, 1993). Em *C. graminicola* encontra-se, entre as esterases não específicas, algumas enzimas com atividade cutinolítica (PASCHOLATI *et al.*, 1992). A cutinase, parece estar diretamente associada à patogenicidade, uma vez que as partes aéreas da planta estão cobertas por uma cutícula, formada de pectina, cutina e uma camada cerosa. Além disso, essas enzimas estão envolvidas na modificação da superfície da planta, por facilitarem a adesão dos esporos.

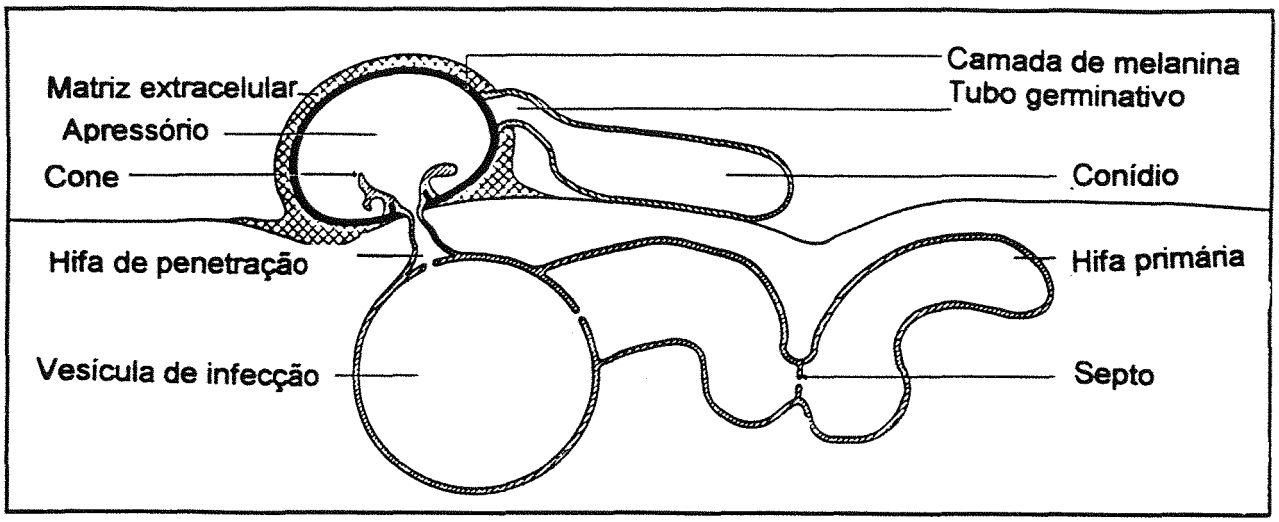

Figura 1. Estruturas de infecção *do gênero Colletotrichum* (MENDGEN & DEISING, 1993).

Pouco se sabe sobre o papel dessas enzimas na patogenicidade dos fungos. Alguns estudos mostraram que mutantes de *Colletotrichum lagenarum*, com atividade cutinolítica reduzida ou ausente, perderam a capacidade de infectar mamão (DICKMAN & PATIL, 1986), enquanto a inserção, por transformação, de um gene de cutinase de *Fusarium solani* no genoma de *Mycosphaerella* sp., restaurou sua patogenicidade (DICKMAN *et al.*, 1989). KOLLER & PARKER (1982) demonstraram que a adição de cutinase, pectinase e celulase restaurava a virulência de um isolado de *F. solani* f.sp. *pisi*, o qual era pouco virulento em brotos de ervilha com cutícula intacta, mas virulentos em brotos com a cutícula danificada.

Outro fator importante no processo de infecção é a penetração apressorial, uma vez que mutantes deficientes no desenvolvimento do apressório muitas vezes são

incapazes de causar doença (HOWARD & FERRARI, 1989). Enquanto o desenvolvimento do apressório é, aparentemente um pré-requisito para a penetração do fungo e conseqüente colonização do hospedeiro, a germinação do conídio é um pré-requisito para a formação do apressório (DICKMAN *et al.*, 1995).

Desde os estudos de Busgen (1893), citado por MENDGEN & DEISING (1993), relacionando a influência do poro estomatal na indução do apressório em fungos, vários experimentos têm sido conduzidos para caracterizar os estímulos e os mecanismos que induzem sua formação. CHAPELA *et al.* (1991) mostraram que substâncias químicas, secretadas pela planta e até mesmo condições ambientais, podem tanto induzir a germinação, quanto cessar o crescimento apical da hifa e induzir a formação do apressório. Essa indução tem sido observada até mesmo na ausência do hospedeiro, por exemplo, quando o conídio germina em superfícies como vidro ou membrana de nitrocelulose (BAYLEY *et al.*, 1992).

A adesão do apressório não somente permite que o fungo permaneça em contato com o hospedeiro o tempo necessário para a penetração, mas também coloca a hifa de infecção no local onde a penetração mecânica ou enzimática vai ocorrer. A formação do apressório é freqüentemente acompanhada pela secreção de um material mucilaginoso, com provável função de proteção contra calor ou frio excessivos (BAYLEY *et al.*, 1992).

A diferenciação do apressório requer a síntese de proteínas e é acompanhada por uma regulação precisa do comportamento nuclear. Em *Magnaporthea grysea* e em *Colletotrichum*, a divisão celular ocorre logo após a germinação do conídio. Um núcleo permanece no conídio, enquanto o outro, migra para o interior do apressório emergente. Durante a maturação do apressório ocorre outra mitose, produzindo um apressório binucleado. No processo de infecção, um núcleo se move para o interior do tecido infectado, enquanto outro permanece no apressório. O crescimento da hifa de infecção leva à formação de micélio multinucleado (BHAIRI *et al.*, 1990).

Estudos sobre a ultraestrutura do apressório têm demonstrado que a parede do mesmo, em várias espécies de *Colletotrichum,* apresenta características comuns. São compostas de 2 ou 3 camadas de carbohidratos, com melanina depositada entre elas. SUZUKI *et al* (1982) discutem que um dos produtos que requer a síntese de proteínas é a melanina. A melanina é responsável pela cor escura dos conídios e deve proteger contra irradiações, além de ter um papel fundamental no processo de penetração. KUBO

et al. (1987) e KUBO *et al.* (1991) sugerem que a melanina, por dar uma maior resistência à parede do apressório, faz com que este suporte uma alta pressão hidrostática, necessária para a penetração na cutícula.

O primeiro passo no desenvolvimento do fungo, dentro da célula ou na cavidade estomatal, é o desenvolvimento de uma estrutura globosa, a vesícula de infecção (MENDGEN & DEISING, 1993). Não se sabe se essas estruturas determinam a sobrevivência das células infectadas ou se elas se formam em conseqüência da sobrevivência das células (O' CONNELL & RIDE, 1990). Além disso, parece que essas vesículas têm um papel importante na definição da dimensão e orientação do crescimento da hifa de penetração (BOURETT & HOWARD, 1992).

As pesquisas com fungos fitopatogênicos há algum tempo têm se concentrado em análises de estruturas morfológicas ou em análises de genes, ou produtos gênicos, que provavelmente têm importância para a patogenicidade. No entanto, nos últimos anos, alguns fungos como *Colletotrichum* e *Magnaporthe*, têm sido estudados através do uso de técnicas de microscopia e bioquímica. Com isso, o entendimento das interações planta-patógeno tem melhorado, uma vez que tornou-se possível localizar, por microscopia eletrônica, produtos gênicos no local da interação e até mesmo no local da penetração. Estes resultados devem explicar resultados ambíguos que as técnicas moleculares, bioquímicas e microscópicas isoladamente não conseguiram.

A ocorrência e freqüência de fatores de virulência, em populações selvagens de fungos, têm sido detectada há muitos anos e vêm sendo estudadas, principalmente em programas de melhoramento para resistência. Isto indica que as populações são geralmente polimórficas para os genes que determinam a patogenicidade, embora a extensão do polimorfismo varie de acordo com o tempo e, principalmente, entre espécies. Os fatores de virulência estão sujeitos à intensa seleção por parte da população hospedeira.

O entendimento da genética e evolução das populações de fungos e da sua patogenicidade, poderia ser facilitado pela informação sobre a variabilidade dos caracteres e genes que não estão diretamente relacionados à patogenicidade e consequentemente, não sofrem uma seleção tão intensa como os fatores diretamente relacionados (NEWTON & CATEN, 1985). Essas informações poderiam mostrar se as raças são geneticamente homogêneas ou se comportam de forma heterogênea; se uma raça, em particular, atinge uma determinada população de uma única vez ou ,aparece

em ocasiões independentes, nos diversos "backgrounds" genéticos. Isso poderia sugerir as relações evolucionárias existentes em diferentes raças.

Um dos caracteres que vem sendo relacionado indiretamente à patogenicidade é a presença de RNA de dupla fita (ds RNA) em isolados hipervirulentos. DALE *et al.* (1988) verificaram que isolados, Tipos A e B de *C. gloeosporioides,* que causam antracnose em *Stylosanthes*, apresentam padrões eletroforéticos distintos para a presença de dsRNA. O papel destas moléculas, codificadoras de toxinas, é provavelmente a manutenção da integridade genética de diferentes grupos intraespecíficos. Há pouca evidência na literatura sobre o papel positivo dos dsRNA na patogenicidade dos fungos, mas em algumas espécies, a virulência reduzida tem sido correlacionada com a presença de componentes específicos contendo dsRNA (DAY & DOODS, 1979). No estudo com *Colletotrichum* é imprescindível determinar a forma de duplicação (autônoma ou encapsuladas como partículas virais) e se as mesmas são codificadas pelo genoma nuclear ou mitocondrial. Além disso, é possível desenvolver clones de cDNA para estudar a presença e homologia de moléculas específicas nas espécies.

A presença de plasmídios lineares de DNA, associados a fungos, é bastante divergente nos organismos. Não são ubíquos, nem apresentam origem viral. Têm sido identificados em uma série de fungos, inclusive em *Epichloe typhina*, o teleomórfico de *Acremonium*, um endófito de gramíneas (MOGEN *et al.*, 1991). Neste estudo, os autores discutem que apesar da ocorrência em grupos taxonomicamente bastante divergentes, a origem, significado funcional e as razões para sua manutenção ao longo da evolução, ainda permanecem sob especulação, uma vez que a maioria dos isolados, tanto de fungos quanto de plantas, não apresentam tais moléculas. Dos 22 isolados estudados na família Clavicipitaceae, tais plasmídios foram identificados em três espécies: *E. typhina*, *Claviceps purpurea* e *Balansia obtecta* e, aparentemente não apresentando qualquer vantagem para o organismo hospedeiro. Os isolados naturais de *E. typhina*, que não possuem esses plasmídios, apresentam as mesmas características daqueles que os contêm, como por exemplo a produção de alcalóides, a manutenção simbiótica nos tecidos vegetativos das gramíneas e inclusive, a capacidade de causar doenças. Provavelmente, esses plasmídios se comportam como parasitas moleculares ou devem

ter um papel na seleção genética, que não pode ser dimensionado apenas por testes em laboratório ou casas de vegetação.

Outros fungos, como *Agaricus bisporus*, vêm sendo estudados quanto à presença de dsRNA (HARMSEN *et al.*, 1991). Nestes fungos, mais de dez moléculas de RNAs e partículas virais podem ser coisoladas quando há manifestação de doenças. Nos fungos que não apresentam sintomas, essas moléculas, com peso molecular que varia de 0,8 a 3,6 kb, aparecem uma única vez, ou então, apresentam-se ausentes. Neste estudo, os autores identificaram através de hibridação molecular, usando sondas de dsRNA, três seqüências de dsRNA associadas com a doença.

As partículas citoplasmáticas "tipo vírus" (virus like-particle), as quais contêm uma ou mais moléculas lineares de dsRNA, têm sido freqüentemente observadas em vários gêneros de fungos. Estas viroses são, geralmente, não infecciosas e em algumas espécies estão associadas com fenótipo "killer", como é o caso de *Saccharomyces cerevisiae* e *Ustilago maydis*, ou com hipovirulência como no fungo fitopatogênico *C. parasitica* (NOSEK *et al.*, 1993). Entretanto, em muitos casos não se determinou ainda a função biológica destas moléculas.

2.2.2 Variabilidade detectada por marcadores moleculares em alguns fungos filamentosos

Um estudo das relações entre isolados de fungos e de sua estrutura populacional requer marcadores genéticos. Devido à escassez de relatos sobre o ciclo sexual, a análise genética clássica, principalmente em espécies de *Colletotrichum* não se torna viável, dificultando os meios de se obter informações dos possíveis mecanismos responsáveis pela variabilidade nestes fungos. Por isso, marcadores isoenzimáticos (CLARK, J. *et al.*, 1989), e outras técnicas que revelam polimorfismos como a eletroforese de proteínas (KAWCHUK *et al.*, 1988), densidade e conteúdo de C+G (BELKHIRI & DICK, 1988), plasmídios mitocondriais (KISTLER & LEONG, 1986), dsRNA (TOOLEY *et al.*, 1989), RFLP (HULBERT & MICHELMORE, 1989) ou RAPD (GUTHRIE *et al.*, 1992), estão sendo utilizadas.

DALE *et al.* (1988) demonstraram que os padrões de RNA dupla fita (dsRNA) são capazes de diferenciar isolados de *C. gloeosporioides*, porém por estarem associados com partículas virais e manterem-se como um componente citoplasmático, não indicam relações genéticas.

As comparações ao nível de DNA são as mais indicadas. BRAITHWAITE & MANNERS (1989) utilizando DNA fingerprinting, com sondas minisatélites e BRAITHWAITE *et al.* (1990a) utilizando RFLP, com sondas de DNA, escolhidas ao acaso, com baixo e alto número de cópias, verificaram que essas técnicas apresentaram um grande potencial para estudos genéticos, por gerarem fragmentos que se comportam como marcadores genéticos. Além disso, são freqüentemente multialélicos, podem ser determinados em todos os tecidos, são geralmente codominantes, não apresentam efeitos epistáticos e podem ser aplicados às formas teleomórficas e anamórficas dos fungos.

A análise do DNA ribossomal (rDNA) é uma outra alternativa que pode auxiliar na distinção de isolados, servindo como um marcador molecular de importância para a taxonomia. BRAITHWAITE *et al.* (1990b) reportaram que há diferentes padrões de polimorfismo, entre isolados de *C. gloeosporioides*. Foi utilizada uma série de isolados de leguminosas e frutas tropicais, comparando seus padrões de rDNA a um padrão de bandas de *C. gloeosporioides,* o qual infecta *Stylosanthes.* O polimorfismo se deve às variações no número e tamanho dos fragmentos de restrição, o que indica que o rDNA tem potencial como marcador taxonômico. Isto porque, apesar das regiões codificadoras dentro dos "repeats" de rDNA serem altamente conservadas, há uma considerável variação nas regiões espaçadoras não transcritas, entre e dentro das espécies.

COOLEY (1992) discute que a eletroforese em campo pulsado (PFGE), tem permitido a separação de moléculas de DNA, com até 10 megabases de tamanho. Isto possibilita a resolução de cromossomos intactos de muitos eucariotos inferiores, produzindo o que chamamos de cariótipo eletroforético. Por esta técnica, estão sendo revelados polimorfismos entre e dentro de espécies e populações, que as técnicas de citogenética clássica não puderam revelar, devido ao reduzido tamanho dos cromossomos desses organismos.

TAYLOR *et al.* (1991) descreveram a potencialidade do cariótipo eletroforético para estudos de organismos onde não há disponibilidade de análise genética. Em *Leptosphaeria maculans* identificou-se variação relacionada à virulência dos isolados. As

linhagens pouco virulentas apresentaram pelo menos quatro cromossomos a mais que os isolados altamente virulentos. Além disso, o conteúdo de DNA das linhagens pouco virulentas é cerca de 1,7 vezes o conteúdo das linhagens virulentas. Até então não havia sido verificada uma diferença tão grande entre isolados de uma espécie, levando os autores a considerar atualmente, que os isolados analisados fazem parte de diferentes espécies. Além das diferenças ao nível molecular, outras diferenças têm sido identificadas entre isolados dessa espécie. As linhagens pouco virulentas crescem mais rápido e tem maior produção de micélio aéreo, produzem um pigmento marrom em meio de Czapek, têm uma banda adicional de migração rápida para malato desidrogenase; enquanto as linhagens virulentas produzem sirodesmina PL, uma substância fitotóxica.

O cariótipo eletroforético de *C. gloeosporioides* tem demonstrado grande variação entre os isolados. MASEL *et al.* (1990) e MASEL *et al.* (1993) verificaram que a variação no cariótipo é resultado da presença de minicromossomos, os quais tem um tamanho entre 250 e 1200 kb e são facilmente visualizados em eletroforese de campo pulsado. No entanto, os mecanismos que levam a uma variação no cariótipo e seu significado na patogenicidade e especificidade de raças permanecem desconhecidos. Vários mecanismos podem ser propostos para explicar a variação entre os isolados. É possível que novos complementos cromossômicos, tais como translocações, duplicações e perdas cromossômicas surjam por rearranjos. Estes processos não necessariamente alteram toda a composição de seqüências do genoma, mas é uma maneira pela qual as seqüências se organizam nos cromossomos, em linhagens individuais. Uma segunda explicação para estas variações é que podem ter havido deleções do DNA que não são essenciais para a viabilidade ou patogenicidade.

Não há, até o momento, conclusões sobre o papel dos minicromossomos encontrados em *C. gloeosporioides*. No entanto, existem alguns exemplos em outros eucariotos inferiores, sugerindo sua relação com a patogenicidade. VAN DER PLOEG *et al.* (1984) verificaram que em *Trypanosoma* spp. existem genes que codificam para superfície de antígenos hipervariáveis, que são translocados, amplificados e expressos em mini-cromossomos. Outras evidências indicando que os rearranjos devem ter função importante, associada com patogenicidade e especificidade de fungos fitopatogênicos, surgiram de estudos com *Nectria haematococca,* onde verificou-se que genes codificadores de enzimas responsáveis pela degradação de fitoalexinas localizam-se em mini-cromossomos, instáveis meioticamente e altamente variáveis (MIAO *et al.*, 1991).

Em *C. gloeosporioides* não há indicações de que as variações encontradas nos minicromossomos estão associadas a qualquer função (MASEL *et al.* 1993).

O uso de marcadores RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") (WILLIANS *et al.* 1990), tem se mostrado útil nos estudos de microrganismos onde não se tem muita informação genética. A técnica é baseada na amplificação de fragmentos não específicos de DNA, em reações sucessivas de polimerização. Os oligonucleotídeos são construídos com seqüências aleatórias, ao contrário da PCR descrita por SAIKI *et al.* (1985); revelando polimorfismos em toda a extensão do genoma. Tais polimorfismos são reconhecidos pela presença de um fragmento amplificado em um dos genomas em relação à ausência deste mesmo fragmento em outro.

O método é interessante porque requer uma pequena quantidade de DNA, revela um grande número de marcas polimórficas, é rápido e automatizado. Suas principais aplicações, além dos estudos de variabilidade genética que serão apresentados a seguir, estão o "fingerprint" (WELCH & McCLELLAND, 1990), mapeamento (REITER *et al.* 1992) e a tipagem molecular de populações e espécies (GOODWIN & ANNIS, 1991).

Dentre os vários marcadores moleculares, empregados atualmente nos estudos de variabilidade de fungos filamentosos, como os RFLP, "DNA fingerprint", minisatélites entre outros, os marcadores RAPD serão discutidos em detalhe por terem sido empregados neste trabalho.

MILLS *et al.* (1992) estudaram a variação molecular de *C. gloeosporioides,* isolados de diferentes hospedeiros, analisando marcadores do tipo RAPD. Os resultados mostraram que houve uma considerável variação, tanto entre isolados de hospedeiros não relacionados, quanto entre isolados de um mesmo hospedeiro. Somente foi possível agrupá-los de acordo com sua origem geográfica. Diferenças no padrão de bandas foram observadas dentro de isolados de seringueira da Indonésia, isolados de *Stylosanthes* da Austrália e isolados de mamão do Sri Lanka. Por outro lado, os isolados de manga coletados em várias partes do mundo, revelaram uma uniformidade com pelo menos 3 primers. Os autores sugerem que essa falta de variação é resultado ou de uma introdução recente desses isolados ou então, de uma menor pressão seletiva.

ARNAU *et al.* (1994) avaliaram o potencial uso de RAPD na construção de um mapa genético de *Cladosporium fulvum,* baseado na recombinação mitótica. Isto porque, as análises de segregação evidenciaram um alto grau de recombinação, durante

o ciclo parassexual. Os resultados da segregação, dessa classe de marcadores dominantes na progênie parassexual, foram consistentes com os dados baseados em caracteres morfológicos e RFLP representando ainda, evidências para a existência de uma progênie haplóide. O estudo molecular de 49 RAPDs obtidos mostrou que, com exceção de um, todos os marcadores RAPD representavam DNA repetitivo.

MEIJER *et al.* (1994) avaliaram a variabilidade em *Phomopsis subordinaria*, originárias de 34 localidades na Europa, utilizando metodologias de isoenzimas, compatibilidade vegetativa e RAPD. Os resultados mostraram que as isoenzimas não foram capazes de revelar polimorfismo, enquanto o RAPD, revelou uma variação que não pode ser relacionada à distância geográfica. Embora os quatro iniciadores (primers) ensaiados para RAPD tenham mostrado variação, a similaridade foi alta (maior que 80%). Isso pode ser explicado pelo próprio princípio das técnicas. A eletroforese de isoenzimas cobre uma parte muito menor do genoma, ou seja, somente aquela que codifica as enzimas sob estudo, enquanto no RAPD, os sítios de anelamento podem estar em regiões alvo de seleção ou não (introns, DNA repetitivo, etc.). A grande variação encontrada para compatibilidade vegetativa (89 grupos entre 134 isolados de 34 localidades) foi surpreendente, comparada à baixa variação para os RAPDs e as isoenzimas.

A variabilidade genética de isolados de *Metarhizium anisopliae*, patógeno de muitos insetos e presente em várias áreas de cultivo de cana de açúcar na Austrália, foram estudados por marcadores RAPD, por FEGAN *et al.* (1993). Trinta isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e um isolado *M. anisopliae* var. *majus* foram comparados. Seis dos isolados classificados como variedade *anisopliae* mostraram maior similaridade ao isolado variedade *majus*, que aos outros *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Interessante é que isolados apresentando similaridade maior que 80%, foram coletados de uma mesma área geográfica. Ensaios de patogenicidade confirmaram que em alguns casos, os agrupamentos de RAPD indicaram o inseto hospedeiro. O que se pôde avaliar é que os isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* são extremamente diversos, quando comparados ao nível molecular usando RAPD, uma vez que isolados apresentando uma dissimilaridade maior que 70%, têm sido classificados como a subespécie *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Observações desse tipo, onde espécies de fungos definidas por caracteres morfológicos são geneticamente muito diversas, quando analisadas por

marcadores moleculares, têm sido obtidas com outras espécies de fungos, como *Uromyces appendiculatus* e *Phytophthora megasperma* (MACLEAN *et al.* 1993). Isso mostra que os marcadores morfológicos falham ao definir uma espécie como sendo geneticamente uniforme.

Até recentemente, a identificação de fungos entomopatogênicos foi baseada em detalhes morfológicos relacionados a produção de conídios. No entanto, a taxonomia permanece questionável e agora como muitos fungos estão sendo comercializados, critérios mais objetivos precisaram ser adotados. BIDOCHKA *et al.* (1994) utilizaram marcadores RAPD nos estudos com *Metarhizium* (*M. anisopliae*, *M. flavoviride*, linhagens não identificadas de *Metarhizium*) e *Beauveria bassiana* interessados na estrutura de populações e taxonomia desses fungos. Os resultados mostraram que *M. flavoviride* mostrou pouca variabilidade intraespecífica (75% de similaridade) quando comparado a *M. anisopliae*. O alto nível de variabilidade encontrado em *M. anisopliae* (menos de 25% das bandas foram comuns entre as linhagens) foi comparável à variabilidade total entre *B. bassiana, M. flavoviride e M. anisopliae*. Isso sugere que *M. anisopliae* possa pertencer a um grupo de espécies crípticas, onde existem linhagens geneticamente distintas, que sofreram uma evolução divergente, a partir de um ancestral comum. Em contrapartida, *M. flavoviride* sugere uma origem clonal para as várias linhagens encontradas no mundo. Essa natureza clonal, segundo os autores, mostra uma origem comum e talvez uma história evolutiva recente, em comparação com *M. anisopliae*.

GOODWIN & ANNIS (1991) utilizaram marcadores RAPD para diferenciar patótipos e estudar a variabilidade de *Leptosphaeria maculans* isolados de várias regiões do Canadá. Os coeficientes utilizados mostraram uma alta similaridade para os vários patótipos em estudo, sugerindo que a distância geográfica não é grande o bastante para que haja uma maior divergência. Uma aplicação prática da técnica de RAPD seria na identificação dos microrganismos. A identificação de patótipos e variantes, dentro dos patótipos definidos, são úteis nos estudos de população e manejo de doenças.

