

LUCIANA AGUILAR ALEIXO

**Análise de variabilidade e obtenção de protoplastos do fungo
Fusarium solani f. sp. *glycines*, agente causal da síndrome da
morte súbita em soja (*Glycine max* L. Merrill)**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para a
Obtenção do título de “Magister
Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

LUCIANA AGUILAR ALEIXO

**Análise de variabilidade e obtenção de protoplastos do fungo
Fusarium solani f. sp. *glycines*, agente causal da síndrome da
morte súbita em soja (*Glycine max* L. Merrill)**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para a
Obtenção do título de “Magister
Scientiae”.

APROVADA: 26 de junho de 2003

Prof^a Marisa Vieira de Queiroz
(Conselheira)

Prof^o Everaldo Gonçalves de Barros
(Conselheiro)

Prof^o João Marcos de Araújo

Prof^a Tânia Maria Fernandes Salomão

Prof^a Elza Fernandes de Araújo
(Orientadora)

“Somos o que fazemos, mas somos principalmente, o que fazemos para mudar o que
somos”

Eduardo Galeano

“As mentes são como pára-quedas
Só funcionam quando estão abertas”

Ruth Noller

“As pessoas que vencem nesse mundo
São aquelas que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram,
as criam”

Bernard Shaw

“Só é útil o conhecimento que nos faz melhores”

Sócrates

“ O sábio que se mostra orgulhoso e pedante revela que não sabe honrar a Ciência”

Alfredo Guimarães Chaves

“Quem passou pela vida em branca nuvem
E em plácido silêncio adormeceu
Quem nunca sentiu o frio da desgraça
Quem passou pela vida e não sofreu
Foi espectro de homem
Não foi homem
Só passou pela vida
Não viveu”

Francisco Otaviano

Aos meus queridos pais, Vanda e João Ernesto,
com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Microbiologia e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização deste trabalho;

Ao CNPq, pela concessão de bolsa durante meu mestrado;

À professora Elza, que desafiando as dificuldades, orientou-me ao longo do meu mestrado;

À professora Marisa, pela dedicação e paciência com que acompanhou meus experimentos;

Ao professor Everaldo pelas sugestões e ajuda na redação deste trabalho;

Ao professor José Luís, que gentilmente cedeu os isolados e as raízes contaminadas, tornando possível este trabalho;

Aos professores Tânia e João Marcos, que prontamente se dispuseram a participar da banca, pelos acréscimos;

Aos colegas do laboratório de Genética de Microrganismos, Francis, Ronney, João, Rodrigo, Michele, Jildete, Júpiter, Viviane, Janaína, Klédna, Marcos, Juliana, Denise, Andréa, Jorge, Patrícia, pela convivência agradável e auxílio imprescindível no laboratório;

Aos colegas da microbiologia, em especial à Liliane, Teresa, André, Akihiko, Zeca, Agenor e Alex, pela amizade;

Aos funcionários da UFV pelo apoio e simplicidade, em especial ao Cupertino, pela ajuda na identificação dos isolados e constante disponibilidade;

A todos os professores com que estudei na UFV, cujos ensinamentos foram essenciais em minha formação;

A meus queridos pais, Vanda e João Ernesto, exemplos de conduta, que me deram asas para voar em busca de meus sonhos e sempre fizeram de minhas conquistas sua realização;

A meus irmãos Leonardo e Leandro, pelo carinho e por dividirem comigo seus desejos, medos e conquistas;

A todos os meus familiares, principalmente a meus avós, Conceição e Dimas pelo carinho e conselhos;

A meus amigos da Bio 97, em especial à Eloá, Fabiana, Francis, Sapo, Danival, Alexandre, Natália, Alessandra, Fabrícia e Tiago, com quem aprendi que na vida o que há de mais precioso são as pessoas que nos querem bem, e que bons conselhos muitas vezes são dados na hora certa, embora nem sempre estejamos preparados para eles;

A meus grandes amigos Joana, Geuderson, André, Che, e outros tantos com quem passei momentos inesquecíveis nesses anos em Viçosa, pelo carinho e apoio;

Aos novos amigos Paula, Dani, Ricardo, Zélia, Camila, Arlindo, Karla, Fernanda Bombom, Mec e Meirellis, pelo companherismo;

A todos aqueles que acreditaram em mim e de alguma forma contribuíram para meu crescimento.

