

IRENE DA SILVA COELHO

**Obtenção e regeneração de protoplastos e cariótipo eletroforético
de fungos micorrízicos de orquídeas**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de “Magister Scientiae”

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

RESUMO

COELHO, Irene da Silva, MS., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2005.
Obtenção e regeneração de protoplastos e cariótipo eletroforético de fungos micorrízicos de orquídeas. Orientadora: Elza Fernandes de Araújo.
Conselheiros: Marisa Vieira de Queiroz e Maurício Dutra Costa.

O objetivo deste trabalho foi padronizar as condições de obtenção e regeneração de protoplastos de *Epulorhiza repens* e *Ceratorhiza* sp. e determinar o cariótipo eletroforético de *Ceratorhiza* sp. Para o fungo *Epulorhiza repens*, a maior produção de protoplastos, $8,0 \times 10^6$ protoplastos/mL, foi obtida em KCl 0,6 M, na presença de 15 mg/mL de “Lysing Enzymes” e 0,5 g de micélio fúngico com 2 dias idade, após fragmentação em liquidificador. A maior frequência de regeneração obtida foi de 8,5 % quando sacarose 0,5 M foi utilizada como estabilizador osmótico. Do total de protoplastos obtidos, 58,6 % eram uninucleados, 21,4 % binucleados e 20 % anucleados. Para o fungo *Ceratorhiza* sp., a maior produção de protoplastos, $4,0 \times 10^7$ protoplastos/mL, foi obtida em NaCl 0,6 M, na presença de 15 mg/mL de “Lysing Enzymes” e 15mg/mL de Glucanex, 0,5 g de micélio fúngico com 2 dias de idade, após fragmentação em liquidificador. A maior frequência de regeneração obtida foi de 6,7 % utilizando sacarose 0,5 M como estabilizador osmótico. Do total de protoplastos obtidos, 61 % eram uninucleados, 24,6 % binucleados, 3,2 % trinucleados e 11,2 % anucleados. O cariótipo eletroforético do fungo *Ceratorhiza* sp.

apresentou no mínimo, 3 cromossomos cujos tamanhos foram estimados em 4,6; 3,5 e 2,2 Mb. A maior intensidade da banda de 4,6 Mb sugere que esta possa estar representando dois cromossomos, sendo o tamanho do genoma estimado em pelo menos 14,9 Mb. O estabelecimento de protocolos otimizados para obtenção e regeneração de protoplastos dos fungos *Epulorhiza repens* e *Ceratorhiza* sp. é importante, permitindo o estabelecimento de técnicas de transformação genética, o isolamento de mutantes, a determinação de cariótipo eletroforético e o cruzamento de linhagens. O cariótipo de *Ceratorhiza* sp. é importante para a determinação do número e do tamanho dos cromossomos, para se estimar o tamanho do genoma e a localização de genes relacionados à formação de micorrizas.

ABSTRACT

COELHO, Irene da Silva, MS., Universidade Federal de Viçosa, February of 2005.
Formation and regeneration of protoplasts and electrophoretic karyotype of orchid mycorrhizal fungi. Advisor: Elza Fernandes de Araújo. Committee Members: Marisa Vieira de Queiroz and Maurício Dutra Costa.

This study was conducted in order to standardize the formation conditions and regeneration of *Epulorhiza repens* and *Ceratorhiza* sp. protoplasts and also to determine the electrophoretic karyotype of *Ceratorhiza* sp. For *Epulorhiza repens*, the highest production of protoplasts, $8,0 \times 10^6$ protoplasts/mL, was obtained in KCl 0,6 M, with 15 mg/mL of "Lysing Enzymes" and 0,5 g of mycelium at 2 days, after fragmentation in the liquefier. The best regeneration frequency, 8,5 %, was achieved when sucrose 0,5 M was used as an osmotic stabilizer. From total protoplasts obtained, 58,6 % were uninucleate, 21,4 % binucleate and 20 % anucleate. For *Ceratorhiza* sp. the highest production of protoplasts, $4,0 \times 10^7$ protoplasts/mL, was obtained in NaCl 0,6 M, with 15 mg/mL of "Lysing Enzymes" and 15 mg/mL of Glucanex, and 0,5 g of mycelium at 2 days, after fragmentation in the liquefier. The best regeneration frequency, 6,7 %, was achieved when sucrose 0,5 M was used as an osmotic stabilizer, and from total protoplasts obtained, 61 % were uninucleate, 24,6 % binucleate, 3,2 % trinucleate and 11,2 % anucleated. The electrophoretic karyotype of *Ceratorhiza* sp. showed at least 3 chromosomes around 4,6; 3,5 and 2,2

Mb. The highest intensity of the band 4,6 Mb suggests that it represents two chromosomes, and the genome height was estimated in, at least, 14,9 Mb. It is important to establish optimized protocols for obtaining and regenerating protoplasts of *Epulorhiza repens* and *Ceratorhiza* sp. to allow the establishment of techniques of genetic transformation, mutant isolation, electrophoretic karyotype determination and crossings between strains. *Ceratorhiza* sp. karyotype is important to determine chromosomes number and height, to estimate genome height and gene localization related to mycorrhizas formation.