Os estudos de genética molecular nestes e em vários outros fungos tornaram-se uma alternativa para entender a base molecular das especificações de raças e das relações que muitos isolados, que não apresentam uma patogenicidade aparente, estabelecem com seus hospedeiros.

2.3 Os sistemas de transformação genética e a análise do genoma em fungos filamentosos

A base genética e bioquímica da patogenicidade em fungos fitopatogênicos têm, há muitos anos, intrigado pesquisadores. Isto se deve principalmente, à falta de mutantes geneticamente definidos e ao pequeno número de sistemas meióticos conhecidos. Tradicionalmente, processos fisiológicos em microrganismos, têm sido entendidos por análise de mutações ou então, por inibidores químicos específicos. Entretanto, muitos fungos filamentosos são multinucleados em parte ou em todo o seu ciclo de vida, dificultando a análise das mutações. Em geral, espécies de *Colletotrichum* possuem conídios com apenas um núcleo ao longo do seu ciclo de vida, mas mesmo assim, é reduzido o número de mutantes bioquímicos estudados. As mutações melhor caracterizadas incluem as relacionadas á biossíntese de cutinase (DICKMAN & PATIL, 1986) e melanina (RASMUSSEN & HANAU, 1989).

Um dos maiores problemas na análise de mutações é a geração de mutações múltiplas, durante o processo de mutagênese. Em *Saccharomyces cerevisiae* e *Neurospora crassa*, tais mutações podem ser eliminadas por cruzamentos entre a linhagem selvagem e os mutantes, durante o processo de seleção da progênie. Na maioria dos fungos, de importância agronômica ou industrial, isso não é possível devido à ausência de sistemas de cruzamento bem definidos. A ausência destes sistemas também dificulta a análise de complementação entre mutantes fenotipicamente idênticos.

Ciclos meióticos, em espécies de *Colletotrichum* (anamorfo de *Glomerella*), são raros (SUTTON, 1980) e predominantemente homotálicos, embora tenha sido observado certo heterotalismo em algumas espécies como *G. graminicola*, *G. magna*, e *G. cingulata* f.sp. (VAILLANCOURT & HANAU, 1991). Quando a análise meiótica pode ser realizada, é possível determinar o número de genes responsáveis por certas mutações, estabelecer o mapa de ligação entre genes, localizar genes de interesse e estimar o número de cromossomos presentes no genoma.

Até recentemente, a ausência de ciclo sexual e análise de mutações limitaram severamente o entendimento do processo patogênico de muitos fungos filamentosos. No

entanto, o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular abriu novas possibilidades para se esclarecer muitos dos aspectos descritos acima, e a transformação genética, pela possibilidade de se retirar DNA de um isolado ou espécie e transferi-lo para outro, possibilitou que aspectos como a base genética da patogenicidade pudesse ser melhor entendida.

O processo de transformação em fungos filamentosos compreende pelo menos 5 etapas. O requisito básico para o sucesso da transformação inclui células competentes (capazes de captar o DNA), o vetor de transformação, o transporte do vetor ao núcleo, duplicações e expressão do vetor e um método eficiente de identificação das células transformadas.

As células competentes, usualmente protoplastos, são derivadas de micélio, conídios ou conídios germinados (FINCHAM, 1989). Existe portanto, a necessidade de se romper pelo menos duas barreiras potenciais: a membrana plasmática e a nuclear.

Em eucariotos superiores, a membrana nuclear desaparece durante a mitose, o que possibilitaria, pelo menos em princípio, que a transformação ocorresse enquanto o núcleo estivesse desprovido de membrana. Mas isso não acontece em fungos filamentosos e leveduras (GROTELUESCHEN & METZENBERG, 1995). Os protocolos, mais freqüentemente utilizados, envolvem a remoção enzimática da parede celular do micélio ou conídio, gerando protoplastos osmoticamente sensíveis. A parede celular é normalmente removida por complexos de enzimas digestivas, tal como Novozym 234^{MR}, em meio osmótico. Os protoplastos se formam por extrusão do citoplasma, através dos poros gerados pela remoção da parede celular ou, pelo micélio desprovido de parede celular. Protoplastos formados por extrusão do citoplasma, formam uma população que varia a sua constituição citoplasmática, onde apenas alguns contêm todo o componente citoplasmático. Já os protoplastos formados a partir de micélio ou conídios inteiros, que tiveram a parede celular retirada, devem conter todos os componentes citoplasmáticos necessários para regeneração e teoricamente representam uma população mais competente que a anterior (DAVIS, 1985).

A freqüência de transformação, de fungos filamentosos e leveduras, utilizando células intactas é extremamente baixa, por isso é que as células são convertidas a protoplastos. No entanto, mesmo entre os protoplastos somente uma minoria de células expostas ao DNA exógeno sofre transformação. Isso porque, segundo

GROTELUESCHEN & METZENBERG, (1995) a transformação é um evento raro e que ocorre ao acaso, apesar das células serem idênticas funcionalmente.

A estabilidade osmótica dos protoplastos é mantida pelo emprego de sais, como sulfatos de magnésio e amônio, cloretos de magnésio e potássio e açúcares, incluindo sorbitol e sacarose. Variações nesses métodos têm sido aplicadas por muitos grupos e adaptadas às mais variadas espécies. A competência dos protoplastos é normalmente medida pela eficiência de transformação, a qual refere-se ao número de transformantes obtidos por micrograma de vetor de DNA. O mecanismo da formação de protoplastos parece não ser o maior responsável pela eficiência de transformação, uma vez que um dos mais eficientes sistemas para produção de protoplastos é aquele que produz por extrusão citoplasmática (CHAKRABORTY & KAPPOR, 1990). No entanto, a qualidade dos protoplastos é mais importante que o mecanismo envolvido na sua formação, não sendo necessariamente refletida no número gerado, mas sim, na viabilidade, aparência e outros fatores inerentes à técnica, como os lotes de enzimas por exemplo (FINCHAM, 1989).

Uma vez preparadas as células competentes, a transformação prossegue pela entrada de DNA. Essa entrada de DNA pode ser otimizada preparando-se as células competentes livres de enzimas nucleolíticas, as quais degradam o DNA. Resíduos de enzimas líticas e qualquer lise celular, que ocorre durante o preparo dos protoplastos, resultam em liberação de nucleases, que podem degradar o DNA. Nucleases extracelulares podem ser removidas, por sucessivas lavagens dos protoplastos com tampão osmótico, para diminuir esses efeitos. Pouco se sabe sobre o transporte de DNA da membrana plasmática ao núcleo, por isso torna-se difícil determinar seu efeito no processo de transformação (RODRIGUES & REDMAN, 1992).

Após a entrada do DNA no núcleo, este precisa ser duplicado, genes seletivos transcritos em um RNA mensageiro, que será traduzido em proteínas funcionais permitindo assim, a seleção dos transformantes. Em geral, a maioria dos eventos de transformação em fungos filamentosos envolve a integração do DNA transformante no genoma nuclear da célula receptora. O DNA integrado se duplica e é transcrito junto com o DNA da célula receptora. A integração pode ocorrer em um único ou em vários sítios, como simples ou múltiplas cópias, e em sítios específicos ou ao acaso, como mostra a Figura 2 (TIMBERLAKE & MARSHALL, 1989)

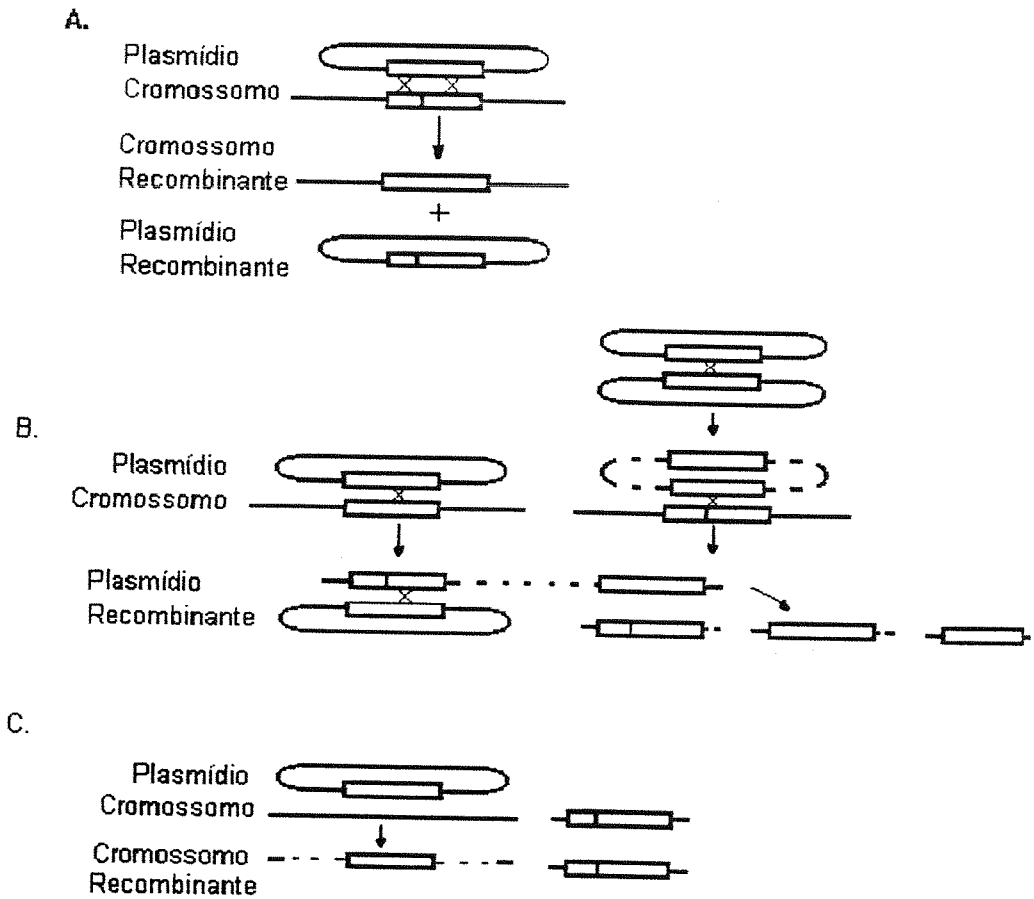

Figura 2. Transformação com plasmídio circular de DNA. (A) Recombinação homóloga, resultado de um evento de permuta dupla ou conversão gênica; (B) Recombinação homóloga, resultado de um evento de permuta simples; (C) Recombinação heteróloga, resultado de recombinação dentro da seqüência gênica, que pode levar à inativação (TIMBERLAKE & MARSHALL, 1989).

2.3.1 Os marcadores seletivos dominantes

Os sistemas de transformação em fungos têm sido consideravelmente estudados desde que foram descritos para *S. cerevisiae* (HINNEN *et al.*, 1978) e *N. crassa* (CASE *et al.*, 1979). Até recentemente, não havia sido descrito o desenvolvimento de sistemas de transformação para fungos filamentosos, de importância agronômica e industrial. Isto

porque, não existem linhagens geneticamente bem definidas, com mutações auxotróficas que podem ser complementadas pelos clones recombinantes que contêm o alelo selvagem correspondente, conforme fora discutido anteriormente. Entretanto, os mutantes se tornam desnecessários, se o vetor de transformação carregar um gene dominante selecionável nas linhagens selvagens (TURGEON *et al.*, 1985).

As principais marcas dominantes utilizadas têm sido: resistência a antibióticos (higromicina B, fleomicina oligomicina, bleomicina e G418), resistência a fungicidas (benzimidazóis), sulfonamidas e utilização de acetamida.

Uma das maiores vantagens de se utilizar marcadores seletivos dominantes é que o genótipo não precisa ser conhecido. É este o fato que tem possibilitado a aplicação desses marcadores em espécies para as quais há poucos ou, inexistem marcadores auxotróficos.

A freqüência de transformação obtida com genes de resistência não é muito alta, quando comparada aos marcadores auxotróficos. Isto porque, a maioria das colônias com crescimento vigoroso, facilmente detectada em meio seletivo, freqüentemente contêm integração de múltiplas cópias do plasmídio sendo mais rara a integração de cópias únicas (TURNER, 1994). Por isso, esse tipo de marcador tem sido utilizado preferencialmente em fungos onde é difícil obter um grande número de mutações e a disponibilidade de cruzamento sexual, para construir combinações favoráveis, é restrita.

O gene *amdS* de *A. nidulans,* que codifica acetamidase, uma enzima que converte acetamida à acetato e amônia, permitindo consequentemente o crescimento em acetamida como fonte de nitrogênio, tem sido viável na transformação de *Cochiolobus heterostrophus*, um patógeno de milho (TURGEON *et al.*, 1985). Um marcador quimérico, consistindo de um promotor de *C. heterostrophus* fusionado ao gene hygB de *E. coli*, que confere resistência ao antibiótico higromicina B aos transformantes, foi empregado na transformação de uma série de fungos incluindo *C. graminicola*, *L. maculans*, *N. haematococca* (TURGEON *et al.*, 1987).

RODRIGUES & YODER (1987) transformaram *G. cingulata* (anamorfo: *C. lindemuthianum*), usando como marcadores seletivos, o gene *amdS* de *A. nidulans* e o gene *hygB*^{r} de *E. coli.* A transformação ocorreu por integração de cópias únicas e múltiplas, de ambos os plasmídios, dentro do genoma do fungo. Apesar dos mutantes serem mitoticamente estáveis em meios seletivos e não seletivos, a eficiência de

transformação foi baixa (0,2 colônia/μg de DNA plasmidial). Tais transformantes foram capazes de infectar feijão e após a recuperação dos tecidos infectados, os autores observaram que as plantas hospedeiras mantinham o fungo transformado.

Outro marcador dominante, que vem sendo utilizado na transformação de fungos filamentosos é o benomil. Uma das vantagens da ampla utilização de benomil é seu custo reduzido e a disponibilidade no mercado. Além disso, sendo o benomil largamente aplicado como um agente antifúngico, ocorrem naturalmente linhagens resistentes das quais poderiam ser isolados os genes, para construção de sistemas homólogos. Os estudos mostram que os benzimidazóis bioativos são inibidores específicos dos microtúbulos, atuando na molécula heterodimérica da tubulina, a principal proteína componente dos microtúbulos. A resistência ao benomil, em vários Ascomicetos, tem sido atribuída a mutações nos genes que codificam para a subunidade β da tubulina (DAVIDSE, 1986).

PANACCIONE *et al.* (1988) transformaram *C. graminicola* com genes homólogo (β- tubulina) e heterólogo (*tub-2* de *N. crassa*), de resistência ao benomil. Cerca de 13 transformantes/ μg de DNA plasmidial foram obtidos em ambos os sistemas, concluindo que a eficiência pode ser conseguida tanto com o gene de *N. crassa* quanto com o de *C. graminicola*. As análises de hibridações por Southern blot demonstraram que o gene *tub-2* de *N. crassa*, clonado no plasmídio pBT_6 e o gene de *C. graminicola*, clonado no plasmídio pCG_7 , apresentavam certa homologia com o genoma de *C. graminicola* não transformado, sugerindo haver dois genes para β- tubulina, com alguma divergência na seqüência de nucleotídeos. Baseando-se nos sinais de hibridação, pCG_7 hibridou-se preferencialmente com um tipo de fragmento e pBT_6 com outro. A transformação se deu por integração do gene ao genoma do fungo, sendo o fenótipo dos transformantes altamente estável durante crescimento "in vitro", na ausência de seleção. Na infecção de "seedlings" de milho, os transformantes produziram sintomas típicos aos causados pelo fungo não transformado.

Esses mesmos sistemas têm sido utilizados para a transformação de outros fungos. BLACKMORE *et al.* (1989) reportaram a transformação de *Pseudocercosporella herpotrichoides* usando dois métodos positivos de seleção, um baseado na resistência à higromicina B e outro na resistência ao benomil. O gene *hph* (higromicina B fosfotransferase) embora seja um gene bacteriano, pode ser expressado em várias

espécies de fungo, sob o controle de sinais de expressão dos genes *gpd* e *trpc* de *A. nidulans*. O gene *bml* (resistência ao benomil) de *N. crassa* representa outro gene heterólogo (neste caso de origem fúngica), que pode ser expressado em *P. herpotrichoides*. Os resultados mostraram eventos similares de integração para ambos os vetores, apesar de *bml* ter uma maior homologia com o *P. herpotrichoides*. Ambos os vetores apresentaram integração de múltiplas cópias, sendo provavelmente uma integração em sítios não homólogos (tipo II). A análise mitótica mostrou estabilidade (referente à taxa de crescimento e morfologia) para os transformantes obtidos com o plasmídio pAN7.1 (gene *hygB*) e uma instabilidade com crescimento alterado, dos transformantes obtidos com o plasmídio pBT_3 (gene *bml*).

COOLEY *et al.* (1990) utilizaram a transformação como uma estratégia para investigar a indução da expressão gênica em *Septoria nodorum* e para isso empregaram o gene homólogo de resistência ao benomil, uma vez que a expressão pode ser avaliada tanto "in vitro" quanto "in planta". Obteve-se uma baixa freqüência de transformação (5 transformantes/μg de DNA) e uma alta freqüência de pequenas colônias crescendo inclusive nas placas controle. Ao testarem os transformantes em meio contendo concentrações maiores de benomil, os autores verificaram que as colônias maiores foram capazes de crescer em concentrações que inibiam totalmente o crescimento do selvagem, enquanto as menores não cresceram, nem mesmo, na concentração utilizada para a seleção. Apesar de terem utilizado um sistema homólogo de transformação, a eficiência conseguida foi comparável àquelas dos sistemas heterólogos. Em um estudo subsequente, COOLEY *et al.* (1991) utilizaram o gene clonado de *S. nodorum* e transformaram outros fungos como *L. maculans*, sugerindo que os genes para β-tubulina são altamente conservados entre Ascomicetos e Deuteromicetos, não sendo portanto, um fator determinante da eficiência de transformação.

FERNÁNDEZ-LARREA & UTAHL (1989) transformaram *Podospora anserina* com o gene de resistência ao benomil (*tub-2* de *N. crassa*). Das colônias resultantes da transformação, 12% foram incapazes de crescer após transferência para o meio com 1μg/ml de benomil, sendo consideradas abortivas. As análises de hibridação dos transformantes mostraram que houve preferencialmente, integração heteróloga em sítios únicos e múltiplos.

NOVAK & KUCK (1994) também desenvolveram um sistema de transformação para *Acremonium chrysogenum,* baseando-se no gene homólogo de resistência ao benomil. Entretanto, a eficiência de transformação não foi melhor que as obtidas com genes heterólogos. O problema, segundo os autores está na dificuldade de se obter altas taxas de transformação em *A. chrysogenum* e não, necessariamente refere-se ao marcador, uma vez que outros autores obtiveram resultados semelhantes empregando outros marcadores.

PILGERAN & HENSON, (1990) utilizaram, como marcador seletivo na transformação de *Gaeunaromyces graminis,* a resistência à fleomicina, um antibiótico que interage com o DNA de organismos suscetíveis, clivando preferencialmente os "repeats" invertidos (DNA de fita simples) e os sítios não metilados (DNA de dupla fita). Os resultados mostraram que a integração das seqüências ocorreu em diferentes sítios e com vários números de cópias no genoma do fungo, constituindo-se num fato importante, porque permite o isolamento de mutantes adicionais e caracterização de genes específicos. Não foi observada correlação entre número de cópias e o tipo de vetor utilizado (circular ou linear), mas notou-se correlação entre número de cópias e resistência a drogas. O fenótipo dos transformantes foi estável mitoticamente, durante crescimento em meio não seletivo e mostraram-se com o mesmo potencial fitopatogênico dos selvagens. O sistema de transformação foi desenvolvido para servir de base nos estudos dos determinantes patogênicos e das interações hospedeiro-parasita nesses organismos.

SÁNCHEZ-FERNANDEZ *et al.* (1991) interessados em estudar a via biossintética das giberelinas (promotores de crescimento em plantas), transformaram *Giberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*), um fungo utilizado comercialmente na produção desse hormônio, com o gene de nitrato redutase (*niaD*) de *Aspergillus niger.* Com uma freqüência de transformação de 1-2 transformantes/μg de DNA, mostraram a possibilidade de se usar esse sistema heterólogo para transformação. Análise de Southern blot mostrou uma freqüência alta de integração do vetor em um único sítio no DNA cromossomal.

2.3.2 Métodos alternativos de transformação

Para muitos dos sistemas de transformação descritos, a obtenção de protoplastos parece ser uma etapa essencial para uma maior eficiência de transformação, conforme fora discutido anteriormente. Principalmente referindo-se a fungos filamentosos, que apresentam parede celular espessa, que dificulta a entrada de DNA exógeno.

Um dos primeiros métodos alternativos, que não necessita da preparação de protoplastos, é o emprego de altas concentrações de acetato de lítio em combinação com PEG (polietilenoglicol), para induzir a permeabilidade das células intactas ao DNA transformante. Inicialmente desenvolvido para *S. cerevisiae* (ITO *et al.*, 1983), esse método foi estendido para *N. crassa* (DHAWALE *et al.*, 1984) e *Coprinus logopus* (BENNINGER *et al.*, 1987). Não se sabe como o acetato de lítio auxilia na entrada do DNA em células intactas e esse método não é freqüentemente utilizado em fungos filamentosos. Entretanto, DICKMAN (1988) transformou *Colletotrichum trifoli* com os genes de resistência à higromicina B e β - tubulina, tratando células intactas com álcalis e PEG. Quando comparado à metodologia de protoplastos este protocolo foi bastante ineficiente, uma vez que obteve-se uma baixa eficiência de transformação (0.4- 1 transformante ben^R e 5 a 10 higromicina B/ μg de DNA) e uma alta taxa de transformantes instáveis (75% das colônias originais perderam a resistência, após transferência para os meios de cultura), mas constitui-se numa alternativa para os sistemas de transformação em fungos que apresentam problemas na remoção da parede ou na viabilidade de protoplastos.

Outros métodos de transformação genética vêm sendo desenvolvidos para transferência de DNA em células eucarióticas. Recentemente, a eletroporação tem sido empregada para promover a entrada de DNA nas células de fungos filamentosos. Já foi empregada em *Fusarium solani* e *Aspergillus nidulans* (RICHEY *et al.*, 1989), *N. Crassa* (CHAKRABORTY & KAPOOR, 1990), entre outros.

GOLDMAN *et al.* (1990) reportaram a transformação de *Trichoderma harzianum* usando pulsos de alta voltagem para promover a competência das células. Foram obtidos, em média, 400 transformantes/μg de DNA, uma freqüência comparável à obtida

pelos métodos usando $CaCl_2$ e PEG com transformantes bastante estáveis (100% após 5 gerações de crescimento em meio não seletivo).

Quando uma célula é exposta a um campo elétrico, os componentes da membrana ficam polarizados e surge uma diferença de potencial através da membrana. Se a voltagem excede o nível limiar, a membrana rompe-se em áreas localizadas e as células ficam permeáveis a moléculas exógenas. Esta permeabilidade induzida é reversível, se a magnitude ou duração do campo elétrico não exceder o limite crítico. Neste caso o dano à célula torna-se irreparável (SHIGEKAWA & DOWER, 1988).

Não existe um padrão elétrico médio estabelecido para a eletroporação. Para estabelecer parâmetros para um novo sistema deve ser considerado o tamanho da célula, a sua viabilidade após o choque ser desferido e a condutividade do meio de eletroporação (GOLDMAN *et al.*, 1990).

Células também podem ser transformadas por disparos de microprojéteis revestidos com ácidos nucléicos, que atravessam a parede e membrana celulares. O método, inicialmente descrito para plantas, não utiliza protoplastos e tem provado ser eficiente para transformar células intactas de leveduras e fungos (ARMALEO *et al.*, 1990). Em fungos filamentosos têm sido utilizados tanto micélios (BAYLEY *et al*, 1993) quando conídios (HILBER *et al.*, 1994; FUNGARO *et al.*, 1995). Os microprojéteis utilizados são partículas de ouro ou tungstênio e o método, conhecido como biolística ou bombardeamento de partículas, requer um aparelho apropriado.

BAYLEY, *et al.* (1993) transformaram micélio de *Phytophthora* spp com bombardeamento de partículas, utilizando um plasmídio contendo o gene da β-glucuronidase e resistência a higromicina B. Os resultados mostraram que pode-se obter transformantes estáveis, a partir de micélio e que o DNA atinge eficientemente, as células-alvo. O maior problema no entanto, reside no fato de que muitos fungos apresentam micélio multinucleado, inclusive *Phytophthora* spp, e durante a transformação o DNA pode atingir apenas um dos núcleos, gerando transformantes instáveis. Quando os autores avaliaram a atividade GUS (β-glucuronidase), em zoosporos de *Phytophthora* spp, verificaram que a expressão desse gene quimérico era possível, mas havia uma diferença na intensidade de coloração para a atividade GUS e essa diferença não podia ser eliminada por transferências dos setores, que

apresentavam a coloração, para meio seletivo. Este padrão heterogêneo pode ter sido efeito da segregação genética devido à presença de vários núcleos no micélio.