Ao meu grande amor, Carlos André, cujo exemplo e cumplicidade me ajudaram a ver o futuro com otimismo e esperança.

BIOGRAFIA

Luciana Aguilar Aleixo, filha de João Ernesto Aleixo e Vanda Margarida de Aguilar Aleixo, nasceu em Timóteo, Minas Gerais no dia 1º de novembro de 1978.

Em março de 1997, iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa, tendo se graduado em março de 2001.

Em abril de 2001, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento nesta mesma universidade.

Em junho de 2003, defendeu tese, obtendo o título de Magister Scientiae em Genética e Melhoramento, pela Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Microrganismo.....	11
3.2. Isolamento do fungo a partir da raiz de soja.....	12
3.3. Manutenção dos estoques das culturas e preparo do inóculo.....	13
3.4. Meio de cultivo e soluções.....	13
3.5. Extração de DNA total.....	14
3.6. Amplificação do DNA total por RAPD.....	15
3.7. Análise dos dados.....	15
3.8. Obtenção de protoplastos.....	16
3.9. Regeneração dos protoplastos.....	16
3.10. Coloração de núcleos.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1. Isolamento de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>glycines</i> a partir de fragmentos de raízes de soja.....	17
4.2. Análise de variabilidade genética por RAPD.....	21
4.3. Obtenção de protoplastos.....	31

4.4. Regeneração dos protoplastos.....	33
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

RESUMO

ALEIXO, Luciana Aguilar, M.S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2003.

Análise de variabilidade genética e obtenção de protoplastos do fungo *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, agente causal da síndrome da morte súbita em soja (*Glycine max* L. Merrill). Orientadora: Elza Fernandes de Araújo. Conselheiros: Marisa Vieira de Queiroz e Everaldo Gonçalves de Barros.

Fusarium solani f. sp. *glycines*, agente causal da síndrome da morte súbita em soja, é um importante patógeno no Brasil e em outras partes do mundo. Foram obtidos 15 isolados de *F. solani* f. sp. *glycines* a partir de 57 fragmentos de raiz de soja coletados em diferentes localidades no Brasil. A diversidade genética destes 15 isolados e de outros 4 isolados cedidos pelo Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, foi avaliada por RAPD. As amplificações com 15 oligonucleotídeos resultaram em 175 fragmentos polimórficos e 5 monomórficos. As distâncias genéticas entre os isolados variaram de 12,2 a 85%, revelando alta variabilidade genética. Não houve agrupamento dos isolados de acordo com seu local de coleta. Esta alta variabilidade genética provavelmente se deve à presença de transposons e de ciclo parassexual do patógeno. Protoplastos de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* foram obtidos por digestão enzimática do micélio, na presença de MgSO_4 1,2 M como estabilizador osmótico. Foram liberados $2,4 \times 10^7$ protoplastos/mL após 4 horas de digestão do micélio a 28°C e 80 rpm. A concentração ideal de enzima lítica para a protoplastização foi de 15 mg/mL. A maior taxa de regeneração dos protoplastos foi de 5,5% em meio BDA estabilizado com sacarose 1,0 M.

ABSTRACT

ALEIXO, Luciana Aguilar, M.S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2003.

Genetic variability and protoplasts isolation of *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, the causative agent of sudden death syndrome in soybean (*Glycine max* L. Merrill). Adviser: Elza Fernandes de Araújo. Committee members: Marisa Vieira de Queiroz e Everaldo Gonçalves de Barros.