Para evitar problemas de instabilidade de transformantes, devido à presença de micélio multinucleados, HILBER *et al.* (1994) transformaram conídios do fitopatógeno *Botryotinia fuckeliana,* por biolística. Os experimentos realizados demonstraram que a eficiência de transformação não foi afetada pela pressão de hélio, concentração de sorbitol, ou tamanho da partícula. Um período de 17 horas, entre o bombardeamento e a adição do meio seletivo, necessário para a reparação de danos mecânicos, não alterou a eficiência de transformação. FUNGARO *et al.* (1995) também transformaram conídios de *A. nidulans argB*$^-$, com o plasmídio pFB39. Os transformantes apresentaram-se estáveis, após várias passagens em meio não seletivo e a eficiência de transformação foi considerada boa (81 transformantes / μg de DNA). Em ambos os experimentos de transformação de conídios, foi possível comprovar por Southern blot que o DNA integrou-se no genoma do fungo.

2.3.3 Fatores que interferem na transformação

Alguns microrganismos incorporam naturalmente DNA exógeno e em certas condições, quase todas as células são transformadas. No entanto, a maioria das células de bactérias, fungos, plantas e animais precisa de tratamentos especiais para a retirada da membrana ou parede celular, e mesmo assim, somente uma pequena porção das células é tipicamente competente para a transformação. Curiosamente, as células que se tornam competentes, são facilmente cotransformadas, ou seja, incorporam e expressam mais de uma molécula. Uma possível explicação para isso é que o procedimento para gerar células competentes é ineficiente na remoção da barreira para a transformação, mas uma vez removida, a transformação facilmente acontece. Alternativamente, as células podem ser heterogêneas em muitos dos aspectos que afetam a competência para transformação (MIAO *et al.*, 1995).

Se somente algumas células derivadas de uma população se tornam competentes, resta saber o que faz com que as outras permaneçam não competentes. É possível que apenas um pequeno número de células tenha membrana plasmática

permeável ao DNA transformante, limitando a freqüência de transformação ou então, a competência deve ser limitada por algum outro fator como característica do núcleo, por exemplo. Para ensaiar essas hipóteses, GROTELUESCHEN & METZENBERG (1995) transformaram protoplastos heterocarióticos de *N. crassa*. Assim, a linhagem sob condições seletivas, é forçada a levar pelo menos um representante de cada núcleo em um mesmo citoplasma. Os protoplastos foram cotransformados com plasmídios distintos: um deles conferia prototrofia a aminoácidos aromáticos e o outro ao inositol. Os resultados mostraram que diferentes moléculas tendem a se integrar no mesmo núcleo, sugerindo que a competência da membrana citoplasmática não é suficiente para haver a transformação, uma vez que existe também uma barreira ao nível nuclear.

Existem, pelo menos, 4 métodos para transferência de DNA em células eucariotas e as dificuldades na eficiência de transformação têm limitado o desenvolvimento molecular de muitos sistemas biológicos. A maioria dos fungos filamentosos tem eficiência de transformação muito baixa (0-10 transformantes /μg de DNA) e vários são os parâmetros que influenciam os resultados, sendo alguns discutidos a seguir.

A qualidade dos protoplastos e sua capacidade de regeneração podem ser considerados fatores responsáveis pelo sucesso de uma transformação. Normalmente, o que se encontra nos conídios, em processo de protoplastização, é a presença de uma população mista de protoplastos, constituída por protoplastos grandes e pequenos. SKATRUD *et al.* (1987) verificaram que os protoplastos maiores regeneraram melhor suas paredes celulares que os pequenos. Estes protoplastos pequenos provavelmente, referem-se a protoplastos anucleados ou até mesmo, protoplastos que perderam muitos de seus componentes citoplasmáticos durante a exposição às enzimas líticas (TEBEEST & WEIDMANN, 1990).

A idade da cultura pode afetar significativamente a eficiência de transformação. Tecidos jovens, em crescimento exponencial, são capazes de captar mais DNA que tecidos mantidos por um longo período em cultura (DICKMAN, 1988).

JUDELSON *et al.* (1993) avaliaram a interferência da condição fisiológica das culturas na transformação de *Bremia lactucea*. Observaram que a utilização de hifas jovens minimizou a freqüência de protoplastos vacuolados, enquanto micélio de culturas em fase estacionária, gerou poucos protoplastos viáveis e muitos debris celulares.

A idade da cultura, o estabilizador osmótico e as enzimas líticas ou os complexos enzimáticos, foram os grandes responsáveis pelo sucesso da produção e regeneração de um grande número de protoplastos, obtidos a partir de conídios, em *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (TEBEEST & WEIDMANN, 1990). Um pré-tratamento dos conídios com β- mercaptoetanol (0.1%), EDTA (0.1M) e cisteína (0.1%), promoveu a protoplastização de 50% dos conídios, contra 18% dos que não sofreram o pré-tratamento antes da adição de Novozym 234^{MR}. Provavelmente o mercaptoetanol, e não a cisteína ou o EDTA, é o responsável pela melhor protoplastização, uma vez que ao ser testada a protoplastização sem o EDTA e a cisteína, não se verificou alteração significativa nos resultados. Quanto ao estabilizador osmótico, a sacarose, KCl e o $MgSO_4$ mostraram os melhores resultados para regeneração (80-84%).

A adição de estabilizador osmótico à solução de PEG, usada na incubação dos protoplastos em processo de transformação, aumentou a freqüência de regeneração de 9% a 18% em *Acremonium* sp (MURRAY *et al.*, 1992). Segundo os autores, os estabilizadores favorecem a estabilidade dos protoplastos e sua omissão, em muitos protocolos, faz com que a taxa de transformantes seja bem menor.

SKATRUD *et al.* (1987) sugeriram que a transformação com plasmídios lineares aumentou, em cerca de 2 a 3 vezes, a eficiência em *Cephalosporium acremonium*. Já WNENDT *et al* (1990) correlacionaram o aumento do número de transformantes, obtidos com plasmídios lineares em *Aspergillus giganteus*, à concentração de DNA do vetor (entre 10 e 25 μg de DNA). Concentrações menores não apresentaram qualquer diferença. Os autores acreditam que deve ser por causa da alta atividade exonucleásica, detectada na suspensão de protoplastos, a qual reduz a quantidade efetiva de DNA transformante. Entretanto, MURRAY *et al.* (1992) observaram que os transformantes, resultantes do emprego de plasmídios lineares foram mais estáveis (60%) que os circulares (25%), apesar de não alterarem a eficiência de transformação.

REDMAN & RODRIGUES, (1994) ao transformarem espécies de *Colletotrichum*, verificaram que a linearização dos plasmídios aumentou a eficiência de transformação de 2000 a 6200 transformantes/ μg de DNA. A hipótese para explicar esses resultados é que os vetores linearizados são mais facilmente integrados ao DNA genômico e consequentemente, mais estáveis ou então, são mais facilmente duplicados com o DNA nuclear.

A incubação dos transformantes na ausência de seleção por um período de 18 a 24 horas, parece ser importante para que haja expressão da resistência. GOETTEL *et al.* (1990) transformaram *M. anisopliae*, com o gene de resistência ao benomil e verificaram que os protoplastos transformados não regeneraram quando misturados diretamente com o meio de seleção. A adição da droga, logo após a transformação, pode resultar na inibição de prováveis transformantes enquanto, um atraso na adição, pode resultar na inibição do crescimento do transformante, pelo crescimento de protoplastos não transformados. Por outro lado, HENSON *et al.* (1988) incubaram os protoplastos transformados de *G. graminis*, diretamente em meio contendo benomil. Além disso, verificaram que era necessária uma concentração maior de benomil para selecionar os transformantes resistentes, que aquela utilizada inicialmente. Isso indica, que a sensibilidade dos protoplastos ao benomil e a taxa de expressão dos genes de resistência, varia entre as espécies de fungo.

Sequências de DNA fúngico que permitem a replicação autônoma de plasmídios, conhecidas como seqüências de replicação autônoma ou *ARS*, são outra forma de aumentar a freqüência de transformação. As principais fontes para essas origens de replicação são: DNA cromossomal, plasmidial e mitocondrial. Em leveduras, os plasmídios que contêm estas seqüências apresentam um aumento na freqüência de transformação, comparados aos plasmídios que transformam por integração cromossômica. No entanto, pouco se sabe sobre os ARS em fungos filamentosos. BUXTON & RADFORD (1984) não obtiveram sucesso em isolar ARS de *N. crassa*, ao mesmo tempo em que BALLANCE & TURNER (1986) construíram um banco genômico com alguns clones capazes de aumentar a freqüência de transformação. Mais recentemente, GEMS *et al.* (1991) isolaram um autêntico ARS de *Aspergillus.* A sequência, conhecida como *AMA1* (autonomously maintained *Aspergillus*), ao ser inserida em um vetor plasmidial conferiu um aumento de 250 vezes na freqüência de transformação de *A. nidulans*, e mostrou que o plasmídio resultante se comportava como um plasmídio de replicação autônoma. KISTLER & BENNY (1992) isolaram um ARS funcional em *Nectria haematococca*, o qual foi recuperado de um plasmídio integrativo. Com isso foi observado um aumento de 100 vezes na freqüência de transformação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados endofíticos de *Colletotrichum musae*

Os fungos endofíticos utilizados neste estudo pertencem à coleção do setor de Genética de Microrganismos da ESALQ/USP e foram coletados por PEREIRA *et al.* (1993), que realizou um trabalho de isolamento e caracterização, em folhas jovens e sadias de *Musa cavendishii* var. Nanicão, na região produtora do Vale do Ribeira- SP, como mostra a Tabela 2.

Os isolados foram purificados pela obtenção de colônias monospóricas, cultivados em meio completo (PONTECORVO *et al.*, 1953) e deixados à luz ultravioleta (UV), para estimular a esporulação.

Tabela 2. *Colletotrichum musae*, isolados a partir de folhas de *Musae cavendish* var. Nanicão.

Isolado	Localidade	Ano de isolamento
1.2	Registro	1992
1.3	Registro	1992
1.4	Registro	1992
7.1	Registro	1992
14	Registro	1992
21	Registro	1992
33	Registro	1992
1	Miracatu	1993
3	Miracatu	1993
5	Miracatu	1993
6	Miracatu	1993
10	Juquiá	1993
12	Juquiá	1993
17	Juquiá	1993

* Os fungos foram isolados entre os meses de março e abril dos referidos anos.

3.2 Meios de cultura

** Todos os meios de cultura, soluções e tampões utilizados, foram esterilizados em autoclave a 1 atm/15 minutos, com exceção dos itens 3.3.1 e 3.3.4.

3.2.1 Meio completo (MC) (PONTECORVO *et al.*, 1953)

$NaNO_3$	6,0 g
KH_2PO_4	1,5 g
KCl	0.5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,5 g
$FeSO_4$	10 mg
$ZnSO_4$	10 mg
Glicose	10 g
Peptona	2,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Solução de vitaminas	1 ml (vide item 3.3.1)
Ágar	15 g
Água destilada	1000 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1N.

3.2.2. Meio de regeneração de protoplastos

Para a regeneração dos protoplastos, após transformação, foi utilizado MC (item 3.2.1), acrescido de estabilizador osmótico (sacarose 0,7 M).

3.2.3 Meio de seleção de transformantes

Para a seleção dos transformantes foi adicionado benomil na concentração de 1 μg/ml, ao MC (item 3.2.1), após 18 horas de incubação dos protoplastos transformados a 28 °C.

3.3 Soluções e Tampões

3.3.1 Solução de vitaminas

Ácido nicotínico..... 100 mg
Ácido *p*- aminobenzóico..... 10 mg
Biotina..... 0,2 mg
Piridoxina..... 50 mg
Riboflavina..... 100 mg
Tiamina..... 50 mg
Água destilada..... 100 ml

As vitaminas foram adicionadas à água destilada esterilizada e a solução deixada por 15 minutos em banho-maria, a 100°C. Mantida no refrigerador, em frasco escuro.

3.3.2 Solução de Tween 80

A solução de Tween 80 0,1% (v/v) foi utilizada para a separação de conídios. Normalmente sendo distribuídos em tubos de ensaio com 2,5 ml da solução.

3.3.3 Solução salina

A solução de NaCl 0,85% (p/v) foi utilizada para a diluição de conídios, de forma a se obter colônias isoladas e para o preparo de protoplastos. Normalmente sendo distribuídos em frascos com 9 ml de solução.

3.3.4 RNase A

A RNase pancreática (RNase A) foi utilizada para a purificação de DNA. Foi preparada na concentração de 10 mg/ml, em 10 mM de Tris-HCl (pH=7,5), 15 mM de NaCl. A solução foi aquecida a 100 °C /15 minutos e armazenada a -20°C.

3.3.5 Solução aquosa de acetato de potássio

Acetato de potássio.....5 M

O pH foi ajustado para 4,8 com ácido acético glacial. Para cada 100 ml de solução, foram utilizados 11,5 ml de ácido acético e 88,5 ml de água.

3.3.6 Solução de KCl

Dissolveu-se 52,22 g de KCl em 500 ml da solução A do tampão fosfato (0,2 M, pH=5,8) (item 3.3.13). Adicionou-se um volume suficiente da solução B para atingir o pH=5,8. Completou-se para 1000 ml com tampão fosfato 0,2 M, pH=5,8, obtendo-se uma solução de KCl 0,7 M.

3.3.7 Solução de brometo de etídio

Preparada de acordo com SAMBROOK et al., (1989)

Brometo de etídio..... 1,0g

Água destilada..... 100ml

A solução foi agitada por várias horas para a dissolução e armazenada à temperatura ambiente, em frasco escuro.

3.3.8 Solução de EDTA

Dissolveu-se 37,22 g de EDTA em 150 ml de água.

O pH foi ajustado com NaOH sólido. Somente ocorreu dissolução completa do EDTA, quando o pH tornou-se alcalino. Completou-se o volume para 200 ml, de modo a se obter uma solução de EDTA 0,5M.

3.3.9 Solução de $MgCl_2$

Foram adicionados 150 mg de $MgCl_2.6H_2O$ em 80 ml de água Milli Q e o volume completado para 100 ml. A solução estoque apresentou uma concentração de 7,5mM.

3.3.10 Solução de cálcio

$CaCl_2$..... 20 mM

Tris-HCl, pH=7,6..... 10 mM

KCl..... 0,7 M

Água

3.3.11 Solução de PEG

PEG 3445..... 60%

Sacarose..... 0,7 M

Água

3.3.12 Solução estabilizadora

PEG 3445..... 60%

CaCl2..... 50 mM

Tris-HCl, pH=7,6..... 10 mM

Água

3.3.13 Tampão fosfato

Solução A: NaH_2PO_4 ..... 0,2 M

Solução B: Na_2HPO_4..... 0,2 M

As soluções A e B foram autoclavadas e mantidas a 4°C. O tampão fosfato foi preparado no momento do uso, acrescentando-se à solução A um volume suficiente da solução B para atingir o pH=5,8: aproximadamente 920 ml da solução A e 80 ml da solução B.

3.3.14 Tampão TEB (10X)

Tris-base..... 0,89 M

Ácido bórico..... 0,89 M

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

Completou-se o volume para 1000 ml e filtrou-se em papel Watman para retirar qualquer precipitado. O pH ficou em torno de 8,0.

No momento do uso, diluiu-se para 1X.

3.3.15 Tampão da amostra

Azul de bromofenol..... 0,05g

Glicerol..... 20ml

Água destilada..... para completar 100ml

3.3.16 Tampão Tris-EDTA (TE)

Tris-HCl.....	10 mM.....	1 ml de um estoque 1M
EDTA.....	1 mM.....	0,2 ml de um estoque 0,5 M

3.3.17 Tampão de extração de DNA

Preparado de acordo com RAEDER & BRODA, (1985)

Tris-HCl, pH=8,0.....	200 mM.....	40 ml de um estoque 1M
EDTA, pH=8,0.....	25 mM.....	10 ml de um estoque 0,5 M
NaCl.....	250 mM.....	10 ml de um estoque 5 M
SDS.....	1%.....	20 ml de um estoque 10%
Água destilada.....	120 ml	

O tampão foi preparado somente no momento do uso.

3.3.18 Tampão RAPD-PCR

O tampão fornecido pela Pharmacia e pelo Cenbiot/RS é 10x concentrado e é composto de 500 mM de KCl, 15 mM de $MgCl_2$ e 100 mM de Tris-HCl (pH=9,0). O tampão da Gibco não contêm o $MgCl_2$.

3.3.19 Fenol saturado

O fenol foi dissolvido, em banho maria, a 68°C. Adicionou-se a hidroxiquinolina a um volume final de 0,1% e 1 volume de Tris-HCl 0,5 M, pH=8,0. Agitou-se, em um agitador magnético por 15 minutos. Quando as duas fases foram separadas, retirou-se a fase aquosa, usando uma pipeta acoplada a uma bomba de vácuo. Adicionou-se igual volume de Tris-HCl 100 mM, pH=8,0 ao fenol e agitou-se por mais 15 minutos. A fase aquosa foi removida e repetiram-se as extrações com Tris-HCl 100 mM, pH=8,0 até o pH da fase fenólica atingir 8,0 (medido com papel indicador de pH).

Após o fenol estar equilibrado, removeu-se a fase aquosa e adicionou-se 0,1 volume de Tris-HCl 100 mM, pH=8,0. A solução foi mantida a 4°C, em frasco escuro ou protegida da luz.

3.3.20 dNTP

Os quatro dNTPs (Pharmacia) são fornecidos em uma mistura cuja concentração final de cada dNTP é de 20 mM. Para uso, foi diluído de modo a obter-se uma concentração estoque de 2,5 mM de cada dNTP.

3.3.21 Enzima Taq polimerase

A enzima utilizada nos experimentos de RAPD foi fornecida pela Pharmacia, Gibco ou Cenbiot/RS. As soluções são fornecidas em uma concentração de 5 unidades/ μl.

3.3.22 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos foram fornecidos em "kits" pela empresa Operon Techonologies, na forma de "pellets" liofilizados. Para uso nas reações de amplificação, adicionou-se água esterilizada de modo a se obter uma concentração estoque de 4 mM. A molaridade de cada oligonucleotídeo foi fornecida pelo fabricante.

3.4 Teste de sensibilidade dos isolados ao benomil

O isolado selvagem 1.2 foi utilizado nos experimentos de transformação. A fim de se determinar a concentração de benomil necessária para interromper seu crescimento, o isolado foi inoculado com o auxílio de uma alça de platina, em miniplacas contendo MC (item 3.2.1) + concentrações de benomil que variavam de 0 a 5 μg/ ml.

3.5 Obtenção e regeneração de protoplastos

Utilizou-se a metodologia proposta por BALLANCE & TURNER, (1986), sendo os conídios inoculados em placas de Petri contendo MC e incubados a 28°C, durante 4-6 dias. Em seguida, foi feita uma suspensão destes conídios em 2,5 ml de Tween 80 0,1% (item 3.3.2) e os mesmos foram inoculados em frascos Erlenmeyer, contendo 100 ml de MC e incubados em um agitador rotatório (Modelo Superohm) a 150 rpm por 36-48 horas a 28°C.

O micélio foi coletado por filtração em filtro Buchner, com papel de filtro esterilizado, lavado 2 a 3 vezes com KCl 0,7 M e pesado. Para cada 200 mg de micélio

foram adicionados 5 ml de KCl 0,7 M, pH=5,8 e 15 mg de Novozym 234^{MR} . Em seguida, o micélio foi incubado a 28°C a 120 rpm, durante 90-120 minutos.

Os protoplastos foram filtrados em seringa com lã de vidro esterilizada e lavados com KCl 0,7M, por centrifugação em uma centrífuga marca Sorvall, rotor SS34 a 4000 rpm/ 5 minutos. Em seguida, foram ressuspensos em 500 µl da mesma solução (concentração final de 10^7 protoplastos / 100 µl de solução).

A freqüência de regeneração dos protoplastos foi determinada pela contagem, diluição e semeadura, em diversas densidades, em MC e MC + estabilizador osmótico . Para regeneração dos protoplastos foram ensaiados como estabilizadores KCl 0,7 M, sorbitol 1 M, sorbitol 1,2 M, sacarose 0,7 M e $MgSO_4$ 0,6 M.

3.6 Extração de DNA do fungo

Utilizou-se o procedimento descrito por RAEDER & BRODA (1985), onde 2 ml de uma suspensão de conídios (10^7 conídios / ml de solução de Tween 80 0,1%) foram inoculados em 100 ml de meio de cultura líquido e incubados em um agitador rotatório (Modelo Superohm) a 150 rpm / 36 horas.

O micélio foi coletado por filtração, lavado com água destilada e transferido para um almofariz, onde se adicionou nitrogênio líquido para maceração. Para cada grama de micélio, adicionou-se 5 ml de tampão de extração (item 3.3.17), até obtenção de uma solução homogênea. Incubou-se 15 minutos / 65 a 70°C e, em seguida, adicionou-se fenol: clorofórmio na proporção de 1:1. Misturou-se por inversão e centrifugou-se por 20 minutos a 5000 rpm, em uma centrífuga Sorvall com rotor SS34. A fase superior foi coletada e transferida para um novo tubo, onde se adicionou igual volume de clorofórmio ao tubo. Após uma homogeneização os tubos foram novamente centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos (centrífuga Sorvall, rotor SS34), coletou-se a fase superior límpida, onde se adicionou 2 volumes de etanol absoluto gelado ou 0,5 volume de isopropanol. O DNA foi enrolado em bastão de vidro, lavado em etanol 70% e seco a 37°C. A ressuspensão foi feita adicionando-se 1 ml de TE. O DNA permaneceu à temperatura ambiente até total dissolução. Nesta fase foi feito o tratamento com Rnase A, adicionando-se 5µg/ml e incubando-se por 1h / 37°C. A inativação da Rnase foi feita adiconando-se 1 volume de clorofórmio, centrifugando-se por 15 minutos em uma microcentrífuga Eppendorf a 15000 rpm.

3.7 Transformação

Os transformantes de *C. musae* com DNA do plasmídio pBT_6 (Figura 3) foram obtidos utilizando-se cinco métodos de transformação, descritos a seguir. Em todos os experimentos de transformação foram feitos controles negativos, sendo que durante o processo de transformação utilizava-se um tubo de ensaio onde, ao invés de se adicionar o DNA plasmidial eram adicionados 10µl de água esterilizada. Com isso, todas as colônias que surgiram durante a fase de obtenção de transformantes foram consideradas como prováveis transformantes, uma vez que não foi observado crescimento nas placas-controle.

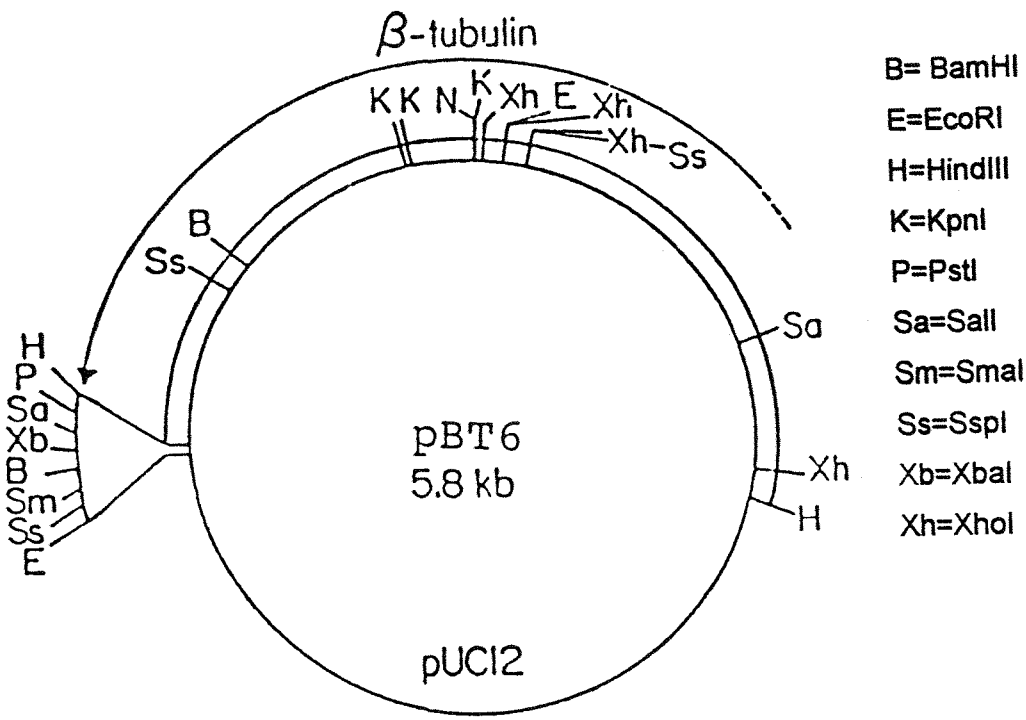

Figura 3. Plasmídio pBT_6 utilizado nos experimentos de transformação de *Colletotrichum musae* (BALLANCE & TURNER, 1986).

3.7.1 Transformação 1 (BERNIER *et al.*, 1989 modificado)

Após sua obtenção, os protoplastos foram ressuspensos em 1 ml de "solução de cálcio" (item 3.3.10) e contados em câmara de Neubauer. Em 300 µl da suspensão de protoplastos, adicionou-se 10 µg de DNA plasmidial, deixando em gelo por 1 hora. A seguir, adicionou-se 50 µl da solução de PEG (item 3.3.11), deixando em gelo por 10 minutos e acrescentando então, 1 ml da solução de PEG, em temperatura ambiente. Após esse período, acrescentou-se 5 ml de MC + sacarose 0,7 M e procedeu-se a semeadura (150 µl/placa) em meio com estabilizador. Incubou-se a 28°C por 24 horas quando então foi acrescentado o meio seletivo. O aparecimento de colônias ocorreu após 8 dias de incubação.

3.7.2 Transformação 2 (BALLANCE & TURNER, 1986 modificado)

Após a obtenção dos protoplastos, 100µl da suspensão foi colocada em tubos de ensaio onde se adicionou 10 µg de DNA plasmidial. A mistura foi deixada à temperatura ambiente por 25 minutos e, em seguida, adicionou-se 200 µl de uma solução estabilizadora (item 3.3.12). A seguir adicionou-se 200 µl e 850 µl da mesma solução e incubou-se por 20 minutos à temperatura ambiente. Após este período, foi feita uma diluição com 5 ml de solução estabilizadora e feito semeadura em MC, contendo o estabilizador osmótico.

As placas foram incubadas por 5-8 dias a 28°C e as colônias contadas e purificadas.

3.7.3 Transformação 3 (BLAKEMORE *et al.*, 1989 modificado)

A técnica descrita por BLAKEMORE *et al.* (1989) é praticamente a mesma descrita no item 3.7.1, salvo pela adição de 5 ml de 60% PEG 3445, após a adição do DNA, seguindo-se uma centrifugação branda (3000rpm/5minutos, em centrífuga Sorvall, rotor SS34) e remoção de parte do sobrenadante. No restante do sobrenadante ficaram os protoplastos que foram ressuspensos e em seguida, semeados em meio com estabilizador osmótico. Da mesma forma que nos outros métodos, o meio seletivo foi adicionado após 24 horas de incubação a 28°C.

3.7.4. Transformação 4 (PUNT & VAN DEN HOLDEN, 1993 modoficado)

PUNT & VAN DEN HOLDEN, (1993) descrevem uma técnica para preparo dos protoplastos e transformação também semelhante à descrita no item 3.7.1, diferenciando-se pela adição de soluções de $CaCl_2$ 0,27M e NaCl 0,7 M para tratamento dos protoplastos, por 15 minutos e soluções STC (sorbitol 1,2 M/ Tris-HCl 10 mM, pH=7,5/ $CaCl_2$ 50mM). Além dessas soluções, utilizou-se uma solução de PEG (60% PEG 3445/ Tris-HCl 10 mM, pH 7,5/ $CaCl_2$ 50mM), com incubação à temperatura ambiente por 20 minutos.

3.7.5 Transformação 5 (GOLDMAN *et al.*, 1990 modificado)

O método descrito por GOLDMAN *et al.* (1990) envolve a utilização da eletroporação na transformação de fungos. O preparo dos protoplastos foi feito da mesma forma que nos métodos descritos anteriormente e a ressuspensão ocorreu na presença de 1,2 M de sorbitol e 1% de PEG 6000. Foram empregados 10 μg de DNA para cada 400 μl de protoplastos. Essas amostras foram colocadas em cubetas descartáveis de 1 ml, utilizando um aparelho "Gene Pulser" (Bio-Rad Lab.). Depois da aplicação do pulso elétrico, foi adicionado 1 ml de MC líquido (item.3.3.1.) + sacarose 0,7M à solução de protoplastos, deixando por 10 minutos em gelo e por 2 horas a 28°C. Após este período, alíquotas de 150-200 μl foram semeadas em MC + sacarose 0,7 M e incubadas a 28°C por 18-24 horas. Em seguida, foi aplicada uma camada de MC, contendo 1 μg/ ml de benomil.

As condições de pulso utilizadas foram: a) tempo de protoplastização: 2-3 horas; b) protoplastos: 10^8/ ml; c) resistência interna: 800 Ohms; d) capacitância: 25 μF; e) intensidade de campo: 1,5 KV/ cm.

3.8 Estabilidade mitótica

A estabilidade mitótica dos transformantes foi avaliada semeando-os por réplica, em meio seletivo e não seletivo e incubando-se a 28°C /3-4 dias. Após o aparecimento das colônias, as mesmas foram avaliadas quanto a capacidade de crescer em meio seletivo. As que cresceram foram transferidas para outras placas contendo meio seletivo e não seletivo. Enquanto isso, os transformantes (tanto os que cresciam quanto aqueles

que tinham o crescimento interrompido) foram avaliados quanto a sua estabilidade. Dessa forma foi possível verificar quais eram estáveis e quais perdiam a resistência, após transferências para meio seletivo e não seletivo.

3.9 Determinação dos níveis de resistência dos transformantes

Os transformantes foram semeados em meio completo contendo concentrações de 0, 0,75, 1, 2, 4 μg/ ml de benomil.

3.10 Análise dos transformantes baseada em "Southern blot"

O DNA genômico dos isolados (1.2 e 7.1) não transformados e dos transformantes (T1.2, T1.20, T3.12, T3.19, T4.44, T4.8) foi clivado com a enzima de restrição *Hind*III, que reconhece sítios específicos no vetor pBT_6. Os fragmentos foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e depois transferidos para membrana de náilon (Hybond-N, Amersham), em procedimento descrito em SAMBROOK *et al.* (1989) utilizando-se papel toalha e filtro de papel Watman 3MM. A transferência foi realizada por 12 horas e a ligação do DNA à membrana foi feita por exposição à luz UV, durante 3 minutos. A hibridação foi feita utilizando-se o "kit DIG DNA labeling and detection" (Boehringer Mannheim). O "kit" contém soluções para marcar o DNA, através de "random primer", com um nucleotídeo desoxiuridina-trifosfatado conjugado com digoxigenina (DIG-dUTP). Após a formação dos híbridos DNA-DNA, estes foram detectados através de imunoensaio, utilizando anticorpo contra digoxigenina. A detecção aconteceu quando o conjugado foi desfosforilado, emitindo cor. A metodologia utilizada foi a recomendada no manual de instruções, fornecido pelo fabricante.

3.11 Infecção de plantas axênicas de banana com o isolado selvagem e os transformantes

Plantas axênicas de banana obtidas a partir da esterilização de meristema apical e crescimento deste em meio de cultura com nutrientes e hormônios, necessários à diferenciação celular, foram inoculadas com o isolado selvagem 1.2 (S) e com os transformantes T1.20 (T1), T3.2 (T2), T3.12 (T3), T4.8 (T4) e T4.44 (T5). Para a inoculação foi feita uma suspensão de conídios com cerca de $7x\ 10^6$ conídios/ ml de Tween 80 0,1%. Com o auxílio de uma micropipeta, foram colocadas 7 gotas de 3 μl da

suspensão de conídios, diretamente nas folhas jovens de bananeiras. Após 20 dias da inoculação, os fungos foram reisolados e analisados quanto a capacidade de infecção e competição.

Foi feita uma esterilização superficial, conforme metodologia estabelecida por PEREIRA (1993), (1 minuto em Etanol 70%, 3 minutos em NaOCl 3% e 1 minuto em água destilada esterilizada), para eliminar os conídios que permaneceram na superfície das folhas e assim, reisolar aqueles que realmente foram capazes de infectar a planta. Em seguida, foram retiradas as bordas das folhas, e a parte interna restante foi cortada em pedaços com, aproximadamente 5x5mm que foram colocados em MC (item 3.2.1), para crescimento dos fungos. Quando o crescimento fúngico foi observado, determinou-se a percentagem de infecção (número de fragmentos infectados / total de fragmentos) e logo em seguida, transferiram-se as colônias, por réplica, em placas com MC e MC + 1μg/ml de benomil. Dessa forma, foi possível determinar quantas colônias eram selvagens e quantas transformantes. Além da resistência ao benomil, os transformantes eram morfologicamente distintos o que facilitou a identificação.

3.12 Análise de RAPD

Os isolados de *C. musae* foram inicialmente purificados (item 3.1). O DNA foi extraído pelo método descrito no item 3.4.3, sua concentração determinada utilizando espectrofotometria de UV ajustando-se a diluição para 20 ng/μl, com água destilada deionizada, sendo a diluição mantida a 4°C. Foram ensaiadas concentrações de DNA que variaram de 20 a 120 ng/ reação e concentrações de magnésio variando de 1,9 a 5 mM.

Vinte e quatro oligonucleotídeos sintéticos da Operon Tech foram ensaiados com 2 isolados de *C. musae,* para avaliar a capacidade de amplificação de cada um deles. Nos experimentos para a análise da variabilidade genética de 14 isolados utilizaram-se 9 oligonucleotídeos (Tabela 3), os quais foram selecionados por exibirem um padrão de bandas nítido e com boa reprodutibilidade.

Tabela 3. Oligonucleotídeos sintéticos utilizados para o estudo de variabilidade de *Colletotrichum musae*.

Oligonucleotídeos	Seqüência amplificada
OPF-03	(CCTGATCACC)
OPX-01	(CTGGGCACGA)
OPX-O3	(TGGCGCAGTC)
OPX-04	(CCGCTACCGA)
OPX-06	(ACGCCAGAG)
OPX-08	(CAGGGGTGG)
OPX-09	(GGTCTGGTTG)
OPX-10	(CCCTAGACTG)
OPX-11	(GGAGCCTCAG)

O volume final de cada reação foi de 25 μl, composta por: 3 μl de DNA genômico (60 ng); 2,5 μl de tampão da enzima; 2 μl de dNTP; 2,5 μl de iniciadores ("primer"); 0,3 μl de Taq polimerase (1,5u); 5 μl de $MgCl_2$ (7,5 mM) (concentração final de íons Mg na reação foi de 3 mM); água para completar o volume de 25 μl.

A amplificação foi feita em um termociclador Perkin Elmer, programado da seguinte forma: 5 minutos a 92 °C, para desnaturação inicial e 40 ciclos de amplificação, sendo: 1 minuto a 92°C para desnaturação, 1,5 minuto a 37 °C para anelamento e 2 minutos a 72 °C para extensão, seguindo-se 3 minutos de extensão final a 72 °C.

Os produtos de RAPD foram resolvidos em gel de agarose 1,4% (p/v) em tampão TEB 1x, para corrida a 3 V/ cm. Utilizou-se o fago λ/ *Hind*III como marcador. O gel foi corado com brometo de etídio por 20-30 minutos, descorado em água destilada e fotografado em um transiluminador de UV, usando-se filme Ilford asa 50. As bandas nos géis, corados com brometo de etídio foram contadas por comparação. A presença da banda em um determinado local no gel foi contada como '1' e sua ausência como '0'.

A análise da variabilidade genética foi realizada pelo agrupamento dos isolados, seguindo os princípios da taxonomia numérica. Dessa forma, o resultado total dos

"primers" foram convertidos em um índice de similaridade. Os coeficientes de similaridades medem o grau de concordância entre duas unidades. O coeficiente de similaridade de coincidência simples ("Simple Matching"), utilizado neste estudo, é dado pela fórmula $S_{(SM)}$= a+d/ a+ b+c+d. Considerando 2 genótipos (A e B) , o valor de **a** é o número de bandas presente em A e presente em B; **b** é o número de bandas presente em B mas ausente em A; **c** é o número de bandas presente em A mas ausente em B; **d** é o número de bandas ausentes em A e em B. Portanto, **a** e **d** representam o número das concordâncias positivas e negativas, enquanto **b** e **c** representam as discordâncias (FUNGARO, 1994).

Através da construção de uma matriz de similaridades foi gerado um dendrograma, pelo método de UPGMA ("Unweighted pair-group method with arithmetical averages"), possibilitando assim, a demonstração das similaridades entre os isolados em estudo. As matrizes e o dendrograma foram elaborados com o auxílio do programa NTSYS-PC (ROHLF, 1988).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho são relacionados à transformação de *Colletotrichum musae* e variabilidade genética de isolados endofíticos detectada por marcadores RAPD. Primeiro serão apresentados os dados referentes à transformação e, em seguida, os dados referentes `a variabilidade de marcadores RAPD.

4.1 Transformação genética com o gene heterólogo de resistência ao benomil

4.1.1 A escolha do isolado e os testes de sensibilidade ao benomil

A escolha do isolado selvagem, para a transformação genética com o gene heterólogo de resistência ao benomil, foi uma etapa importante do trabalho. Este deveria ser estável ou seja, não apresentar setores ou variação na produção de conídios durante o cultivo em laboratório, crescer bem em MC, apresentar abundante produção de conídios, ser altamente sensível ao agente seletivo benomil e apresentar conídios uninucleados para facilitar a seleção dos transformantes. Foram ensaiados 3 isolados, sendo escolhido o isolado 1.2, pois apesar de possuir características comuns aos outros, como produção de micélio, conídios uninucleados, estabilidade de crescimento em MC, foi também o que apresentou menor sensibilidade ao benomil (Tabela 4.)

O isolado 1.2 foi purificado, pela obtenção de colônias monospóricas em MC (item 3.2.1.). O teste de sensibilidade ao benomil demonstrou, conforme apresentado na Figura 4, que 0,2 μg/ml foi suficiente para inibir completamente o crescimento do fungo, sem deixar crescimento residual. Isso possibilitou a seleção dos transformantes em meio contendo 1 μg/ ml, concentração suficientemente alta para distinguir resistência, de crescimento residual.

Tabela 4. Teste de sensibilidade de isolados endofíticos de *Colletotrichum musae* ao benomil.

Isolado	Concentração de benomil (μg/ml)				
	0	0,5	1	2	4
1.2	+++	-	-	-	-
7.1	+++	+++	++	+	-
14.2	+++	+++	+++	++	+

+++ crescimento vigoroso e esporulação normal
++ crescimento bom e esporulação reduzida
+ pouco crescimento e esporulação
- sem crescimento

Os níveis de resistência ao benomil entre as espécies variam de 0,5 μg/ml em *N. crassa* (ORBACH *et al.*, 1986) e *C. graminicola* (PANACCIONE *et al.*, 1988) até 3 μg/ml *em M. anisopliae* (BERNIER *et al.*, 1989) e 5 μg/ml em *C. gloeosporioides* (PEREIRA, 1993). Mesmo entre os isolados de *C. musae* analisados, verificou-se variação nos níveis de resistência, como mostra a Tabela 4. Esses resultados sugerem que a freqüente aplicação de benomil, na forma de fungicida sistêmico, faz com que muitos desses isolados adquiram resistência natural.

O emprego de benomil como marcador de seleção, em experimentos de transformação em fungos filamentosos, tem sido demonstrado com freqüência, principalmente nas espécies de interesse agronômico ou industrial. O fungicida Benlat^{MR}, mais freqüentemente empregado, é composto de 50% de benomil e 50% de materiais inertes e por isso, quando for empregado o fungicida ao invés do princípio ativo, faz-se necessário determinar os níveis de resistência a cada lote de fungicida utilizado.

4.1.2 Produção e regeneração de protoplastos.

A produção de protoplastos e sua regeneração são etapas essenciais dos processos de transformação mais utilizados em fungos filamentosos ou seja, aqueles que utilizam células desprovidas de parede celular e PEG e $CaCl_2$, como promotores da permeabilidade de membrana.

Várias outras espécies de *Colletotrichum* têm sido protoplastizadas e transformadas com genes de resistência a antibióticos e fungicidas (RODRIGUES & YODER, 1987; PANACCIONE *et al.*, 1988; REDMAN & RODRIGUES, 1994).

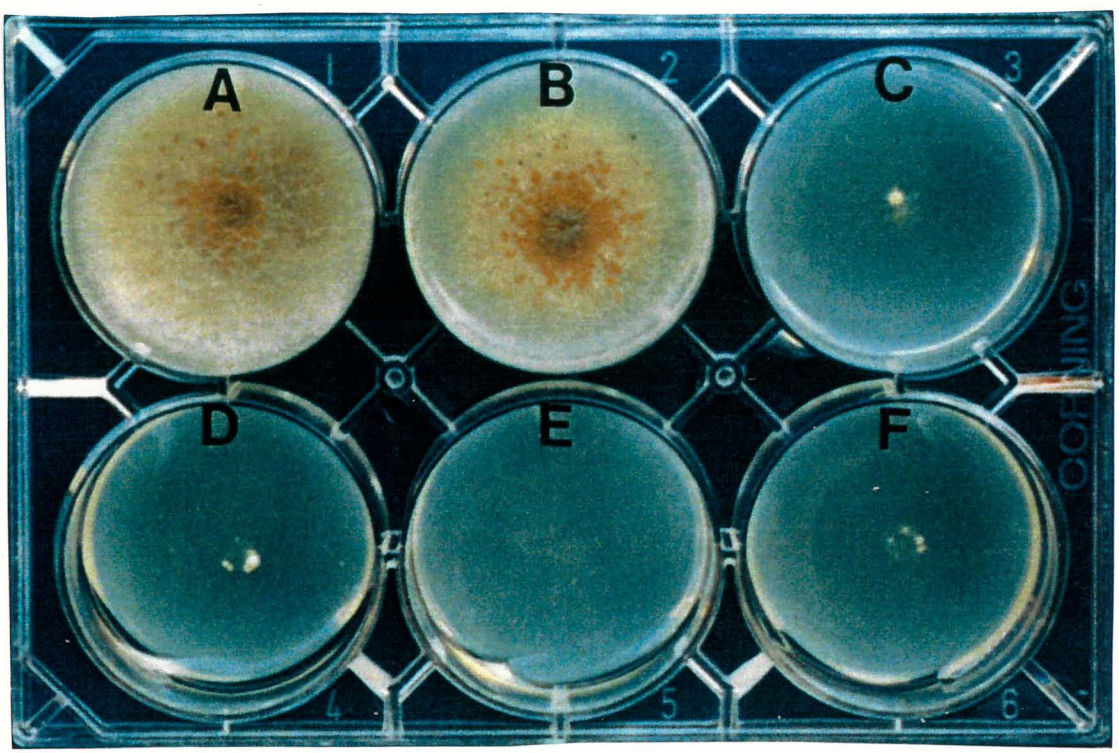

Figura 4. Teste de sensibilidade do isolado 1.2 ao benomil. (a) Controle (MC); (b) MC + 0,1 μg/ml; (c) MC + 0,2 μg/ml; (d) MC + 0,3 μg/ml; (e) MC + 0,4 μg/ml; (f) MC + 0,5 μg/ml.

Para a condução dos experimentos de transformação de *C. musae* vários parâmetros relacionados à produção e regeneração dos protoplastos foram ensaiados, incluindo concentração de enzima lítica e estabilizador osmótico. Os protoplastos foram produzidos empregando KCl 0,7M como estabilizador osmótico e Novozym 234^{MR} como enzima lítica. A concentração de 15 mg de enzima / grama de micélio úmido, mostrou-se bastante eficiente para a obtenção dos protoplastos. Apesar de ter sido ensaiada outra combinação lítica, como a descrita por SILVEIRA & AZEVEDO (1987) (50 mg Novozym 234^{MR} : 50 mg de celulase Sturge), optou-se pela utilização de Novozym 234^{MR} uma vez

que, no emprego da combinação de enzimas o tempo, necessário para a produção de 5 x 10^7 a 1 x 10^8 protoplastos, foi maior (cerca de 3 horas) e a regeneração deficiente (menos que 1x10^7). Isto provavelmente ocorre porque os primeiros protoplastos a se formarem, permanecem mais tempo na presença da enzima e com isso acabam por perder toda a parede celular, o que dificulta a sua regeneração. Além disso, aumenta a probabilidade desses protoplastos sofrerem ação de nucleases, liberadas com a lise de alguns protoplastos (FERENZY, comunicação pessoal).

Durante a formação dos protoplastos, preparados em KCl 0,7 M, de acordo com o método descrito por BALLANCE & TURNER (1986), verificou-se a presença de duas populações de protoplastos: a maioria era grande e uniforme, mas haviam alguns pequenos, que provavelmente referem-se a protoplastos anucleados, resultantes do tempo de exposição à enzima lítica ou até mesmo da sua condição celular. A presença dessa população mista de protoplastos tem sido reportada por outros autores (RODRIGUES & YODER, 1987), que acreditam ser resultado do mecanismo celular de formação dos protoplastos, que pode ocorrer por passagem do conteúdo citoplasmático através de poros da parede celular, causando perda de alguns elementos e conseqüente inviabilidade dos protoplastos.

Para se determinar qual o estabilizador osmótico que seria mais eficiente para a regeneração, os protoplastos foram diluídos apropriadamente em KCl 0,7 M e semeados em meios de cultura, contendo diferentes estabilizadores. Interessante foi o fato de que KCl 0,7 M apesar de ser um bom estabilizador para a produção dos protoplastos, não apresentou resultados satisfatórios para a regeneração. Com isso, outros estabilizadores foram ensaiados (Tabela 5) e sacarose 0,7 M foi o que mostrou melhor resultado, apesar da percentagem de regeneração ser ainda baixa (33,8%), se comparada àquela obtida por TEBEEST & WEIDMANN (1990) para *C. gloeosporioides* (84%). O método empregado por esses autores consiste essencialmente de um pré - tratamento dos conídios com um "tampão estabilizador", composto de EDTA, cisteína e mercaptoetanol em tampão citrato-fosfato. O mesmo tampão estabilizador foi testado com o isolado 1.2 e não se obteve o mesmo resultado. Em contrapartida, o método descrito por PUNT & VAN DEN HOLDEN (1993) que utiliza uma lavagem dos conídios e preparo dos protoplastos em uma solução de $CaCl_2$ e NaCl, com posterior adição de uma solução estabilizadora, apresentou um aumento de 5 vezes na percentagem de regeneração, em

meio com sacarose. Somente a sacarose foi ensaiada com este método, pois esta, apresentou os melhores resultados, nos métodos anteriormente ensaiados.

Os resultados obtidos com a sacarose divergem daqueles discutidos por DAVIS (1985), que considerou os sais melhores para a regeneração de protoplastos de fungos filamentosos e os açúcares para protoplastos de leveduras, em conseqüência da constituição de suas paredes celulares.

Tabela 5. Influência do estabilizador osmótico na regeneração dos protoplastos de *Colletotrichum musae.*

Método	Estabilizador	Regeneração (%)
BALLANCE & TURNER (1986)	KCl 0,7 M	0,2
	Sorbitol 1 M	0,8
	Sorbitol 1,2 M	0,4
	Sacarose 0,7M	6,2
TEBEEST & WEIDMANN (1990)	KCl 0,7 M	0,6
	Sacarose 0,7 M	6,0
	$MgSO_4$ 0,6 M	6,2
PUNT & VAN DEN HOLDEN (1993)	Sacarose 0,7 M	33,8

4.1.3 Transformação

O sistema de transformação para *C. musae* foi desenvolvido baseado na resistência heteróloga ao benomil, presente no plasmídio pBT_6 (Figura 3). Cinco métodos foram ensaiados (Tabela 6), todos eles empregando PEG e $CaCl_2$ para promover a competência das células receptoras de DNA exógeno.

A eficiência de transformação (transformantes/ μg de DNA) verificada nos experimentos foi variável, não ultrapassando 6 transformantes/ μg de DNA. Mesmo assim, foi possível isolar transformantes em todos os métodos e testar o nível de resistência e estabilidade dos mesmos. As primeiras colônias apareceram após 8 dias de

incubação a 28 °C e a seleção continuou até 15 dias da adição de benomil ao meio de cultura. Em todos os experimentos conduzidos o controle negativo de trasnformação eram células protoplastizadas que passavam pelo mesmo tratamento da transformação, com exceção do DNA plasmidial. Dessa forma, pode-se dizer que as colônias são prováveis transformantes, uma vez que não foi observado crescimento nas placas controle.

Tabela 6. Eficiência de transformação de *Colletotrichum musae* com DNA do plasmídio pBT_6

Método	Produção de protoplastos/ grama de micélio	Número de transformantes/ 10μg de DNA
BALLANCE & TURNER (1986)	$4,5 X10^7$	34
BERNIER *et al.* (1989)	$3,7 X 10^7$	30
BLAKEMORE *et al.* (1989)	$4,3 X 10^7$	36
PUNT & VAN DEN HOLDEN (1993)	$4,0 X 10^7$	55
GOLDMAN *et al.* (1990)	$1,2 X 10^8$	58

Os resultados obtidos mostraram que o método empregado muitas vezes é capaz de melhorar a eficiência de transformação. Entretanto, não se consegue variações extraordinárias quando se trabalha com marcadores seletivos dominantes. Daí sua utilização somente quando marcadores auxotróficos não estão disponíveis, para experimentos de complementação.