Fusarium solani f. sp. *glycines*, the causative agent of sudden death syndrome in soybean, is an important pathogen in Brazil and in other parts of the world. Fifteen *F. solani* f. sp. *glycines* isolates were obtained out of 57 root fragments collected in different growing regions in Brazil. The genetic diversity of these isolates and that of four isolates obtained from the Department of Plant Sciences of the Federal University of Viçosa were analyzed by RAPD. Amplification with 15 primers resulted in 175 polymorphic and 5 monomorphic DNA fragments. The genetic distances among the isolates ranged from 12.2 to 85%. No grouping was obtained based on geographic localization, certainly because there were not enough differentiation. This high genetic variability is probably due to the activity of transposons and the presence of the parasexual reproduction. *Fusarium solani* f. sp. *glycines* protoplasts were obtained by enzymatic digestion of micelium, using 1,2 M MgSO_4 as osmotic stabilizer. Approximately 2.4×10^7 protoplasts/mL were obtained after 4 hours of micelium digestion at 28°C e 80 rpm. The optimum enzyme concentration was 15 mg/mL. The highest protoplast regeneration rate was 5.5% in BDA stabilized with 1,0 M sucrose.

1. INTRODUÇÃO

A síndrome da morte súbita é responsável por grandes perdas na produção de soja em todo o mundo, inclusive no Brasil. Esta doença é causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, e se caracteriza principalmente por podridão da raiz, manchas cloróticas nas folhas e queda precoce das vagens. A resistência a essa doença é determinada por vários locos, o que dificulta o desenvolvimento de uma cultivar de soja completamente resistente.

O gênero *Fusarium* apresenta taxonomia complexa em função da alta variação morfológica exibida por muitas espécies devido às condições de crescimento. Colônias de *F. solani* f. sp. *glycines* crescidas em meio BDA apresentam um halo azul característico que as diferenciam de outras espécies de *Fusarium*. Entretanto, isolados desta espécie cultivados repetidas vezes em meio rico em carboidrato, perdem o halo característico e também a habilidade de causar os sintomas foliares da doença.

Apesar da grande importância deste fungo devido aos prejuízos causados à cultura de soja, poucas informações encontram-se disponíveis na literatura acerca de suas características fisiológicas e genéticas, o que retarda a elucidação de sua interação com a soja, dificultando o controle da síndrome da morte súbita.

Um estudo importante na caracterização da espécie é a análise da sua variabilidade genética. A técnica de RAPD-PCR é bastante apropriada para este fim, uma vez que não requer conhecimentos prévios do genoma da espécie, apresenta menor custo que outras técnicas moleculares e permite a obtenção de resultados com relativa rapidez.

Outro ponto de partida para o estudo genético do fungo, visando posterior isolamento de genes de avirulência e fatores envolvidos na patogenicidade, é a obtenção de protoplastos. A parede celular destes organismos é espessa e impede a transformação, a fusão de núcleos e a análise cariotípica das células intactas. Por isso é necessário a degradação da parede com enzimas líticas, para que tais experimentos possam ser realizados.

Após a obtenção dos protoplastos, é interessante que eles regenerem a parede celular reconstituindo uma célula intacta. A regeneração é um processo que ocorre naturalmente na célula, mas é preciso que se estabeleçam as condições adequadas, o que depende do acréscimo de estabilizador osmótico adequado. Inúmeros estabilizadores osmóticos vêm sendo utilizados na obtenção de protoplastos bem como na regeneração dos mesmos. O estabilizador osmótico mais apropriado varia de espécie para espécie e muitas vezes o estabilizador requerido para a protoplastização não é eficaz na regeneração da parede celular. Além do estabilizador osmótico, a enzima lítica e as condições de incubação são determinantes no processo.

O presente trabalho teve como objetivos analisar a variabilidade genética de isolados de *F. solani* f. sp. *glycines* por RAPD e obter e regenerar protoplastos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de soja, com uma produção que ultrapassou 41 milhões de toneladas na última safra (CONAB, 2002). A soja é um alimento saudável, com elevado conteúdo protéico (cerca de 39%), de baixo custo se comparada a outras fontes de proteína e extremamente versátil. A partir dela são produzidos óleo comestível, farinhas desengorduradas e integrais, proteína texturizada, molho, farelo e outros derivados.

A produtividade da soja é afetada por inúmeras doenças, dentre as quais destaca-se a síndrome da morte súbita, que ocasiona podridão da raiz, clorose e necrose foliar, descoloração vascular na raiz e no caule, queda prematura das folhas e das vagens (ROY *et al.*, 1989; HERSHAMAN *et al.*, 1990). O aparecimento dos sintomas foliares e o aumento da severidade da doença estão associados às baixas temperaturas antes ou durante a floração e formação de vagens.

A síndrome da morte súbita, causada pelo fungo *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *glycines* Roy, reduz consideravelmente a produção de soja. Este patógeno foi primeiramente isolado nos Estados Unidos, onde ocorre nos estados do Alabama, Arkansas, Illinois, Indiana, Kentucky, Mississippi, Missouri e Tennessee (ROY *et al.*, 1989; RUPE, 1989, HERSHAMAN, 1990). Foi observado em 1992 no Brasil, tendo sido provavelmente trazido em sementes importadas dos Estados Unidos (NAKAJIMA *et al.*, 1996).

As perdas em decorrência da infecção da lavoura por este fungo podem chegar a 100%, dependendo das condições ambientais e da concentração do

patógeno na lavoura. *Fusarium solani* f. sp. *glycines* se instala no córtex da raiz, embora os sintomas foliares sejam mais aparentes (STEPHENS *et al.*, 1993). Os sintomas desta doença são mais severos quando o fungo está associado ao nematóide do cisto em soja, *Heterodera glycines* (McLEAN e LAWRENCE, 1995). Cultivares de soja têm apresentado diferenças de susceptibilidade, mas nenhuma se mostrou completamente imune (NJITI *et al.*, 1996).

Segundo NJITI *et al.* (1997), o atraso no plantio em campos muito úmidos, permitindo assim que eles sequem, retardaria a primeira infecção e poderia diminuir a severidade da síndrome da morte súbita. Esta doença é mais severa em campos altamente férteis e em especial em cultivares produtivos (RUPE *et al.*, 1993). Provavelmente isso ocorre devido à competição entre os mecanismos reprodutivos da planta e seus mecanismos de defesa, já que ambos os processos envolvem grande dispêndio de energia (NJITI *et al.*, 1997). Condições de seca e calor inibem o desenvolvimento da doença, já que a umidade favorece a dispersão dos esporos no solo, permitindo então que estes alcancem outras plantas (MELGAR *et al.*, 1994).

Em laboratório, o fungo apresenta crescimento relativamente lento, produzindo grande quantidade de macroconídios. Os macroconídios têm em média 50,5 µm de comprimento por 4,6 µm de diâmetro; apresentam de 3 a 5 septos e são produzidos em conidióforos curtos e simples, em monofiálides (ROY, 1997). Os sintomas foliares da doença parecem surgir em decorrência do transporte de fitotoxinas da raiz para a folhagem. Uma proteína de 17.000 daltons, provavelmente uma fitotoxina, foi isolada do filtrado e denominada fusarina (JIN *et al.*, 1996). A estocagem prolongada de *F. solani* f. sp. *glycines* em meio BDA, reduz a esporulação e a pigmentação azulada típica da superfície, com aumento do micélio aéreo (ROY, 1997).

Tendo em vista as vantagens econômicas conferidas pela obtenção de variedades de soja resistentes a *F. solani* f. sp. *glycines*, é de fundamental importância o isolamento e a caracterização de genes de avirulência deste fungo, para que se possam elaborar programas de melhoramento para esta cultura. A teoria gene-a-gene (FLOR, 1971), postula que para cada gene de resistência do hospedeiro há um gene de avirulência correspondente no patógeno. VAN der PLANK (1978) propôs que a durabilidade da resistência herdada é uma função do prejuízo imposto ao patógeno. Conclui-se que quanto

mais importante para a adaptabilidade do patógeno for o gene de avirulência que a planta reconhece, mais dificilmente a resistência será quebrada.

O controle da doença pode ser alcançado pelo tratamento químico, entretanto, os métodos químicos utilizados na agricultura no combate a este patógeno, além de dispendiosos e pouco eficientes, acarretam sérios danos ao meio ambiente. Resistência da planta hospedeira é a medida mais efetiva para controle da síndrome da morte súbita, no entanto a resistência a esta doença é incompleta, de natureza poligênica e sensível às condições ambientais (HNETKOVSKY *et al.*, 1996). Embora o patógeno seja restrito à raiz, a resistência geralmente é classificada com base nos sintomas foliares, não sendo claro se a resistência observada no campo representa uma forma de resistência efetiva ou uma forma de tolerância (NIJITI *et al.*, 1997).