Embora baixa, a eficiência obtida está entre as melhores até então descritas na literatura, para sistemas de transformação empregando genes homólogos ou heterólogos de resistência ao benomil. BERNIER *et al.* (1989) e GOETTEL *et al.* (1990) transformaram *M. anisopliae* e obtiveram de 0,1 a 0,2 transformante / μg DNA, utilizando os genes ben^R de *N. crassa* e *A. nidulans*, respectivamente. Com exceção do sistema

descrito para *N. crassa* por ORBACH *et al.* (1986), com a obtenção de 1000 transformantes / μg DNA, todos os outros sistemas apresentam uma baixa eficiência.

Alguns autores propuseram o desenvolvimento de sistemas homólogos como alternativa para se melhorar a eficiência de transformação. No entanto, PANACCIONE *et al.* (1988) ao transformarem *C. graminicola,* com genes homólogos e heterólogos de resistência ao benomil, encontraram a mesma eficiência de transformação (13 transformantes/ μg de DNA).

COOLEY *et al.* (1991) também propuseram o desenvolvimento de um sistema homólogo para a transformação de *S. nodorum*, utilizando o gene da β-tubulina (*tub* A^R), ao invés do ben^R de *N. crassa*. Entretanto, a freqüência com que apareceram os transformantes, não foi significativamente maior que a obtida pelos sistemas heterólogos. Outros autores acreditaram que a transformação, com genes homólogos de resistência ao benomil, poderia melhorar a eficiência de transformação em muitos fungos filamentosos, mas nenhum deles conseguiu provar que as pequenas alterações sofridas foram conseqüência do tipo de vetor utilizado (BOGO, 1993; COOLEY & CATEN, 1993; NOVAK & KUCK, 1994).

Não se sabe porque os sistemas homólogos, de resistência ao benomil, não alteram significativamente a eficiência de transformação em várias espécies de fungos. COOLEY *et al.* (1990) sugerem que o gene da β-tubulina é um gene altamente conservado entre e dentro dos taxa. Em uma análise molecular do gene de *S. nodorum*, COOLEY & CATEN (1993) encontraram uma homologia de 88,5% nas regiões codificadoras do gene TUB2 de *S. nodorum* com o gene *tub-2* de *N. crassa* e *benA* de *A. nidulans* e, 95% de homologia na constituição de aminoácidos. O menor grau de homologia encontrado, na investigação dos autores, foi do gene TUB2 de *Candida albicans*, com 65%. O alto grau de homologia da β-tubulina entre as espécies permite que esses polipeptídeos formem microtúbulos funcionais, favorecendo a transferência de genes entre as espécies (DICKMAN, 1988: HENSON *et al.*, 1988; PANNACIONE *et al.*, 1988; BERNIER *et al.*, 1989; BLAKEMORE *et al.*, 1989).

4.1.4 Análise dos transformantes e estabilidade mitótica

A transformação genética resulta em uma série de fenótipos complexos, muitas vezes explicado como resultado da forma e local de integração dos plasmídios no DNA genômico. No entanto, a maioria dos autores prefere não fazer esse tipo de associação por considerar o fenômeno da transformação muito mais complexo para poder ser explicado de uma forma tão simplista (ARMSTRONG & HARRIS, 1993; REDMAN & RODRIGUES, 1994).

Na transformação de *C. musae* verificou-se que na presença de meio seletivo, várias colônias apresentaram variação morfológica, aparecendo desde aquelas com aspecto enrugado, diminuição da produção de conídios, menor vigor e crescimento deficiente, alterações na coloração dos conídios, até aquelas fenotipicamente muito semelhantes ao isolado selvagem (Figura 5). Esses resultados podem ser conseqüência da própria ação do benomil nas células que, segundo DAVIDSE (1986), atua inibindo a função dos microtúbulos, que são componentes essenciais do citoesqueleto dos eucariotos; além de serem importantes para outras funções vitais, incluindo segregação cromossômica, transporte intracelular e geração e manutenção da morfologia celular.

A ocorrência de transformantes abortivos, considerados como aqueles que provavelmente não tiveram o plasmídio integrado ao DNA genômico, foi relativamente baixa representando 20% das colônias isoladas da placa original. Normalmente, as colônias que foram consideradas abortivas, apresentavam um crescimento lento nas placas de transformação e logo após a primeira passagem, para placas com meio seletivo, verificou-se a cessão do crescimento. Também surgiram colônias com crescimento rápido nas placas de seleção, mas que na segunda ou terceira passagem para meio seletivo, perderam a capacidade de crescer em meio com benomil. JUDELSON *et al.* (1993) encontraram resultados semelhantes na avaliação de transformantes de *P. anserina* e acreditam que esses transformantes perderam o plasmídio ou, sofreram alteração na expressão do gene marcador, devido a metilações ou rearranjos no DNA. Essa classe de transformantes aparece em níveis altos nos sistemas de transformação com seleção para resistência ao benomil. DICKMAN (1988) encontrou uma taxa de 75% de transformantes abortivos em *C. trifolii* e OSSANNA & MISCHKE (1990) encontraram 50% em *Gliocadium virens*. Por outro lado, nenhum

transformante foi considerado abortivo por BERNIER *et al.* (1989) na transformação de *M. anisopliae*.

A estabilidade mitótica dos transformantes foi ensaiada com 45 transformantes. Destes, 43 mostraram-se estáveis após 5 passagens para meio não seletivo, enquanto 2 perderam sua marca de resistência. É importante avaliar a estabilidade mitótica para eliminar os transformantes resultantes de heterocários, que aparecem muitas vezes devido à propriedade do PEG de promover a fusão dos protoplastos, além da característica mutinucleada de muitas células vegetativas. O problema de instabilidade é mais sério em espécies que apresentam mais de um núcleo, mas convém avaliar em todas as espécies como uma forma de purificar os transformantes. COOLEY & CATEN (1988) avaliaram a estabilidade mitótica de transformantes de *S. nodorum*, que contém muitos esporos com mais de um núcleo, realizando subcultivos em meio não seletivo. Dezoito transformantes foram analisados, a partir de colônias monospóricas. Treze deles mantiveram a capacidade de crescer em meio com higromicina B e todos os seus esporos eram HmB^r, enquanto 5 deles apresentaram fenótipos sensível e resistente. Após sucessivas semeaduras de colônias monospóricas resistentes, em meio não seletivo, observou-se uma progênie segregando 100% resistente. Isso indica que após a purificação de um transformante, inicialmente heterocariótico, pode se obter colônias resistentes estáveis.

Um resultado interessante foi o obtido com a avaliação da estabilidade mitótica dos transformantes resultantes da eletroporação. Após serem transferidos para meio seletivo, não apresentaram estabilidade comparável à obtida com os transformantes resultantes dos métodos convencionais. Praticamente 50% dos transformantes analisados perdeu a resistência, logo após a primeira passagem para meio não seletivo. No entanto, ao mesmo tempo em que se observou a perda da resistência durante a germinação conidial, pôde-se verificar que o crescimento micelial foi mantido em vários casos. Isso pode ser conseqüência das condições de pulso, que favoreceram a fusão de núcleos transformados e não transformados, resultando em um grande número de heterocários, pois enquanto nos conídios havia somente núcleos transformados ou não transformados, no micélio havia a mistura de núcleos. Esses resultados também foram observados por BLAKEMORE *et al.* (1989) e HILBER *et al.* (1994).

LESLEY & DICKMAN (1991) observaram que a estabilidade dos transformantes muitas vezes está associada `a forma de integração do DNA ou seja, como cópias

simples ou arranjadas em tandem e também, se presentes em sítios homólogos ou heterólogos. Transformantes de *Giberella*, resistentes à higromicina B, contendo integrações de cópias simples segregavam de forma mendeliana durante a meiose, enquanto os transformantes com múltiplas cópias apresentavam, proporcionalmente, uma progênie com menos fenótipos resistentes.

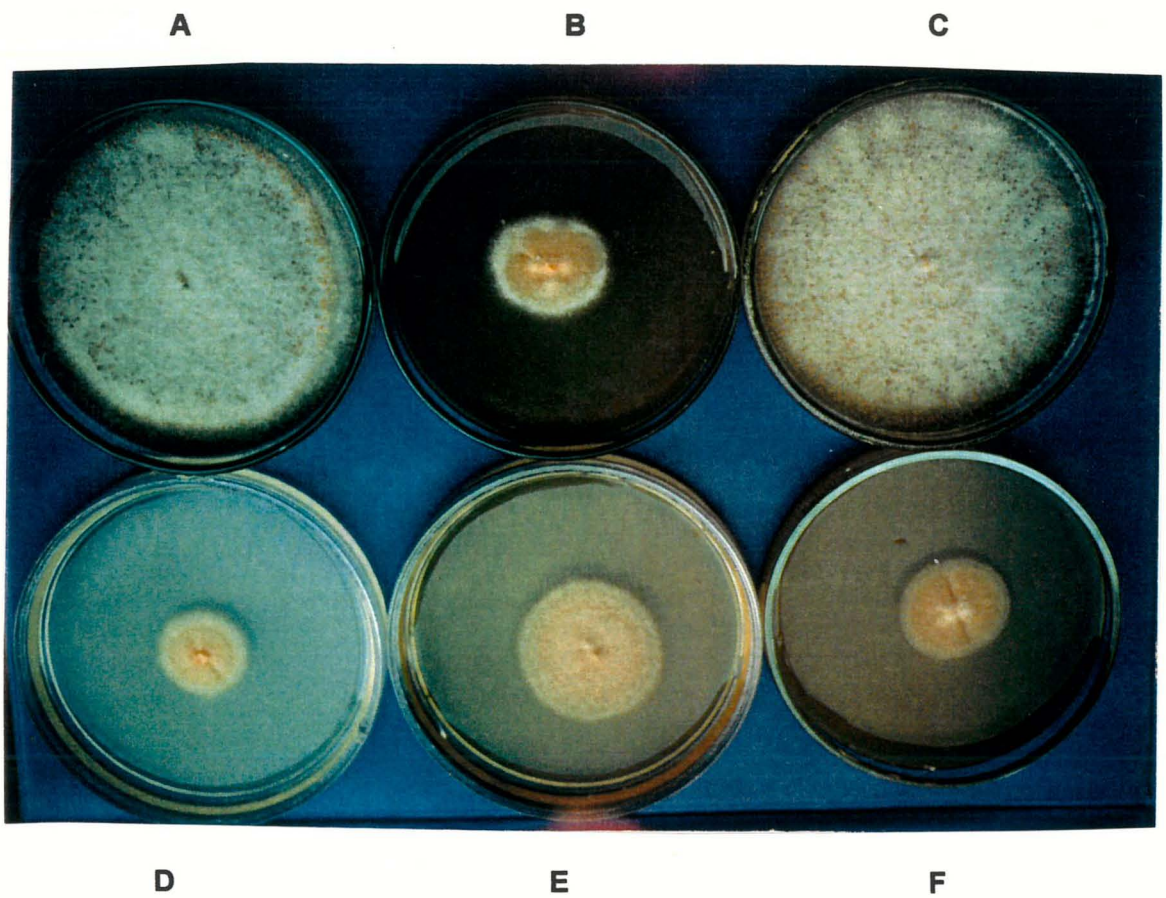

Figura 5. Influência da transformação na morfologia das colônias de *Colletotrichum musae*, crescidas em MC + 1μg/ml de benomil. (a) T1.2; (b) T3.12; (c) T1.20; (d) T3.8; (e) T3.2; (f) T4.44.

4.1.5 Nível de resistência dos transformantes

O nível de resistência dos transformantes foi bastante variável. Como mostra a Figura 6, alguns apresentaram um bom crescimento somente na concentração de seleção (B), enquanto outros foram capazes de crescer em concentrações mais elevadas (C, D e E). Contudo, não se pode afirmar que a transformação foi capaz de promover um nível de resistência muito maior aos transformantes quando comparados ao isolado selvagem. Os transformantes, na sua maioria, tiveram o crescimento interrompido em concentrações consideradas, por outros autores, como concentração de seleção (BLAKEMORE *et al.*, 1989), mas se for considerada a sensibilidade do isolado selvagem, a transformação conferiu um resistência 10 vezes maior que a suportada inicialmente. A variação observada nos níveis de resistência, poderia ser considerada como efeito do número de cópias do plasmídio que se integrou no genoma do fungo e até mesmo do local de integração; entretanto essa hipótese não pode ser considerada devido aos resultados obtidos pela hibridação, que serão discutidos adiante.

4.1.6 Hibridação e análise dos transformantes

Os experimentos de hibridação foram conduzidos, sob condições de alta estringência, marcando o DNA dos transformantes e de dois selvagens (1.2 e 7.1),com o plasmídio pBT_6 . O DNA foi clivado com a enzima *Hind*III. *Hind*III, libera um fragmento de aproximadamente 3 kb. Os resultados da hibridação mostraram que a integração ocorreu em um único sítio do genoma, como mostra a Figura 7 e, foi idêntica nos transformantes analisados, apesar desses transformantes representarem clones de experimentos independentes. Nas condições de estringência utilizadas na hibridação, houve o aparecimento de sinais no DNA da linhagem hospedeira. Esse resultado pode ser explicado pelo grau de homologia entre os genes de β-tubulina de *N. crassa* e *C. musae*, sugerindo que pelo menos um dos genes de β-tubulina de *C. musae* está localizado dentro desse fragmento.

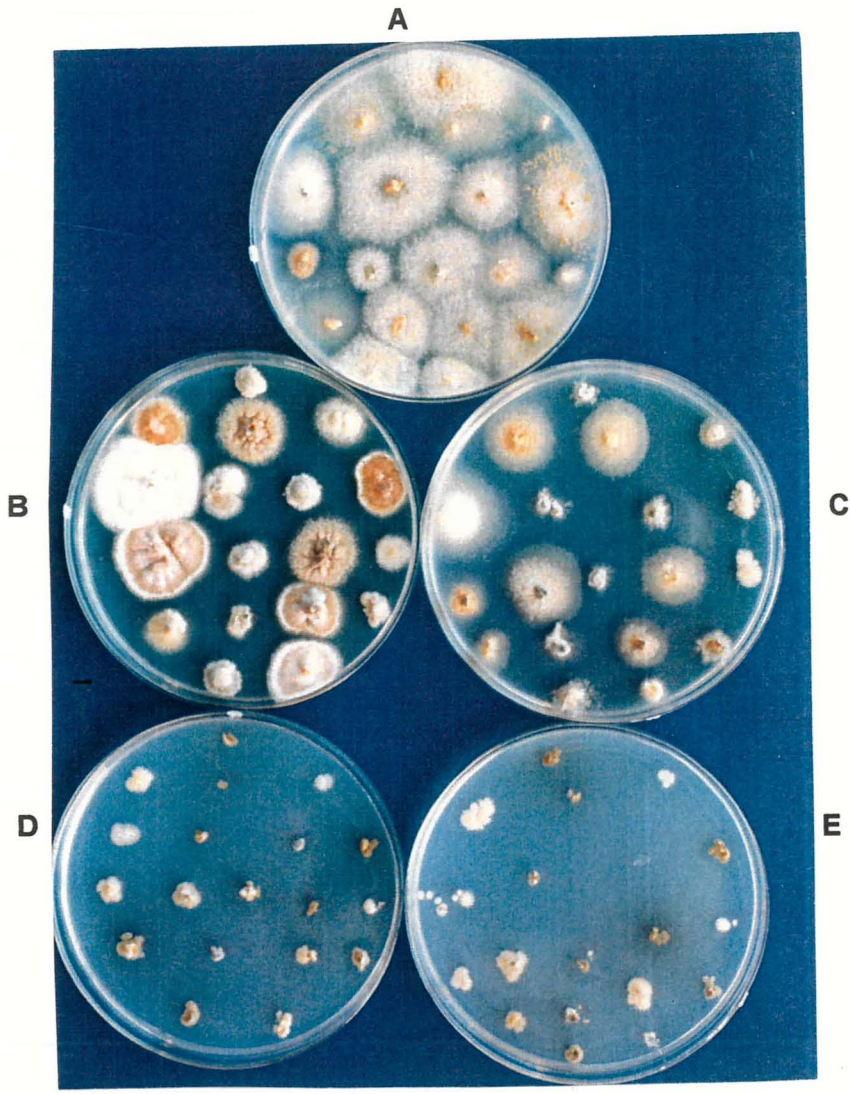

Figura 6. Crescimento dos transformantes de *Colletotrichum musae* em diferentes concentrações de benomil. (a) Controle (MC); (b) MC + 1,0μg/ml; (c) MC + 2,0 μg/ml; (d) MC + 3,0 μg/ml; (e) MC + 4,0 μg/ml

A existência de 2 genes divergentes para β-tubulina, em espécies de *Colletotrichum,* foi discutida por PANNACCIONE & HANAU (1990). Estes genes contêm seqüências genômicas que hidridam com *N. crassa*. A hibridação ocorre devido à homologia existente na região C-terminal da β-tubulina. A região é responsável por

proteínas componentes dos microtúbulos; é muito conservada nessas duas espécies, mas apresenta grande divergência para os genes da β-tubulina em *A. nidulans* e outros fungos.

Resultados semelhantes aos discutidos acima, foram obtidos por outros pesquisadores. ARMSTRONG & HARRIS (1993) transformaram *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* com gene *tub*2 de *N. crassa*, presente no plasmídio pBT_6 e verificaram que os transformantes avaliados, resultantes de experimentos distintos, apresentavam integração em um único sítio. Apesar da similaridade nos sítios de integração, os transformantes também diferiam em viabilidade de esporos, taxa de crescimento, virulência e pigmentação de conídios. Os autores acreditam que podem ter ocorrido outras formas de integração, mas que resultaram em transformantes instáveis e sugeriram o sequenciamento dos sítios de inserção, para esclarecer os fatos que ocorreram durante a transformação.

ARAUJO (comunicação pessoal) verificou que na transformação de *Penicillium expansum* e *Humicola* com plasmídio pBT_6, os resultados de hibridação também mostraram um padrão idêntico ao da linhagem selvagem, em ambas as espécies. Os estudos com *Penicillium expansum*, mostraram que a integração do gene de *N. crassa* ocorreu em sítios homólogos ao de *P. expansum.* Ao serem hibridados somente com o vetor não foi detectado qualquer sinal, o que sugere uma conversão gênica. Parece que essa alta taxa de conversão gênica pode estar relacionada ao tipo de vetor utilizado, o qual contém um gene com seqüências de alta homologia comparado a outros fungos.

Uma forma de provar que os transformantes de *C. musae* também sofreram conversão gênica é comparar os sítios de restrição dos genes de *N. crassa* e *C. musae* ou outra espécie de *Colletotrichum* e clivar o genoma com enzimas que reconheçam sítios somente em *N. crassa*, ou então, fazer amplificações com oligonucleotídeos específicos para cada espécie e hibridações comparativas. Esta é a estratégia que esta sendo utilizada por ARAÚJO para provar a conversão gênica em *Penicillium.*

Além dessa hipóteses, existe a defendida por RIKKERINK *et al.* (1994) que ao transformarem *Glomerella cingulata* com genes de resistência à higromicina, verificaram que a integração homóloga ocorreu em um único sítio, em 95% dos transformantes analisados. A integração homóloga do vetor resultou em duplicações da região promotora do gene *gpdA* e, quando os transformantes foram crescidos sem pressão

seletiva, verificou-se uma alta taxa de excisão do vetor, por recombinação entre as regiões duplicadas. A freqüência de recombinação homóloga verificada é relativamente alta quando comparada a outros fungos fitopatogênicos. Os autores acreditam que há uma tendência do DNA integrado sofrer excisão, após a recombinação entre regiões duplicadas e isso pode explicar a alta taxa de recombinação homóloga detectada. Essa afirmação coincide com a hipótese de que os pontos quentes de recombinação, chamados "hot spots", estão associados com regiões de alta taxa de transcrição, uma vez que o loco *gpdA* está em uma região de transcrição ativa em alguns organismos e tecidos.

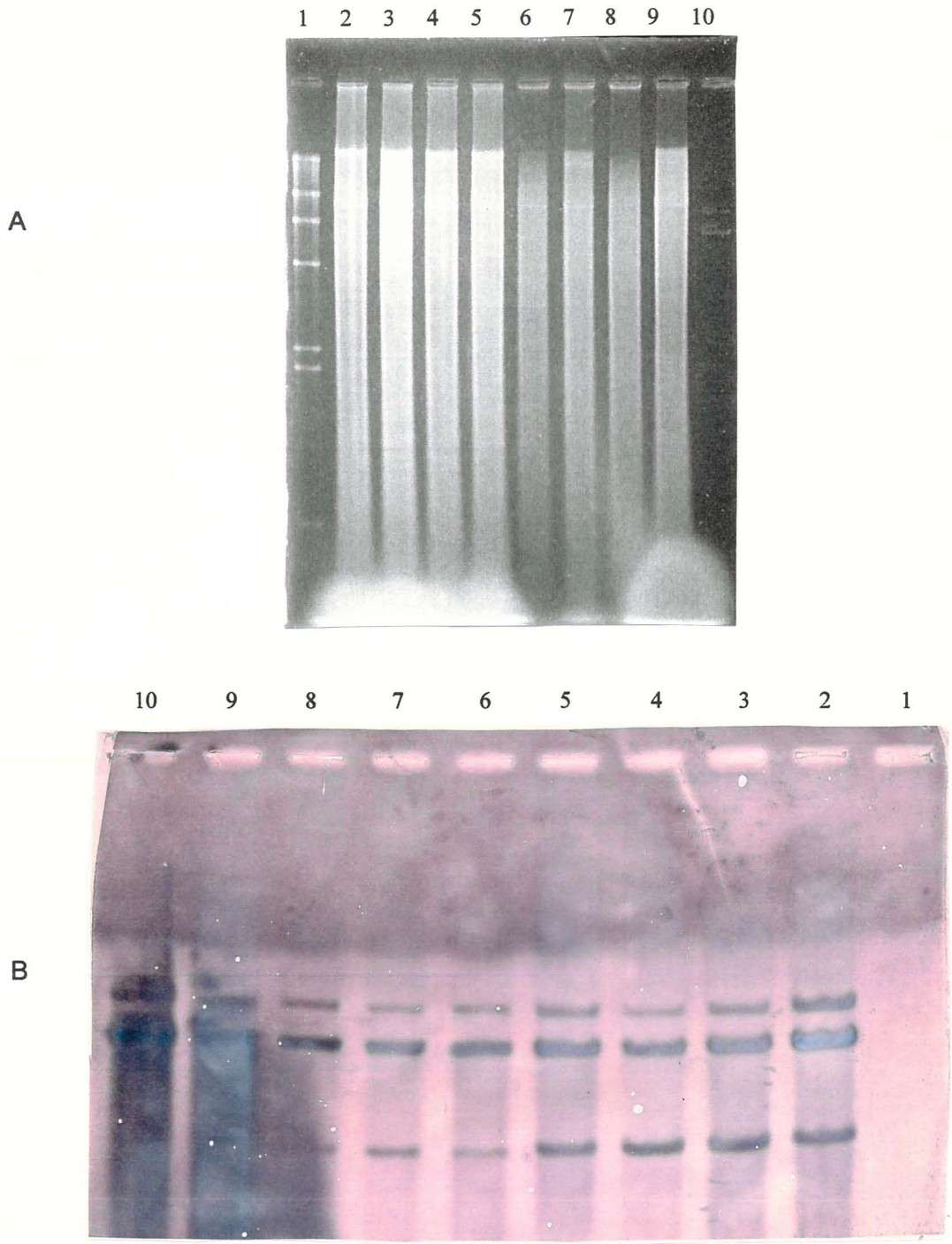

Figura 7. (A) DNA total do isolado selvagem e dos transformantes, clivados com a enzima de restrição *Hind*III. (B) Padrão de hibridação do DNA total do isolado selvagem e dos transformantes clivados com *Hind*III, tendo como sonda o plasmídio pBT_6. (1) λ clivado com *Hind*III, (2) T1.2; (3) T1.20; (4) T3.12; (5) T4.8; (6) T4.44; (7) T3.19; (8) 7.1; (9) 1.2; (10) pBT_6.

4.1.7 Inoculação dos transformantes em plantas axênicas de banana

Atualmente, o grande interesse nas pesquisas com fungos de importância agronômica, seja ela relacionada ao desenvolvimento de micoherbicidas, estudos de interação planta-patógeno (incluindo aqui os estudos com endofíticos) ou até mesmo de regulação gênica, envolvem experimentos de transformação e avaliação desses transformantes em condições controladas, para conhecer a viabilidade ou não, do sistema desenvolvido. Esses experimentos relacionam-se à re-inoculação dos transformantes em plântulas ("seedlings") (PANACCIONE *et al.*, 1988), ao emprego de um gene repórter, como o gene GUS (MURRAY *et al.*, 1992) ou à utilização de plantas axênicas, que foi o realizado neste trabalho.