A taxonomia do gênero *Fusarium* é complexa e tem sido constantemente revisada. Inúmeros sistemas diferentes de classificação foram propostos nos últimos 60 anos, o que reflete a gama de variação morfológica exibida por muitas espécies de *Fusarium* em resposta a condições de crescimento (TURNER *et al.*, 1998).

A caracterização genética do patógeno é de fundamental importância para o seu controle. A análise de variabilidade genética é uma estratégia importante na caracterização do fungo, facilitando trabalhos posteriores visando a obtenção de linhagens de soja resistentes à síndrome da morte súbita. Várias técnicas moleculares vêm sendo utilizadas no estudo genético de fungos, como a análise de isoenzimas, a técnica de RFLP, o sequenciamento e as análises baseadas em PCR. GUADET *et al.* (1989) construíram árvores filogenéticas parciais de espécies do gênero *Fusarium* e de outros gêneros relacionados comparando as seqüências nucleotídicas da extremidade 5' do rRNA 28S. Comparações indiretas de seqüências podem ser feitas utilizando RFLPs (BATEMAN, 1996).

A técnica de reação da polimerase em cadeia, PCR, é uma ferramenta útil em análises filogenéticas e sistemáticas. O RFLP-PCR consiste na amplificação dos espaçadores ITS e IGS e dos rDNAs 17S e 25S, com posterior clivagem dos fragmentos amplificados com enzimas de restrição gerando padrões de RFLP. As regiões amplificadas podem ainda ser

sequenciadas, o que aumenta a sensibilidade das análises de relações filogenéticas entre fungos (EGGER, 1995).

Outra técnica baseada em PCR bastante difundida em estudos de variabilidade genética é o RAPD (WILLIAMS *et al.*, 1990, WELSH & McCLELLAND, 1990). Consiste na amplificação ao acaso de fragmentos de DNA genômico por oligonucleotídeos com dez nucleotídeos e seqüências aleatórias, que se anelam em diversas regiões do genoma, contanto que haja homologia. O RAPD utiliza uma temperatura de anelamento menor que aquela aplicada no PCR, além de uma composição de C+G dos oligonucleotídeos igual ou superior a 50% (WILLIAMS *et al.*, 1990). O RAPD-PCR é uma técnica simples, relativamente barata, que evidencia variabilidade intraespecífica.

O polimorfismo de tamanho dos fragmentos amplificados se deve a vários fatores como a substituição de nucleotídeos, que gera ou elimina um sítio de anelamento do oligonucleotídeo, deleção, inserção ou inversão no sítio de pareamento (CAETANO-ANOLLÉS e BASSAM, 1993, CZAIJKA e BATT, 1994). O RAPD apresenta uma série de vantagens em relação a outras técnicas moleculares, uma vez que nenhum dado sobre a seqüência do DNA é requerido e uma quantidade mínima de DNA é necessária para a amplificação (BALOGA e HARLANDER, 1991, FARBER e ADDISON, 1994, BOERLIN *et al.*, 1995). Além do mais, o RAPD é sensível na detecção de polimorfismos a nível de DNA, o que o torna uma técnica poderosa na identificação de genótipos e obtenção de “fingerprints” (MICHELI *et al.*, 1993, FERREIRA e GATTAPAGLIA, 1995).

Apesar das inúmeras vantagens conferidas pela utilização de marcadores RAPD, esta técnica possui algumas limitações. Os fragmentos amplificados por RAPD não apresentam informação genética se analisados isoladamente. Embora muitas bandas sejam de fácil interpretação, outras são ambíguas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995). Além disso, o RAPD não distingue heterozigotos de homozigotos, o que torna seu poder estatístico menor que o de sistemas codominantes na estimativa de variabilidade genética (FRITSCH e RIESEBERG, 1996). Uma vez que essa técnica utiliza pequena quantidade de DNA e vários ciclos de amplificação, os fragmentos que são amplificados durante uma reação de RAPD provavelmente representam os produtos de maior sucesso dentre vários competidores passíveis de

amplificação, ou seja, o RAPD está sujeito a efeitos epistáticos que geralmente não estão associados a outros marcadores (HEUN e HELENTJARIS, 1993). Assim, um fragmento de DNA presente em dois indivíduos pode ser amplificado em um e não em outro devido à competição com outros sítios. Este fato pode levar a conclusões erradas sobre este *locus* nos indivíduos em estudo.

As técnicas de RFLP e RAPD têm sido utilizadas com sucesso na caracterização de diversas *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* (WOO *et al.*, 1996). Embora a importância das ferramentas moleculares baseadas em PCR na detecção de patógenos seja amplamente reconhecida, é necessário cuidado neste uso (TURNER *et al.*, 1998). O rDNA da região ITS nem sempre contém polimorfismo suficiente que permita a diferenciação intraespecífica. A técnica de RAPD já é capaz de revelar muito mais polimorfismos intraespecíficos que as seqüências ITS (TURNER *et al.*, 1998). A técnica de RAPD-PCR mostrou-se apropriada para a diferenciação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* de outras *formae speciales* bem como outras espécies de *Fusarium* (KELLY *et al.*, 1994). ACHENBACH *et al.* (1996) diferenciaram isolados de *Fusarium solani* causadores da síndrome da morte súbita de isolados não-patogênicos utilizando a técnica de RAPD, comprovando a eficiência dessa técnica na identificação de isolados patogênicos e também na determinação da variabilidade genética destes isolados.

Além da análise de variabilidade genética por marcadores, outros estudos moleculares se fazem necessários na caracterização genética de microrganismos. A obtenção dos protoplastos é uma das ferramentas utilizadas para a manipulação genética em fungos, permitindo experimentos de fusão e de transformação (FINCHAM, 1989) e também a determinação do número e tamanho de cromossomos, bem como a localização de genes nestes cromossomos. Trabalhando com *Beauveria*, VIAUD *et al.* (1998) mostraram que a fusão de protoplastos é uma importante ferramenta no aumento da capacidade de biocontrole deste fungo. O método de transformação de fungos mais difundido é a transformação de protoplastos mediada por PEG (polietileno glicol) (REDMAN e RODRIGUEZ, 1994).

Os fungos apresentam parede celular constituída principalmente por polímeros de carboidratos como a glucana (polímero complexo e ramificado de

unidades de glicose), manana (complexo polimérico de manose, encontrada freqüentemente em leveduras) e quitina (polímero de N-acetilglicosamina), podendo ser encontrados também lipídeos e proteínas (BERRY, 1982). A quantidade e presença destes constituintes e, conseqüentemente, sua importância para a estabilidade da parede celular e liberação de protoplastos variam de acordo com cada microrganismo (ANUNCIAÇÃO *et al.*, 1990).

O interesse em se obter protoplastos surgiu inicialmente em estudos com leveduras e fungos filamentosos, em razão da necessidade de desintegrar a parede celular no preparo de extratos celulares. Tratamentos mais drásticos para romper a parede também danificavam as organelas celulares. A obtenção de protoplastos se tornou, assim, uma etapa de grande importância para os estudos metabólicos e das organelas de leveduras, em especial de *Saccharomyces cerevisiae*. Posteriormente, os protoplastos foram úteis em estudos da síntese da parede, uma vez que eram capazes de regenerar, e este processo podia ser acompanhado (PEBERDY e GIBSON, 1971, PEDERDY 1979).

Para se obter uma boa preparação de protoplastos é necessário estabelecer as condições otimizadas de obtenção e regeneração para cada espécie (CHADEGANI, 1989; KUMARI & PANDA, 1992). Fatores como a idade e a quantidade de micélio, o estabilizador osmótico, a temperatura, o pH, o tempo de digestão e a concentração das enzimas que degradam a parede são citados como determinantes no processo (CHADEGANI, 1989).

Várias enzimas vêm sendo utilizadas na protoplastização de fungos filamentosos. A enzima Novozym 234 é a mais difundida, embora também sejam utilizadas outras enzimas como Glucanex (SANTOS *et al.*, 2001) e Funcelase (LAKSHMI & CHANDRA, 1993) com resultados satisfatórios. Em geral, altos níveis de atividade β -D-glucanase e quitinase estão associados às enzimas mais eficientes no isolamento de protoplastos, como Novozym 234 e celulase CP (HAMLYN *et al.*, 1981).