As plantas axênicas, por serem consideradas livres de patógenos ou qualquer outro microrganismo, pertencente à flora micótica natural das plantas, podem fornecer informações sobre o comportamento dos transformantes nas plantas. Para que o sistema de transformação desenvolvido seja considerado viável, o microrganismo recombinante deve possuir características como estabilidade na expressão do fenótipo e competitividade com microrganismos selvagens, principalmente. Em muitos estudos de transformação têm sido verificado que o fenótipo resistente reverte à sensibilidade por perder a seqüência exógena. Com certeza esses microrganismos não poderiam ser utilizados para aplicações no campo, pois não haveria como monitorar os estudos. DICKMAN & PARTRIDGE (1989) reportaram que transformantes de *Fusarium*, inoculados em plantas de milho durante 3 semanas, perderam a resistência por sofrerem deleções e rearranjos. A vantagem de se utilizar microrganismos recombinantes é que o fenótipo resistente pode ser facilmente distinguido do selvagem, na presença de seleção ou por hibridações.

Os experimentos de infecção de plantas axênicas de banana com o isolado selvagem e os transformantes foram realizados com o objetivo de avaliar se os transformantes mantinham a capacidade de infecção e como se comportavam na presença de organismos selvagens. Após 20 dias da inoculação, foi possível reisolar tanto o isolado selvagem quanto os transformantes com uma alta freqüência de infecção (Figura 8). Resultados semelhantes foram obtidos por RODRIGUES & YODER (1987), com transformantes de *C. lindemuthianum*. Ao serem reisolados de plantas de feijão, verificou-se que os transformantes mantiveram a patogenicidade, indicando que a

integração do plasmídio não ocorreu em locos envolvidos na virulência ou relacionados à especificidade do hospedeiro. TSAI *et al* (1992), também reisolaram transformantes de *A. coenophialum* de plântulas de festuca, em freqüências comparáveis às obtidas com o endófito selvagem (9-27% das plantas sobreviventes).

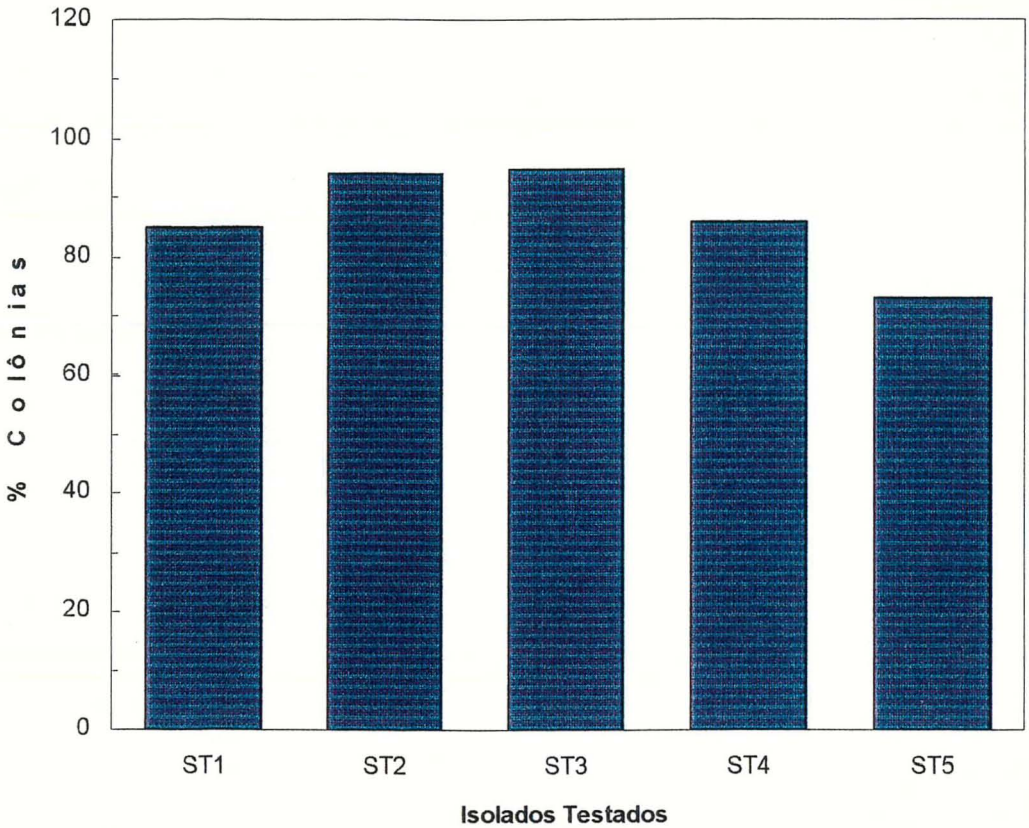

Figura 8. Freqüência de infecção em fragmentos de folha de bananeira, inoculados com o isolado selvagem e com os transformantes de *Colletotrichum musae*, reisolados de plantas axênicas, após 20 dias da inoculação. (S) Selvagem; (T1, T2, T3, T4, T5) Transformantes.

Verificou-se que os transformantes não apresentaram a mesma agressividade, ao serem analisados por sua capacidade de competição, com o isolado selvagem, na infecção das plantas. Em nenhuma das parcelas analisadas houve superioridade do transformante em relação ao selvagem, como pode ser visto na Figura 9. Esses

resultados são coerentes, considerando que uma modificação no genoma pode alterar características fenotípicas, uma vez que ocorre um desequilíbrio, desde a duplicação do DNA até a síntese de proteínas. É muito difícil afirmar que um genótipo que sofre a introdução de uma molécula exógena não sofre também conseqüências fenotípicas. No entanto, PEREIRA (1993) realizou ensaios semelhantes com mutantes espontâneos de *C. musae,* resistentes ao benomil, e constatou que os mutantes foram mais freqüentemente recuperados, indicando uma superioridade em relação ao selvagem. Talvez isso possa ser explicado pela hipótese do gene de resistência apresentar um efeito pleiotrópico, selecionando também uma linhagem mais agressiva. De qualquer forma, uma mutação espontânea, de resistência ao benomil, ocorre por modificações na estrutura da molécula da tubulina e não pode ser comparada com uma resistência proveniente da introdução de uma molécula exógena, onde além da seqüência referente ao gene da β-tubulina, existem outras seqüências, que são introduzidas simultaneamente e que podem se integrar, em vários sítios no genoma.

A escolha dos transformantes, para a realização dos ensaios, não foi ao acaso. Todos apresentavam boa esporulação, para que pudessem competir em igualdade, e também eram morfologicamente distintos, para que pudessem ser mais facilmente caracterizados em placas de Petri. Quando a comparação foi feita com o selvagem, utilizou-se o meio seletivo para distinguir, uma vez que o selvagem não cresce em meio com benomil. No entanto, ao serem feitas comparações entre os transformantes, por todos crescerem em meio com benomil, determinou-se que a distinção morfológica facilitaria a análise dos resultados.

O importante é que apesar da introdução de DNA exógeno interferir no metabolismo do fungo, dificultando sua competição com o tipo selvagem, a capacidade de infecção não foi perdida. Essa característica é importante para estudos posteriores, visando a clonagem de genes que possam conferir características novas às plantas, como genes de resistência a doenças e, até mesmo, genes envolvidos com a patogenicidade.

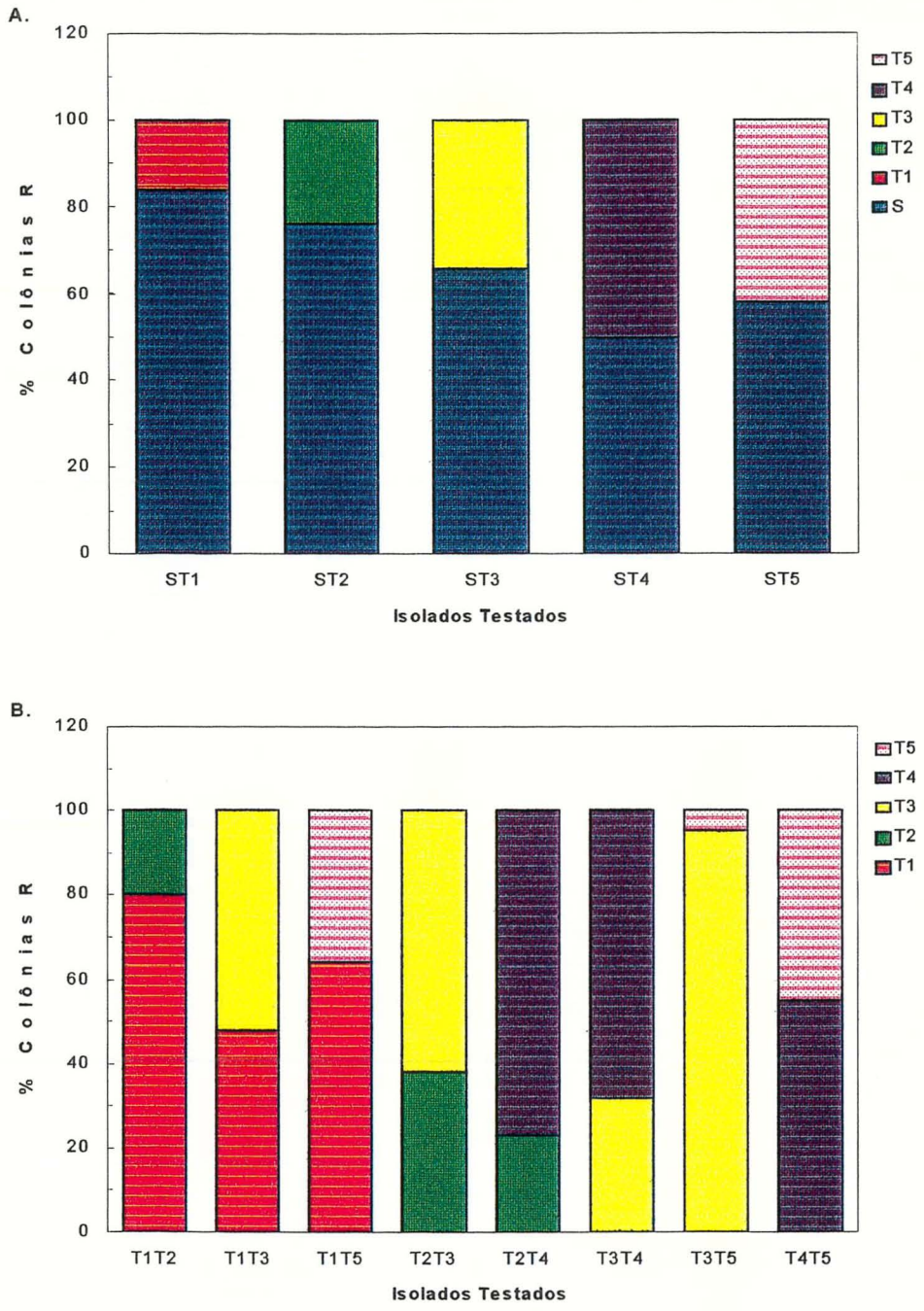

Figura 9. Freqüência de infecção do isolado selvagem e dos transformantes de *Colletotrichum musae*. (A) Competitividade do selvagem em relação aos transformantes, (B) Competitividade entre os transformantes. (S) Selvagem, (T1,T2,T3,T4,T5) Transformantes.

Quando foi comparada a competitividade entre os transformantes, verificou-se que entre eles também existem variações na capacidade de infectar a planta. O transformante T4 foi muito mais agressivo que os outros analisados. Uma explicação para isso, é que por ser morfologicamente muito semelhante ao selvagem, as modificações por ele sofridas não foram tão drásticas, possibilitando quase que manter sua agressividade, uma vez que foi também um dos que melhor se comportou, nos ensaios de competitividade com o selvagem.

Os estudos com transformação em fungos fitopatogênicos têm recebido grande impulso nos últimos anos, pois se tornaram uma forma simples de avaliar determinantes de patogenicidade. Com a inativação gênica provou-se, de forma evidente, que fatores específicos estão associados à patogenicidade. Genes codificando peptídeos específicos são clonados e, dessa forma, muitas dúvidas relacionadas à infecção, estão sendo esclarecidas (MARMEISSE *et al.*, 1993; BOWEN *et al.*, 1995).

Colletotrichum spp são de grande interesse para a agricultura, uma vez que os problemas que causam são extremamente sérios. Os estudos com transformação já provaram também que a integração de genes exógenos em *Colletotrichum* acontece, principalmente de forma homóloga (RIKKERINK *et al.*, 1994), o que facilita o desenvolvimento de novas estratégias de resistência. Genes que atuam como inibidores de enzimas fúngicas, poderiam ser clonados. Recentemente, genes que codificam para proteínas inibidoras de poligalactorunase de feijão foram clonados (TOULBART *et al.*, 1992). Esses inibidores reduziram em cerca de 2 vezes a quantidade de enzima fúngica ativa e prolongou a meia-vida de oligogalacturonídeos, que são liberados durante a degradação da parede celular. Também são capazes de induzir respostas de defesa, com a produção de fitoalexinas (CORNELISSEN & MELCHERS, 1993).

Fatores inibidores de pectina-liase, uma enzima que contribui para a degradação da parede celular e considerada um dos principais fatores de patogenicidade, também foram identificados em *G. cingulata*. BOWEN *et al.* (1995) utilizaram esses inibidores específicos para desenvolver mecanismos de resistência, para o controle do patógeno.

4.2 Análise da diversidade genética por RAPD

Os estudos de diversidade genética de fungos endofíticos tornou-se objetivo de estudo em muitos laboratórios. Atualmente há um grande interesse em saber como esses fungos se comportam em uma população e como são os mecanismos de geração de variabilidade, uma vez que não se tem descrito ciclos sexuais ou parassexuais, em muitos grupos estudados. Há interesse também, em estabelecer estratégias de manejo de culturas, pois os fungos endofíticos mais freqüentemente isolados são aqueles considerados potencialmente patogênicos, apesar de serem muitas vezes isolados de tecidos sadios da planta hospedeira.

4.2.1 Padronização da técnica e seleção de oligonucleotídeos

A classe de marcadores conhecida como RAPD permite identificar, assim como o RFLP, o grau de similaridade entre genótipos. A técnica baseada na amplificação de fragmentos não específicos de DNA utiliza como estratégia oligonucleotídeos de 10 bases como iniciadores (primers) para amplificar o DNA genômico, em reações de polimerização em cadeia (PCR). Os produtos da PCR são produzidos em regiões do genoma flanqueadas por dois sítios que apresentam complementaridade aos iniciadores. Os produtos de amplificação são analisados por eletroforese em géis de agarose, conforme descrito na metodologia.

A adaptação e otimização da técnica compreenderam uma série de ensaios com o material biológico em estudo, incluindo seleção de oligonucleotídeos, concentração de íons Mg^{++} e concentração de DNA na reação.

Inicialmente, poucos (1-2) isolados foram submetidos a uma seleção de oligonucleotídeos iniciadores (primers). Vinte e quatro oligonucleotídeos, provenientes dos "kits" OPX e OPF, foram ensaiados e um perfil foi escolhido aleatoriamente como padrão (os oligonucleotídeos escolhidos estão na Tabela 3). Estas reações foram repetidas em diversos experimentos, para se verificar a repetibilidade do perfil.

A Figura 10 representa os resultados de amplificação do isolado 1.2, com vários oligonucleotídeos e as setas mostram os perfis escolhidos. Observou-se um número variável de bandas amplificadas em função do oligonucleotídeo utilizado. De 4 a 15

bandas foram observadas. Amplificações com um excesso no número de bandas (> 20) não foram utilizadas, por apresentarem certo número de bandas fracas, que poderiam ser consideradas espúrias ou seja, resultado de erros de amplificação. Houveram também iniciadores que não sofreram anelamento (dados não mostrados). HE *et al.* (1992) sugeriram que as bandas instáveis devem ocorrer como resultado da formação de heteroduplex ou por amplificação não específica onde a homologia iniciador/DNA molde não é perfeita. Ao testarem alguns desses iniciadores com concentrações maiores de Mg^{++} verificaram um padrão mais complexo de bandas, sugerindo que a variação de Mg^{++} estabiliza o anelamento em alguns casos.

Cerca de 80% dos iniciadores ensaiados mostraram-se responsivos, apresentando bandas bem definidas, mas apenas 40% deles foram utilizados nos experimentos.

Os ensaios para verificar a condição ótima de reação em função da concentração de íons Mg^{++} , mostraram que em *Colletotrichum* há uma tendência de aparecerem bandas de menor peso molecular (1,7kb) em reações com concentrações menores que 3,0 mM de Mg^{++}. Enquanto, bandas de maior peso molecular (2,7kb) só apareceram em reações onde a concentração de íons Mg^{++} estava acima de 2,5 mM. Esta tendência foi igualmente reportada por WILLIANS *et al.* (1990) em *Glycine soja* e segundo os autores à medida que a concentração de Mg^{++} aumenta, a amplificação de algumas bandas é maior, enquanto ocorre o decréscimo na amplificação de outras bandas. Nas concentrações mais elevadas (4,0 - 5,0 mM) verificou-se que praticamente todas as bandas desapareceram (Figura 11). Portanto, a concentração ótima foi definida em 3,0 mM.

A concentração de DNA tem sido considerada por WILLIANS *et al.* (1993) como uma das variáveis mais importantes na padronização da técnica. Nos experimentos realizados referentes à concentração de DNA genômico (determinada por espectrofotometria de UV), verificou-se, conforme mostra a Figura 12, que a amplificação ocorre dentro de um espectro amplo (20-120 ng de DNA / reação). Optou-se por utilizar cerca de 60 ng de DNA / reação. Alguns autores (SOBRAL & HONEYCUTT, 1994) defendem a idéia de se utilizar, nos experimentos, duas concentrações de DNA, a fim de permitir a detecção de produtos de amplificação fracos, dependentes da concentração de DNA molde. Neste trabalho essa hipótese não foi considerada, uma vez que observou-se que a concentração de DNA, dentro do espectro de 60 a 100 ng,

apresentava um padrão semelhante, sem perda ou aparecimento de bandas. No entanto, o apresentava um padrão semelhante, sem perda ou aparecimento de bandas.

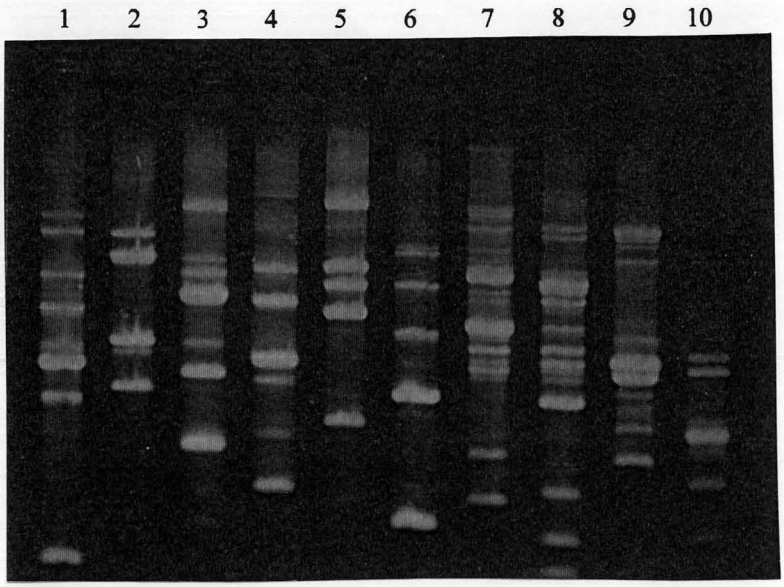

Figura 10. Resultado da amplificação de DNA do isolado 1.2 de *Colletotrichum musae*, com diferentes oligonucleotídeos. (1) OPX-01; (2) OPX-02; (3) OPX-03; (4) OPX-04; (5) OPX-06; (6) OPX-11; (7) OPX-12; (8) OPX-14; (9) OPX-17; (10) OPX-18.

No entanto, o mesmo não aconteceu em concentrações maiores que 100 ng, onde observou-se o aparecimento de algumas bandas, e na concentração de 140 ng não foi obtida amplificação alguma. Concentrações de DNA muito altas resultam também em um borrão, dificultando a leitura das bandas, enquanto concentrações muito baixas, levam à perda de bandas, muitas vezes importantes, que são visíveis e reproduzíveis em concentrações adequadas (WILLIANS *et al.*, 1993). A qualidade do DNA também representa um ponto crítico e que foi analisado neste trabalho. O DNA não pode sofrer nenhum tipo de degradação e as diluições devem ser feitas em água pois em TE, corre-se o risco, pela ação do EDTA, de alterar a concentração de íons Mg^{++}, livres na reação.

Após a otimização da concentração de Mg^{++} e de DNA, observou-se que os perfis tenderam a se repetir nos vários experimentos. A técnica que tem sido classificada como muito sensível às variáveis experimentais (DEVOS & GALE, 1992), mostra que as condições descritas para uma espécie não devem ser extrapoladas para outras. No

entanto, após estabelecer as condições para geração de RAPDs de uma espécie, estas podem ser utilizadas para diferentes lotes de DNA (SCHAFER & WOSTEMEYER, 1992). Considerando todos os fatores discutidos acima, a técnica mostrou-se viável para estudos de diversidade em *C. musae* como será discutido a seguir.

4.2.2 Análise dos marcadores RAPD

Os 14 isolados de *C. musae* utilizados neste estudo foram coletados em lavouras *de Musae cavendish* var. Nanicão, da região do Vale do Ribeira, como mostra a Tabela 2. Todos foram purificados pela obtenção e culturas puras, cultivados em meio completo (item 3.2.1) e deixados à luz UV para estimular a esporulação. Todos foram isolados de folhas jovens e sadias.

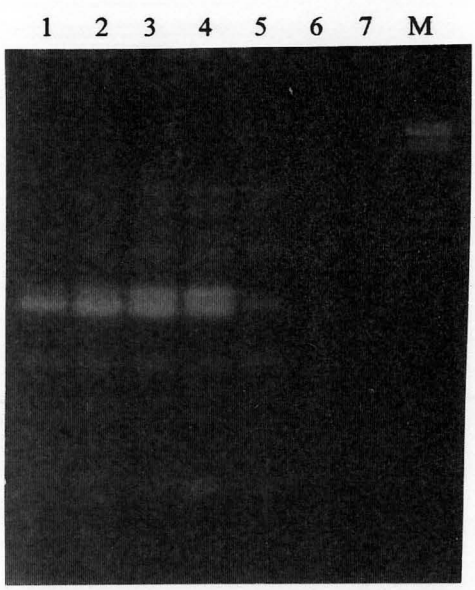

Figura 11. Amplificação de DNA de *Colletotrichum musae*, com o iniciador OPF-02, para verificar a condição ótima de reação, em função da concentração de íons Mg^{++}: (1) 1,9 mM; (2) 2,0 mM; (3) 2,5 mM; (4) 3,0 mM; (5) 3,5 mM; (6) 4,0 mM; (7) 5,0 mM; (M) fago λ / *Hind*III.

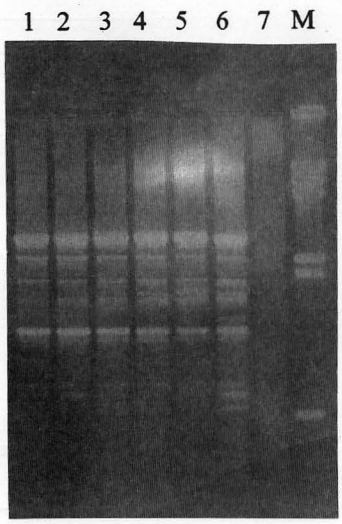

Figura 12. Influência da concentração de DNA genômico na amplificação de fragmentos de DNA de *Colletotrichum musae:* (1) 20 ng; (2) 40 ng; (3) 60 ng; (4) 80 ng; (5) 100 ng; (6) 120 ng; (7) 140 ng; (M) fago λ/ *Hind*III.

O número médio de bandas de DNA amplificado em cada gel foi 18, perfazendo um total de 162. As Figuras 13, 14 e 15 mostram um gel típico, sendo estes os resultados da amplificação com os iniciadores OPX-03 , OPX-06, OPX-09. Esses dados foram utilizados para a construção de uma matriz de similaridades (Figura 16) e do dendrograma (Figura 17). Com esses resultados, pode se dizer que a comparação entre os isolados, mostrou um certo de grau de polimorfismo entre e dentro de populações. Na verdade, não se pode dizer que os isolados provenientes de Miracatu, Registro e Juquiá, representam a população, uma vez que a amostragem é muito pequena, mas aqui serão referidos como parte da população, uma vez que entre os muitos isolados obtidos, eles foram escolhidos por apresentarem variações morfológicas e também por terem sido isolados tanto de uma mesma planta quanto de plantas diferentes. Embora várias das bandas intensas consideradas relevantes, tenham sido compartilhadas pela maioria dos isolados, houveram aquelas que mostraram pouca ou nenhuma similaridade entre eles.

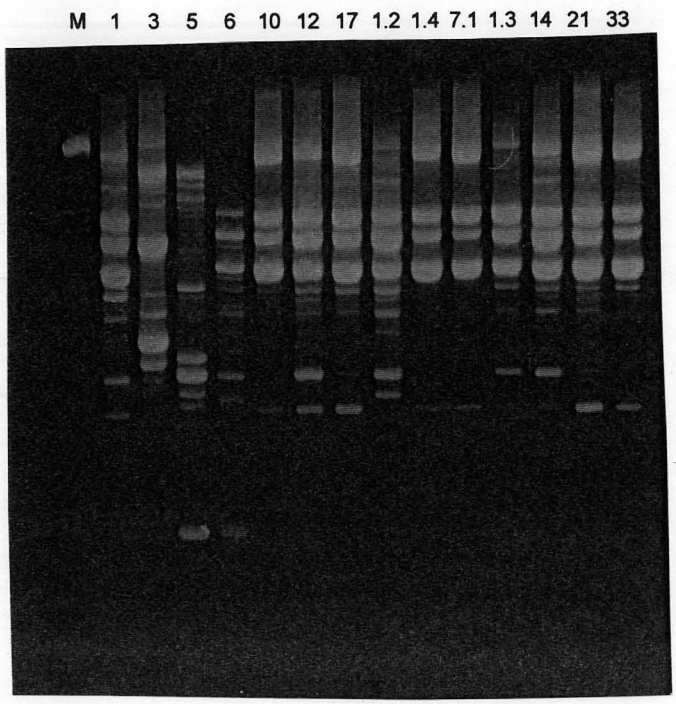

Figura 13. Resultado da amplificação de DNAs de *Colletotrichum musae* com o oligonucleotídeo sintético OPX-03: (M) fago λ *Hind*III; 1, 3, 5, 6, 10, 12, 17, 1.2, 1.4, 7.1, 1.3, 14, 21, 33 (Isolados).

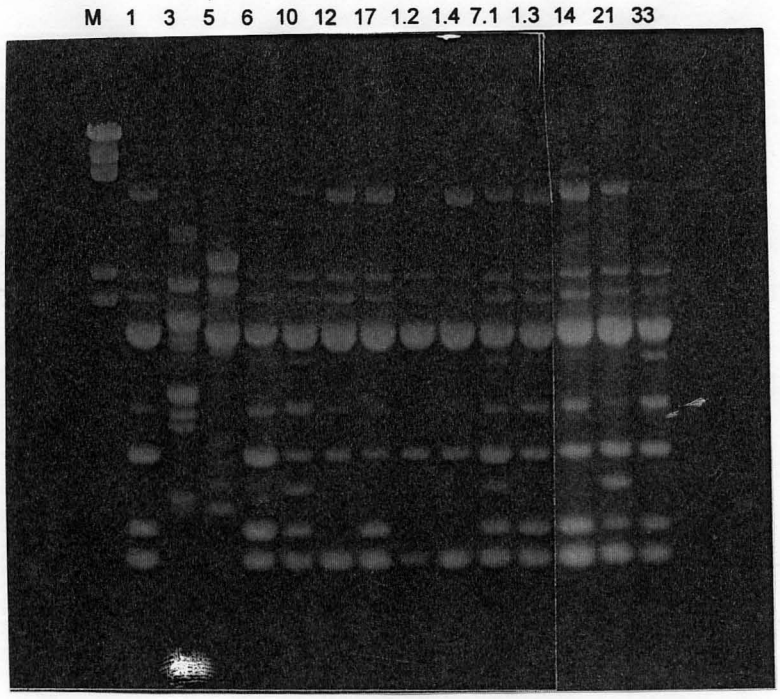

Figura 14. Resultado da amplificação de DNAs de *Colletotrichum musae* com o oligonucleotídeo sintético OPX-06. (M) fago λ *Hind*III; 1, 3, 5, 6, 10, 12, 17, 1.2, 1.4, 7.1, 1.3, 14, 21 (Isolados).

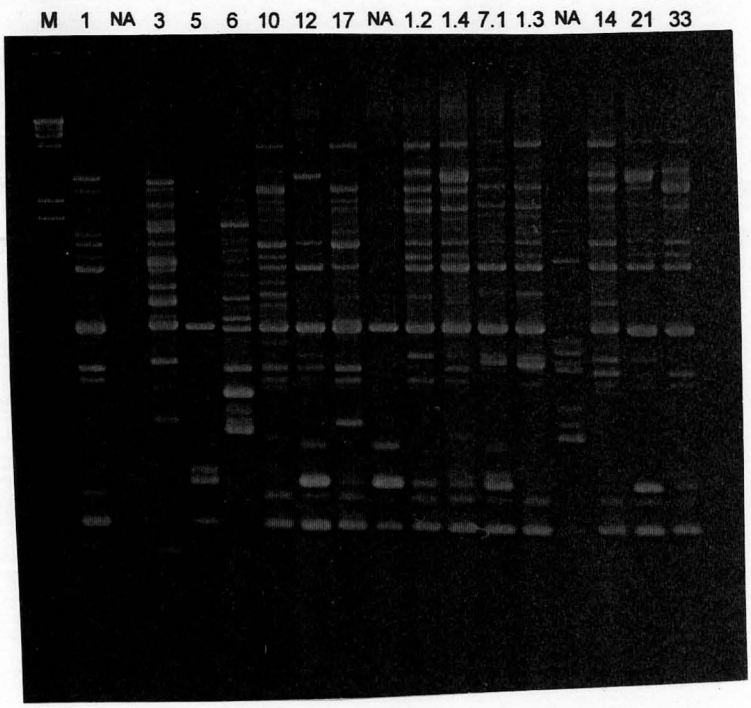

Figura 15. Resultado da amplificação de DNAs de *Colletotrichum musae* com o oligonucleotídeo sintético OPX-09: (M) fago λ *Hind*III; 1, 3, 5, 6, 10, 12, 17, 1.2, 1.4, 7.1, 1.3, 14, 21, 33 (Isolados); (NA) não avaliado.

Pode-se verificar pela análise da matriz de similaridade (Figura 16) e do dendrograma (Figura 17), que a similaridade entre os isolados variou de 45 a 90%, revelando uma certa variabilidade intraespecífica. Tem sido muito comum a observação de variabilidade em isolados de várias espécies, conforme reportado por GOODWIN & ANNIS (1991) e SCHAFER & WOSTEMEYER (1992) com *L. maculans,* THAN *et al.* (1994) com *Peronospora parasitica* e NICHOLSON & REZANOOR (1994) com *P. herpotrichoides*. Em todos os exemplos os autores utilizaram marcadores RAPD para diferenciar patótipos dos fungos, analisar a variabilidade desses patótipos e relacionar bandas com virulência.

Apesar dos isolados utilizados neste estudo mostrarem também similaridades morfológicas, proximidade geográfica e hospedeiro específico, verificou-se certa variabilidade nos fragmentos de DNA amplificados. Esta variabilidade no gênero *Colletotrichum* tem sido reportada por outros autores (LENNÉ & BURDON, 1990) utilizando marcadores de isoenzimas. Os resultados mostraram que a variação encontrada entre os isolados de *C. musae*, não pode ser relacionada à variação geográfica e nem mesmo à época de isolamento. Apesar dos isolados 1.4 e 7.1, que apresentaram maior similaridade (90%), terem sido isolados em Registro, foi possível agrupar com alto grau de similaridade (84%) isolados coletados em locais e épocas diferentes (17 e 21) e também isolados coletados em um mesmo local (1.4, 7.1, 33). Os resultados corroboram com os obtidos por CROWHURST *et al.* (1991) que também não conseguiram agrupar raças de *F. solani* de acordo com a origem geográfica. Já BIDOCHKA *et al.* (1994) estudando isolados de *M. anisopliae*, verificaram que apesar da proximidade geográfica, os grupos foram muito distintos, com menos de 25% de bandas comuns entre eles.

GUTHRIE *et al.* (1992) estudaram populações de *C. graminicola*, isolados da Índia, EUA, África e Porto Rico e verificaram que alguns padrões puderam ser relacionados com a origem geográfica, sugerindo uma outra aplicação do método, ou seja, nos testes de quarentena e testes de campo. A população mais homogênea foi a de Porto Rico, seguida por Índia, África e EUA. Eles acreditam que a homogeneidade da população de Porto Rico, com somente 20% de locos polimórficos contra 53% dos EUA e África, é devido ao isolamento geográfico da população.

Existe, no entanto, várias evidências de agrupamentos de acordo com o hospedeiro, inclusive com espécies de *Colletotrichum* (HAYDEN *et al.*, 1994). Nesse trabalho, os autores verificaram que *C. musae* e *C. acutatum* isolados de banana e morango respectivamente, foram altamente polimórficos, apresentando uma dissimilaridade de cerca de 75%. Quando comparados com a população de *C. gloeosporioides* apresentaram aproximadamente 90% de dissimilaridade. Mesmo dentro dos isolados de *C. gloeosporioides*, foi possível formar 3 grupos distintos. Os isolados de manga formaram um grupo, e os outros dois grupos foram formados por isolados independentemente do hospedeiro, mas que se relacionavam entre si pela presença da fase teleomórfica (*G. cingulata*).

HUFF *et al.* (1994) demonstraram que a técnica de RAPD tem sido muito útil na discriminação de isolados de *M. grysea* e também no entendimento da ecologia e relações genéticas (variações intra e inter específicas) entre populações de fungos.

Os resultados obtidos não permitiram fazer uma correlação entre caracteres morfológicos e variabilidade. Isolados muito semelhantes morfologicamente, como é o caso de 1.2 e 7.1 foram mais distantes molecularmente (76%) que os isolados 17 e 21 que apresentam características morfológicas distintas (84%). Essa ausência de correlação também foi observada por TEDFORD *et al.* (1994) nos estudos com *Hirsutella rhossiliensis*. Os autores procuraram associar morfologia com patogenicidade e não obtiveram sucesso. A hipótese, por eles defendida, é que os genes que determinam morfologia e patogenicidade são conservados funcionalmente e as alterações que por acaso ocorrerem, podem ser facilmente eliminadas devido à pressão de seleção.

	1	3	5	6	10	12	17	1.2	1.4	7.1
1	1.000									
3	0.556	1.000								
5	0.436	0.534	1.000							
6	0.639	0.466	0.451	1.000						
10	0.699	0.541	0.511	0.534	1.000					
12	0.835	0.571	0.481	0.684	0.684	1.000				
17	0.774	0.496	0.421	0.594	0.714	0.759	1.000			
1.2	0.744	0.496	0.451	0.669	0.624	0.789	0.789	1.000		
1.4	0.714	0.481	0.406	0.594	0.654	0.729	0.744	0.744	1.000	
7.1	0.767	0.534	0.383	0.602	0.662	0.767	0.737	0.752	0.857	1.000
1.3	0.752	0.519	0.429	0.586	0.647	0.737	0.692	0.722	0.707	0.744
14	0.835	0.496	0.451	0.654	0.624	0.820	0.805	0.820	0.729	0.767
21	0.805	0.496	0.391	0.639	0.684	0.774	0.835	0.789	0.774	0.797
33	0.744	0.541	0.421	0.624	0.729	0.729	0.714	0.759	0.820	0.827

F4=Save listing F5=Zoom ESC=Exit LINE: 3

	1.3	14	21	33
1.3	1.000			
14	0.782	1.000		
21	0.767	0.835	1.000	
33	0.707	0.744	0.789	1.000

Figura 16. Matriz de similaridades construída pelo método de agrupamento UPGMA.

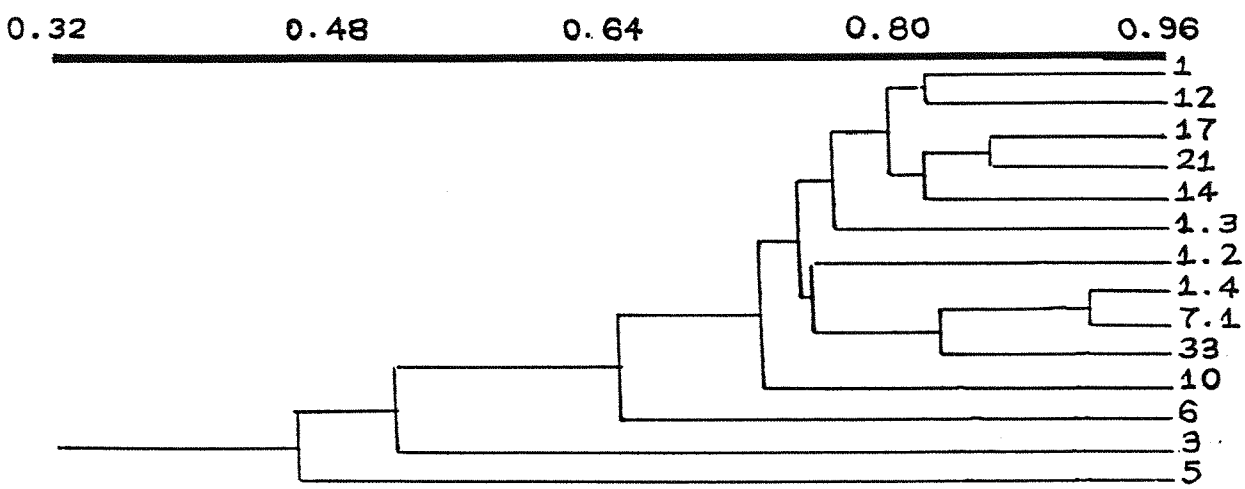

Figura 17. Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA, a partir de uma matriz de similaridades, considerando o coeficiente de Simple Matching". Os valores indicados acima representam os coeficientes de similaridade. À direita estão os códigos dos isolados de *Colletotrichum musae*.

Pelas análises realizadas não foi possível formar grupos distintos, apesar de existir uma tendência quando se considera local de isolamento. Os isolados 3 e 5, de Miracatu e Juquiá respectivamente, são os que apresentam menor grau de similaridade do grupo (45-50%). Há, portanto, uma homogeneidade genética na maioria dos isolados. Essa homogeneidade sugere que alguns dos isolados possam pertencer a grupos com compatibilidade vegetativa, possibilitando uma forma de gerar variabilidade. Resultados semelhantes também foram observados por VASCONCELLOS *et al.* (1994) estudando 5 isolados de *C. truncatum*, isolados de hastes infectadas de soja (4) e crotalária (1). Apesar de terem sido coletados de áreas distintas (Londrina, Ponta Grossa, Cândido Mota), a diversidade genética foi muito pequena. Em alguns grupos, a distância genética foi de 6%, sendo que a maior distância foi a obtida com o isolado de Crotalária, com uma distância média de 21% em relação aos outros 4 isolados.

SREENIVASAPRASAD *et al.* (1993) estudando a antracnose de café, causada por 2 espécies de *Colletotrichum: C. kavawae* (causa antracnose somente em frutos verdes) e *C. gloeosporioides* (causa antracnose em frutos verdes e maduros), verificaram que as populações são muito semelhantes (diversidade menor que 3%), indicando que as espécies tem uma única origem. Os patógenos provavelmente, se diferenciaram devido a rearranjos cromossômicos durante crescimento ou então, por recombinação parassexual como tem sido sugerido por outros autores (MASEL *et al.*, 1990). Em populações assexuadas de *C. gloeosporioides* a heterocariose parece ser a forma mais significativa de adaptação do patógeno a novos hospedeiros. Por isso é que muitas vezes não se consegue agrupar isolados de acordo com o hospedeiro (SREENIVASAPRASAD *et al.*, 1992). Os autores sugerem que *C. kavawae* seja incluído em uma subespécie *C. gloeosporioides* var. *kavawae* e não considerado como uma espécie.

Outros fatores responsáveis pela variabilidade genética nessas populações seriam mutações gênicas, sejam elas de ponto, rearranjos cromossômicos ou as causadas por transposons, como sugerem MILLS & McCLUSKEY (1990) e TALBOT *et al.* (1991). Não se pode descartar também a hipótese de que a reprodução clonal da cultura da banana igualmente favorece a distribuição de biótipos, interferindo inclusive, na estrutura da população dos fungos. Pela capacidade de infectar e colonizar tecidos

da planta, o fungo acaba sendo propagado com a cultura favorecendo a ocorrência de uma população homogênea.

Uma outra hipótese, lançada no início do trabalho, refere-se ao fato de serem ou não os microrganismos endofíticos, isolados de tecidos sadios, aqueles que causam doenças em condições adversas. Alguns resultados preliminares obtidos (dados não mostrados), com *C. musae,* isolados de lesões de frutos, provocadas pela antracnose, mostraram que o padrão de RAPD, avaliado apenas com 3 iniciadores, até o momento, é muito semelhante, ao padrão daqueles que se encontram com similaridade em torno de 70%. Isso abre a discussão de que os endófitos, apesar de comprovada sua contribuição para a planta, seja ela na forma de um aumento de capacidade fotossintética, aumento de área foliar, produção de metabólitos, importantes para a defesa das plantas contra insetos ou outras pragas, são também os responsáveis pelas doenças, principalmente quando condições ambientais favorecem a proliferação dos fungos, causando um desequilíbrio populacional. No caso de *Colletotrichum*, a principal condição, seria a alta umidade relativa, presente na região do Vale do Ribeira nos meses de março a maio, exatamente quando a maioria dos fungos foram isolados. Talvez a infecção latente seja uma explicação para a alta incidência de isolados do gênero *Colletotrichum* nas culturas de banana. Por serem os sintomas da antracnose verificados apenas no estágio pós colheita não se verificou lesões em tecidos da planta. Outros isolados estão sendo analisados, a fim de se determinar o quão próximo eles se encontram do restante da população.

5. CONCLUSÕES

As conclusões obtidas neste trabalho foram:

1. Benomil é um bom marcador de resistência quando se deseja trabalhar com fungos que não apresentam mutações auxotróficas e que o ciclo sexual ou parassexual não é facilmente caracterizado;

2. A transformação genética altera características de crescimento, conidiação, morfologia e agressividade em *C. musae*; apesar de não interferir na capacidade de infecção, mas é uma estratégia viável para estudar a interação planta-microrganismo em *C. musae*;

3. A alta estabilidade mitótica dos transformantes é caracterizada pela integração parcial do plasmídio pBT_6, ao genoma do fungo. A integração do plasmídio ocorreu, nos transformantes analisados, em sítios homólogos ao da β-tubulina, sendo que a alta homologia, entre os genes da β-tubulina de *N. crassa* e *C. musae,* deve ter favorecido a forma de integração;

4. A variabilidade detectada por RAPD, entre os isolados de *C. musae,* caracteriza uma população geneticamente homogênea, que parece manter-se na região do Vale do Ribeira. Não foi possível formar grupos, considerando época e local de isolamento. A reprodução clonal da cultura da bananeira pode ser a responsável por essa uniformidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W.; MITCHELL, D.J. 1992. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Citrus*. **Phytopathology,** St. Paul, **82**: 1377-1382.

ARMALEO, D.; YE, G.; KLEIN, T.M.; SHARK, K.B.; STANFORD, J.C.; JOHNSTON, S.A. 1990. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. **Current Genetics**, Berlin, **17**: 97-103.

ARMSTRONG, J.L. & HARRIS, D.L. 1993. Biased DNA transformation in *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* transformants with benomyl resistance. **Phytopathology**, St. Paul, **83**:328-332.

ARNAU, J.; HOUSEGO, A.P.; OLIVER, R.P. 1994. The use of RAPD markers in the genetic analysis of the plant pathogenic fungus *Cladosporium fulvum*. **Current Genetics**, Berlin, **25**: 438-444.

BALLANCE, O.J. & TURNER, G. 1986. Development of a high frequency transformation vector for *Aspergillus nidulans*. **Current Genetics**, Berlin, **10**: 767-775.

BAYLEY, A.M.; MENA, G.L.; HERRERA-ESTRELLA, L. 1993. Transformation of four *Phytophthora* spp by microprojectile bombardment on intact mycelia. **Current Genetics**, Berlin, **23**: 42-46.

BAYLEY, J.A.; O'CONNELL, R.J; PRING, R.J., NASH, C. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAYLEY, J.A. & JEGER, M.J., ed. ***Colletotrichum:* Biology, Pathology and Control**, Oxford, CAB International, p. 88-120.

BELKHIRI, A. & DICK, M.W. 1988. Comparative studies on the DNA of *Pythium* species and some related taxa. **Journal of General Microbiology**, London, **134**: 2673-2683.

BENNINGER, D.M.; SKRYNIA, C.; PUKKILA, P.J.; CASSELTON, L.A. 1987. DNA-mediated transformation of the Basidiomycete *Coprinus cinereus*. **EMBO Journal**, Oxford, **6**:835-840.

BERNIER, L.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K.; CLARKSON, J.M. 1989. Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to benomyl resistance. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, **60**: 261-266.

BHAIRI, S.; BUCKLEY, J.F.; STAPLES, R.C. 1990. Protein synthesis and gene expression during appressorium formation in *Glomerella cingulata*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, **6**: 1615-1623.

BIDOCHKA, M.J.; MCDONALD, M.A.; ST. LEGER, R.J.; ROBERTS, D.W. 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetics**, Berlin, **25**:107-113.

BLAKEMORE, E.J.A.; DOBSON, M.J.; HOCART, M.J.; LUCAS, J.A.; PEBERDY, J.F. 1989. Transformation of *Pseudocercosporella herpotricoides* using two heterologous genes. **Current Genetics** , Berlin, **16**: 177-180.

BOGO, M.R. 1993. Desenvolvimento de sistemas de transformação para o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Porto Alegre. 119p. [Dissertação de Mestrado, UFRGS].

BOURETT, T.M. & HOWARD, R.J. 1992. *In vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Protoplasma**, Leipzig, **163**: 199-202.

BOWEN J.K.; TEMPLETON, M.D.; SHARROCK, K.R.; CROWHURST, R.N.; RIKKERINK,, E.H.A. 1995. Gene inactivation in the plant pathogen *Glomerella cingulata*: three strategies for the disruption of the pectin lyase gene *pnlA*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, **246**: 196-205.

BOWYER, P.; OSBOURN, A.E.; DANIELS, M.J. 1994. An "instant gene bank" method for heterologous gene cloning: complementation of two *Aspergillus nidulans* mutants with *Gaeumannomyces graminis* DNA. **Molecular and General Genetics**, Berlin, **242**: 448-454.

BRAITHWAITE, K.S. & MANNERS, J.M. 1989. Human hypervariable minisatellite probes detect DNA polymorphism in the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Current Genetics**, Berlin, **16**: 473-475.

BRAITHWAITE, K.S.; IRWIN, J.A.G.; MANNERS, J.M. 1990a. Restriction fragment length polymorphisms in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Stylosanthes* spp. in Australia. **Mycological Research**, Cambridge, **94**: 1129-1337.

BRAITHWAITE, K.S.; IRWIN, J.A.G.; MANNERS, J.M. 1990b. Ribosomal DNA as a molecular taxonomic marker for the group species of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, **3**: 733-738.

BRYSON, R.J.; CATEN, C.E.; HOLLOMON, D.W.; BAYLEY, J.A. 1992. Sexuality and genetics of *Colletotrichum*. *In*: BAYLEY, J.A. & JEGER, M.J., eds. ***Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control**, Oxford, CAB International, p. 27-46.

BUXTON, F.P. & RADFORD, A. 1984. The transformation of mycelial sphaeroplasts of *Neurospora crassa* and the attempted isolation of an autonomous replicator. **Molecular and General Genetics**, Berlin, **196**: 337-344.

CARLSON, P.S. 1988. One company' s attempt to comercialize an agricultural biotechnology technology. **Proceedings of the International Agricultural Reseach and the Private Sector Conference**, Rosslyn, p. 413-422.

CARROL, G.C. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, Brooklin, **69:** 2-9.

CASE, M.E.; SCHWEIZER, M.; KUSNER, S.R.; GILES, N.H. 1979. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. **Proceedings of National Academy of Science** (USA), Washington, **76**: 5259-5263.

CHAKRABOYRT, B.N. & KAPPOR, M. 1990. Transformation of filamentous fungi by electroporation. **Nucleic Acids Research**, London, **18**: 6737.

CHAPELA, I.H.; PETRINI, O.; HAGMANN, W.K. 1991. Monolignol glucosides as specific recognition messengers in fungus-plant symbioses. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, London, **39**: 289-298.

CISAR, C.R.; SPIEGEL, F.W.; TEBEEST, D.O. TROUT, C. 1994. Evidence for mating between isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* with different host specificities. **Current Genetics**, Berlin, **25**: 330-335.

CLARK, C.L.; MILLER, J.D.; WHITEY, N.J. 1989. Toxicity of conifer needle endophytes to spruce budworm. **Mycological Research**, Cambridge, **92**: 508-512.

CLARK, J.; BUTTERS, J.; BRENT, K.J.; HOLLOMON, D.W. 1989. Isozyme uniformity in *Erysiphe graminis f.sp. hordei*. **Mycological Research**, Cambridge, **92**: 404-409.

CLAY, K. 1987. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lollium perenne* and *Festuca arundinacea*. **Oecologia**, Berlin **73**: 358-362.

COOLEY, R.N. & CATEN, C.E. 1988. Transformation of the phytopathogenic fungus *Septoria nodorum* to hygromycin B resistance. **Current Genetics**, Berlin, **13**: 383-389.

COOLEY, R.N. & CATEN, C.E. 1993. Molecular analysis of the *Septoria nodorum* β-tubulin gene and characterization of a benomyl-resistance mutation. **Molecular and General Genetics**, Berlin, **237**:58-64.

COOLEY, R.N. 1992. Use of RFLP analysis, electrophoretic karyotyping and PCR in studies of plant pathogenic fungi. In: STAHL, U. & TUDZYNSKI, P. **Molecular Biology of Filamentous Fungi**. Cambridge, UCH. p.17-26.

COOLEY, R.N.; FRANKLIN, F.C.; CATEN, C.E. 1990. Cotransformation in the phytopathogenic fungus *Septoria nodorum*. **Mycological Research**, Cambridge, **94**: 241-246.

COOLEY, R.N.; GORCOM, R.F.M.; VAN DEN HOLDEL, C.A.M.J.J.; CATEN, C.E. 1991. Isolation of a benomyl-resistant allele of the β-tubulin gene from *Septoria nodorum* and its use as a dominant selectable marker. **Journal of General Microbiology**, London, **137**:2085-2091.

CORNELLISSEN, B.J.C. & MELCHERS, L.S. 1993. Strategies for control of fungal disease with transgenic plants. **Plant Physiology**, Sofia, **101**: 709-712.

CROWHURST, R.N.; HAWTHORNE, B.T.; RIKKERINK, E.H.A.; TEMPLETON, D.M. 1991. Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. **Current Genetics**, Berlin, **20**: 391-396.

DALE, J.L.; MANNERS, J.M.; IRWIN, J.A.G. 1988. *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing different anthracnose diseases on *Stylosanthes* in Australia carry distinct double stranded RNAs. **Transactions of the British Mycological Society**, London, **91**: 671-676.

DAVIDSE, P. 1986. Benzimidazole fungicides mechanism of action and biological impact. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, **24**: 43-65.

DAVIS, B. 1985. Factors influencing protoplast isolation. In: PEBERDY, J.F. & FERENZY, L., ed. **Fungal Protoplasts: Applications in Biochemistry and Genetics**. New York, Dekker, p. 45-72.

DAY, P.R. & DOODS, J.A. 1979. Viruses of the plant pathogenic fungi. In: LEMKE, P.A. **Viruses and Plasmids in Fungi**. New York, p.201-238.

DENOYES, B. & BAUDRY, A. 1995. Species identification and pathogenicity study of french *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics. **Phytopathology**, St. Paul, **85**: 53-57.

DEVOS, K.M. & GALE, M.D. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **84**: 567-572.

DHAWALE, S.S.; PAIETTA, J.V.; MARZLUF, G.A. 1984. A new, rapid and efficient transformation procedure for *Neurospora crassa*. **Current Genetics**, Berlin, **8**: 77-79.

DICKMAN, M.B. 1988. Whole cell transformation of the alfalfa fungal pathogen *Colletotrichum trifolii.* **Current Genetics**, Berlin, **14**: 241-6.

DICKMAN, M.B. & PARTRIDGE, J.E. 1989. Use of molecular markers for monitoring fungi involved in stalk rot of corn. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **77**:535-539.

DICKMAN, M.B. & PATIL, S.S. 1986. Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* are nonpathogenic to papaya fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, **28**: 235-242.

DICKMAN, M.B. ; BUHR, T.L.; WARWAR, V.; TRUSDELL, G.; HUANG, C.X. 1995. Molecular signals during the early stages of alfafa anthracnose. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **73**: 1169-1177.

DICKMAN, M.B.; PODILA, G.K.; KOLATTUKUDY, P.E. 1989 Insertion of cutinase gene into a wound pathogen enables it to infect intact host. **Nature**, London, **342**: 446-448.

FEGAN, M.; MANNERS, J.M.; MACLEAN, D.J.; IRWIN, J.A.G.; SAMUELS, K.D.Z.; HOLDON, D.G. LI, D.P. 1993. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, London, **139**: 2075-2081.

FERNÁNDEZ-LARREA, J. & STAHL, U. 1989. Transformation of *Podospora anserina* with a dominant resistance gene. **Current Genetics**, Berlin, **16**:57-60.

FINCHAM, J.R.S. 1989. Transformation of fungi. **Microbiological Reviews**, Washington, **53**: 148-170.

FUNGARO, M.H.P. 1994. **Uso do RAPD na taxonomia**. Anais IX Encontro de geneticistas do Rio Grande do Sul, Caxias do Sul. 78p.

FUNGARO, M.H.P; RECH, E.; MUHLEN, G.S.; VAISNTEIN, M.H.; PASCON, R.C.; QUEIROZ, M.V.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. 1995. Transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment on intact conidia. **FEMS Microbiological Letters**, Amsterdam, **125**: 293-298.

GEMS, D.; JOHNSTONE, I.L.; CLUTTERBUCK, A.J. 1991. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. **Gene**, Amsterdam, **98**: 61-67.

GOETTEL, M.S.; ST. LEGER, R.S.; BHAIRI, S.; JUNG, M.K.; OAKLEY, B.R.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R. 1990. Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stably transformed to benomyl resistance. **Current Genetics**, Berlin, **17**:129-132.

GOLDMAN, G.H.; VAN MONTAGU, M.; HERRERA-ESTRELA, A. 1990. Transformation of *Trichoderma harzianum* by high voltage electric pulse. **Current Genetics**, Berlin, **17**: 1167-1174.

GOODWIN, P.H. & ANNIS, S.L. 1991. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, **57**:2482-2486.

GROTELUESCHEN, J. & METZENBERG, R.L. 1995. Some properties of the nucleus determines the competence of *Neurospora crassa* for transformation. **Genetics**, Princeton, **139**:1515-1551.

GUNNELL, P.S. & GUBLER, W.D. 1992. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Mycologia**, New York, **84**: 157-165.

GUTHRIE, P.A.I.; MAGILL, C.W.; FREDERIKSEN, R.A.; ODVODY, G.N. 1992. Random amplified polymorphic DNA markers: a system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, St. Paul, **82**: 832-838.

HARMSEN, C.; TOLNER, B.; KRAM, A.; GO, J.S.; WESSELS, G.H. 1991. Sequences of three dsRNA associated with La France disease of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*). **Current Genetics**, Berlin, **20**: 137-144.

HAYDEN, H.L.; PEGG, K.G.; AITKEN, E.A.B.; IRWIN, J.A.G. 1994. Genetic relationships as assessed by molecular markers and cross-infection among strains of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, **42**: 9-18.

HE, S.; OHM, H.; MAC KENZIE, S. 1992. Detection of DNA sequence polymorphisms among wheat varieties. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **84**: 573-578.

HENSON, J.M.; BLAKE, N.K. ; PILGERAM, A.L. 1988. Transformation of *Gaeuneromyces graminis* to benomyl resistance. **Current Genetics**, Berlin, **14**: 113-117.

HILBER, U.W.; BODMER, M.; SMITH, F.D.; KOLLER, W. 1994. Biolistic transformation of conidia of *Botryotinia fuckeliana*. **Current Genetics**, Berlin, **25**: 124-127.

HINNEN, A. HICKS, J.B.; FINK, G.R. 1978. Transformation of yeast chimeric *Col*E1 plasmid carrying *LEU2*. **Proceedings of the National Academy of Science** (USA), Washington, **75**: 1929-1933.

HOWARD, R.J & FERRARI, M.A. 1989. Role of melanin in appressorium function. **Experimental Mycology**, New York, **13**:403-418.

HUFF, D.R.; BUNTING, T.E.; PLUMLEY, K.A. 1994. Use of random amplified polymorphic DNA markers for the detection of genetic variation in *Magnaporthe poae*. **Phytopathology**, St. Paul, **84**:1312-1316.

HULBERT, S.H. & MICLHELMORE, R.W. 1989. DNA restriction length polymorphism and somatic variation in the lettuce downy mildew fungus, *Bremia lactucae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Berlin, **1**: 17-24.

ITO, H.; FUKUDDA, Y.; MURATA, K.; KIMURA, A. 1983. Transformation of intact cells treated with alkali cations. **Journal of Microbiology**, *New York,* **153**: 163-168.

JUDELSON, H.S.; COFFEY, M.D.; ARREDONDO, F.R.; TYLER, B.M. 1993. Transformation of the oomycete pathogen *Phytophtora megasperma* f.sp. *glycinea* occurs by DNA integration into single or multiple chromosomes. **Current Genetics**, Berlin, **23**: 211-218.

KAWCHUK, L.M.; KIM, W.K.; NIELSEN, J. 1988. A comparison of polypeptides from the wheat bunt fungi, *Tilletia laevis, T. tritici, and T. controversa*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **66**: 2367-76.

KIMATI, H. & GALLI, F. 1970. *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld et v Schrenk f. sp. *phaseoli*, fase ascogena do agente causal da antracnose do feijoeiro. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, **27**: 411-437.

KISTLER, H. C. & LEONG, S.A. 1986. Linear plasmidlike DNA in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporium* f.sp. *conglutinans.* **Journal of Bacteriology**, Baltimore, **167**: 587-593.

KISTLER, H.C. & BENNY, U. 1992. Autonomously replicating plasmids and chromosome rearrangement during transformation of **Nectria haematococca**. **Gene**, Amsterdam, **117**: 81-89.

KOLLER, W.; PARKER, D.M. 1982. Role of cutinase and cell wall degrading enzymes in infection of *Pisum sativum* and *Fusarium solani* f. sp. *pisi.* **Physiological Plant Pathology** , London, 79: 278-283.

KUBO, Y.; FURUSAWA, I.; SHISHIYAMA, J. 1987. Relation between pigment intensity and penetrating ability in appressoria of *Colletotrichum langenarium.* **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa **33**: 871-873.

KUBO, Y.; NAKAMURA, H.; KOBAYASHI, K.; OKUNO, T.; FURUSAWA, I. 1991. Cloning of a melanin biosynthetic gene essential for appressorial penetration of *Colletotrichum lagenarium.* **Molecular Plant Microbe Interactions**, Berlin, **4**:440-445.

LENNÉ, J.M. & BURDON, J.J. 1990. Preliminary study of virulence and isozymic variation in natural populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes guianensis*. **Phytopathology**, St, Paul, **80**: 728-731.

LESLEY, J.F. & DICKMAN, M.B. 1991. Fate of DNA encoding hygromycin resistance after meiosis in transformed strains of *Giberella fujikuroi (Fusarium moniliforme).* **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, **57**:1423-1429.

LEWIS, D.H. 1973. The relevance of symbioses to taxonomy and ecology with particular reference to mutualistic symbioses and the exploitation in marginal habitats. In:

HEYWOOD, V.H. ,ed. **Taxonomy and Ecology**. Academic Press. London, p. 151-172.

MACLEAN, D.J.; BRAITHWAITE, K.S.; MANNERS, J.M.; IRWIN, J.A.G. 1993. *How do we identify and classify plant pathogens in the era of DNA analysis?* In: ANDREWS, J. & TOMMERUP, I. ,ed. **Advances in Plant Pathology**, New York, Academic Press. v. 10, p. 207-244.

MARMEISSE, R.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.F.J.M.; GOOSEN, T.; DE WIT, P.G.J.M. 1993. Disruption of the avirulence gene *avr9* in two races of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* causes virulence on tomato genotypes with the complementary resistance gene *Cf9*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Berlin, **6**: 412-417.

MASEL, A.; BRAITHWAITE, K.S.; IRWIN, J.A.G.; MANNERS, J.M. 1990. Highly variable karyotypes in the plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides.* **Current Genetics**, Berlin, **18**: 81-86.

MASEL, A.; IRWIN, J.A.G.; MANNERS, J.M.; 1993. DNA addition or deletion is associated with a major karyotype polymorphism in the fungal phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides.* **Molecular and General Genetics**, Berlin, **237**:73-80.

MEIJER, G.; MEGNENNEAU, B.; LINDERS, E.G.A. 1994. Variability for isozyme, vegetative compatibility and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinaria.* **Mycological Research**, Cambridge, **98**:267-276.

MENDGEN, K.& DEISING, H. 1993. Infection structures of plant pathogens-a cytological and physiological evaluation. **New Phytologist**, New York, **124**: 193-213.

MIAO, V.P.W.; MATTHEWS, D.E.; VAN ETTEN, H.D. 1991. Identification and chromosome locations of a family of cytochrome P-450 genes for pisatin

detoxification in the fungus *Nectria haematococca*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, **226**: 214-223.

MIAO, V.P.W.; ROUTREE, M.R.; SELKER, E.U. 1995. Ectopic integration of transforming DNA is rare among *Neurospora* transformants selected for gene replacement. **Genetics**, Princeton, **139**:1533-1544.

MILLS, D. & McCLUSKEY, K. 1990. Eletrocphoretic karyotypes of fungi: The new cytology. *Molecular Plant Microbe Interactions,* Berlin, **3**: 351-357.

MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S. BROWN, A.E. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, **98**:137-144.

MOGEN, K.L.; MALCOLM, R.S.; SCHARDL, C.L. 1991. Linear DNA plasmids of the perennial ryegrass choke pathogen, *Epichloe typhina* (Clavicipitaceae). **Current Genetics**, Berlin, **20**: 519-526.

MURRAY, F.R.; LATCH, G.C.M.; SCOTT, D.B. 1992. Surrogate transformation of perenial ryegrass, *Lolium perene*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. **Molecular and Cell Biology**, Washington, **233**: 1-9.

NEWTON, A.C. & CATEN, C.E. 1985. Variation for isozymes and double stranded RNA among isolates of *Puccinia striiformis* and two other cereal rusts. **Plant Pathology**, Oxford, **34**: 235-247.

NICHOLSON, P. & REZANOOR, H.N. 1994. The use of random amplified polymorphic DNA to identify pathotype and detect variation in *Pseudocercosporella herpotrichoides*. **Mycological Research**, Cambridge, **98**:13-21.

NOSEK, J.; FILIPP, D.; BEDERKOVA, K.; GRIAC, P. 1993. Isolation of a dsRNA virus from *Dipodascus (Endomyces) magnusii*. **Current Genetics**, Berlin, **23**:219-222.

NOVAK, C. & KUCK, U. 1994. Development of an homologous transformation system for *Acremonium chrysogenum* based on the β- tubulin gene. **Current Genetics**, Berlin, **25**:34-40.

O' CONNELL, R.J. & RIDE, J.P. 1990. Chemical detection and ultrastructural localization of chitin in cell walls of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, **37**: 39-53.

ORBACH, M., PORRO, E.B.; YANOFSKY, C. 1986. Cloning and characterization of the gene for β-tubulin from a benomyl resistant mutant of *N. crassa* and its use as a benomyl dominant selectable marker. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, **6**: 2452-2461.

OSSANNA, N. & MISCHKE, S. 1990. Genetic transformation of the biocontrol fungus *Gliocladium virens* to benomyl resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, **56**:3052-3056.

PANACCIONE, D.G. & HANAU, R.M. 1990 Characterization of two divergent β- tubulin genes from *Colletotrichum graminicola*. **Gene**, Amsterdam, **86**:163-170.

PANACCIONE, D.G.; McKIERNAN, M.; HANAU, R.M. 1988. *Colletotrichum graminicola* transformed with homologous and heterologous benomyl resistance genes retains expected pathogenicity to corn. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Berlin, **1**: 113-120.

PASCHOLATI, S.F.; YOSHIOKA, H.; KUNOH, H.; NICHOLSON, R.L. 1992. Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*: Cutinase is a component of the conidial exudate. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, **41**:53-59.

PEREIRA, J.O. 1993. Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish*. Piracicaba. 105p. [Tese de doutoramento-ESALQ/USP].

PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. 1993. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycology**, Lancaster, **85** :362-364.

PETRINI, O. 1984. Endophytic fungi in british Ericaceae: a preliminary study. **Transactions of the British Mycological Society**, London, **83**: 510-512.

PETRINI, O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J VAN DEN ,ed., **Microbiology of Phyllosphere**. Cambridge. Cambridge University Press, p. 175-187.

PETRINI, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. *In*: ANDREWS, J. & HIRANO, S.S., ed. **Microbial ecology of leaves**, Berlin, Spring Verlag, p.179-197.

PILGERAN, A.L. & HENSON, J.M. 1990. Transformation and cotransformation of *Gaeuneromyces graminis* to phleomycin resistance. **Phytopathology**, St. Paul, **80:** 1124-9.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MAC DONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, New York, **5**:141-238.

PUNT, P.J. & VAN DEN HOLDEN, C.A.M.J.J. 1993. Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance markers. **Methods in Enzymology**, New York, **216**: 447-457.

RAEDER, U. & BRODA, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, **1**: 17-20.

RASMUSSEN, J.B. & HANAU, R.M. 1989. Exogenous scytalone restores appressorial melanization and pathogenicity in albino mutants of *Colletotrichum graminicola.* **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, **11**: 349-352.

REDMAN, R.S. & RODRIGUES, R.J. 1994. Factors affecting the efficient transformation of *Colletotrichum* species. **Experimental Mycology**, New York, **18**:230-246.

REITER, S.; WILLIANS, J.G.K.; FELDMANN, K.A.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V.; SCOLNIK, P.A. 1992. Global and local genome identification in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. **Proceedings of the National Academy of Science** (USA), Washington, **89**:1477-1481.

RICHEY, M.G.; MAREK, E.T.; SCHARDL, C.L.; SMITH, D.A. 1989. Transformation of filamentous fungi with plasmid DNA by electroporation. **Phytopathology**, St. Paul, **79**:844-847.

RIKKERINK, E.H.A.; SOLON, S.L.; CROWHURST, R.N.; TEMPLETON, M.D. 1994. Integration of vectors by homologous recombination in the plant pathogen *Glomerella cingulata*. **Current Genetics**, Berlin, **25**:202-208.

RODRIGUES, R.J. & REDMAN, R.S. 1992. Molecular transformation and genome analysis of Colletotrichum. In: BAYLEY,J.A. & JEGER, M.J. ,ed. ***Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control**. Oxford, CAB International, p.47-66.

RODRIGUES, R.J. & YODER, O.C. 1987. Selectable genes for transformation of the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli (Colletotrichum lindemuthianum).* **Gene**, Amsterdam, **54**: 73-81.

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

SAIKI, R.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.; HORN, G. 1985. Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, **230**: 1350-1354.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, New York, 2 ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor.

SÀNCHEZ-FERNANDEZ, R.; UNKLES, S.E.; CAMPBELL, E.I.; MACRO, J.A.; CERDÁ-OLMEDO, E.; KINGHORN, J.R. 1991. Transformation of the filamentous fungus *Gibberella fujikuroi* using the *Aspergillus niger niaD* gene encoding nitrate reductase. **Molecular and General Genetics**, Berlin, **225**: 231-233.

SCHAFER, C. & WOSTMEYER, J. 1992. Random primer dependent PCR differentiates aggressive and non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingan (Leptosphaeria maculans)*. **Journal of Phytopathology**, Lancaster, **136**:124-136.

SHIGEKAWA, K. & DOWER, W.J. 1988. Electroporation of eucaryotes and procaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. **Biotechniques**, New York, **6**:742-751.

SIEGEL, M.R. 1993. *Acremonium* endophytes: our current state of knowledge and future directions for researches. **Agricultural and Ecosystemal Environmental**, Melbourne, **48**: 557-568.

SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. 1987. Protoplast fusion and genetic recombination in *Metarhizium anisopliae*. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, **9**: 149-152.

SKATRUD, P.L.; QUEENER, S.W.; CARR, L.G.; FISHER, D.L. 1987. Efficient integrative transformation of *Cephalosporium acremonium*. **Current Genetics**, Berlin, **12**:337-348.

SOBRAL, B.W.S. & HONEYCUTT, R.J. 1994. Genetics, plants and the polymerase chain reaction. In: MULLIS, K.B.; FERRÉ, F.; GIBBS, R.A. ,ed **The polymerase chain reaction**. Boston, Birkhauser, 158p.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E.; MILLS, P.R. 1992. DNA sequence variation and interrelationship among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, London, **33**: 121-124.

SREENIVASAPRASAD, S. BROWN, A.E.; MILLS, P.R. 1993. Coffee berry disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycological Research**, Lancaster, **97**: 995-1000.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreane*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, Washington, **260**: 214-216.

SUTTON, B.C. 1980. **The *Coleomycetes***. Commonwealth Mycological Institute: Kew, UK, 1980.

SUTTON, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. *In*: BAILEY, J.A. & JEGER, M.J. ,ed. ***Colletotrichum:* Biology, Pathology and Control**, Oxford, CAB International Oxford, Cap.1, p.1-26.

SUZUKI, K.; FURUZAWA, I.; ISHIDA, N.; YAMAMOTO, M. 1982. Behaviour of colorless appressoria in the albino mutant of *Colletotrichum lagenarium*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, **28**: 1210-1213.

TALBOT, N.J.; OLIVER, R.P.; CODDINGTON, A. 1991. Pulsed field gel electrophoresis reveals chromosome length differences between strains of *Cladosporium fulvum*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, **229**: 267-272.

TAYLOR, J.L. BORGMAN, I; SÉGUIN- SWARTZ, G. 1991. Electrophoretic karyotyping of *Leptosphaeria maculans* differentiates highly virulent from weakly virulent isolates. **Current Genetics**, Berlin, **19**: 273-277.

TEBEEST, D.O. & WEIDMANN, G.J. 1990. Preparation and regeneration of protoplasts of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschiyromene*. **Mycologia**, *New York*, **82**: 249-255.

TEDFORD, E.C.; JAFFEE, B.A.; MULDOON, A.E. 1994. Variability among isolates of the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis*. **Mycological Research**, Cambridge, **98**: 1127-1136.

THAN, F.Y.; LUCAS, J.A.; WILSON, Z.A. 1994. DNA fingerprinting of *Peronospora parasitica*, a biotrophic fungal pathogen of crucifers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, **88**: 490-496.

TIMBERLAKE, W.E. & MARSHALL, M.A. 1989. Genetic engineering of filamentous fungi. **Science**, Washington, **244**:1313-1317.

TOOLEY, P.W., HEWINGS, A.D.; FALKENSTEIN, K.F. 1989. Detection of double stranded RNA in *Phytophthora infestans*. **Phytopathology**, St. Paul, **79**: 470-474.

TOUBART, P.; DESIDERIO, A. SALVI, G.; CERVONE, F.; DARODA, L.; DE LORENZO, G.. 1992. Cloning and characterization of the gene encoding the endopolygalacturonase protein (PGIP) of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Journal**, Oxford, **2**: 367-373.

TSAI, S.; SIEGEL, M.R.; SCHARDL, L. 1992. Transformation of *Acremonium coenophialum*, a protective fungal symbiont of the grass *Festuca arundinacea*. **Current Genetics** , Berlin, **22**: 339-406.

TURGEON, B.G.; GARBER, R.C.; YODER, O.C. 1985. Transformation of the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* using the *Aspergillus nidulans amdS* gene. **Molecular and General Genetics**, Berlin, **201**:450-453.

TURGEON, B.G.; GARBER, R.; YODER, O.C. 1987. Development of a fungal transformation system based on selection of sequences with promoter activity. **Molecular and Cell Biology**, Washington, **7**: 3297-3305.

TURNER, G. 1994. Vectors for genetic manipulation. In: MARTINELLI, S.D. & KINGHORN, J.R.,ed. **Aspergillus: 50 years on. Progress in Industrial Microbiology**, Amsterdam, **v. 29**, cap.24, p.641-664.

VAILLANCOURT, L. & HANAU, R.M. 1991. A method for genetic analysis of *Glomerella graminicola (Colletotrichum graminicola)* from maize. **Phytopathology**, St. Paul, **81**: 530-534.

VAN DER PLOEG, L.H.T.; SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C.R.; BORST, P. 1984. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei* analysed by electrophoretic separation of chromosome-sized DNA molecules. **Cell**, Cambridge, **37**: 77-84.

VASCONCELLOS, M.J.V.; MACHADO, M.A.; ALMEIDA, A.A.H.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. 1994. Differentiation of *Colletotrichum truncatum* isolates by random amplified polymorphic DNA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, **19**: 520-523.

WELCH, J. & McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, **18**: 7213-7218.

WILLIANS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFASKI, J.A.; TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, **18**: 6531-6535.

WILLIANS, J.G.K.; RAFASKI, J.A.; TINGEY, S.V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA. **Methods in Enzymology**, *New York,* **218**: 706-740.

WNENDT, S.; JACOBS, M. STAHL, U. 1990. Transformation of *Aspergillus giganteus* to hygromycin B resistance. **Current Genetics**, Berlin, **17**: 21-24.