SANDHU *et al.* (1989) testaram enzimas líticas isoladas de *Aspergillus nidulans* e *Trichoderma harzianum* na obtenção de protoplastos de *Trichoderma reesei*. Protoplastos só foram obtidos quando as enzimas líticas isoladas de *Trichoderma harzianum* foram combinadas com quitinase comercial. Estes mesmos autores testaram esporos e hifa vegetativa como

substratos na obtenção de protoplastos e obtiveram maior eficiência de protoplastização quando hifas vegetativas foram utilizadas.

Para a obtenção de protoplastos do fungo *Ustilago maydis*, causador de mancha no milho, KINSCHERF *et al* (1988) utilizaram solução de sorbitol 1M com 5 mg/mL de Novozym 234. A protoplastização foi praticamente completa após 1 a 2 horas de incubação à temperatura ambiente sob agitação branda.

ANUNCIAÇÃO (1990) determinou as seguintes condições para a obtenção e regeneração de protoplastos do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*: micélio em fase logarítmica de crescimento, enzima Novozym 234 e manitol 0,5M como estabilizador osmótico; incubação de três a quatro horas sob agitação de 60 rpm a 25°C, na presença de 4 mg/mL de albumina séricabovina (BSA). A regeneração dos protoplastos, por espalhamento, foi realizada em meio sólido estabilizado com manitol.

BOEHM *et al.* (1994) protoplastizaram 90% dos esporos germinados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* utilizando solução de MgSO₄ 1,2M e citrato trissódico 50 mM, pH 5,8, com Novozyme 234 (5mg/mL) após 4 a 6 horas de tratamento.

Protoplastos de *Fusarium* seção *Liseola* foram obtidos a partir de esporos germinados por 10-16 horas a 24°C em meio BDA líquido a 150 rpm, coletados e lavados em sorbitol 1,2M ou MgSO₄ 1,2 M por três vezes e então ressuspensos em 5 mL de tampão OM (MgSO₄ 1,2M e fosfato de sódio 10 mM, pH 5,8) contendo 10 mg/mL de Novozym 234 e 50 µL de β-mercaptoetanol e incubados de duas a 12 horas a 32°C sob agitação de 60-70 rpm (XU *et al.*, 1995).

DIAS *et al.* (1996) obtiveram cerca de 3×10^7 protoplastos do fungo ectomicorrízico *Suillus granulatus*, utilizando 1 mg da enzima Novozym 234 e 0,6 mL do estabilizador osmótico MgSO₄ 0,7M para 60 mg de micélio, em pH 5,5 e temperatura de 25°C. A regeneração deste fungo foi realizada utilizando MgSO₄ 0,6M como estabilizador, em pH 5,5 a 25°C. Trabalhando com *Penicillium expansum* e *P. griseoroseum*, DIAS *et al.* (1997) estabeleceram as seguintes condições ótimas para obtenção de protoplastos destes fungos: estabilizador osmótico KCl 0,5 M, pH 5,5; Novozym 234 na concentração final de 1,7 mg/mL para *P. expansum* e 3,3 ou 6,7 mg/mL para *P. griseoroseum*, tempo de digestão de 1 a 2 horas e temperatura de 25°C, com agitação de 130

rpm para 1 hora e 100 rpm para períodos mais prolongados. Para regeneração, sacarose 0,56M foi definida como estabilizador osmótico para o meio, a uma temperatura de 25°C.

A contagem no número de conidiósporos incubados e do número de protoplastos obtidos de *Phanerochaete chrysosporium*, em câmara de Neubauer, revelou que cerca de 40% dos conidiósporos geraram protoplastos, entretanto somente de 2 a 13% destes eram viáveis (ZAPANTA *et al.*, 1998).

Trabalhando com o fungo fitopatogênico *Crinipellis perniciosus*, SANTOS (2001) utilizou 15 mg.mL⁻¹ de Glucanex e 10 mg.mL⁻¹ de BSA em KCl 0,8M como estabilizador osmótico para obtenção de 10⁷ protoplastos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi executado no Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

3.1 - Microrganismo

Foram utilizados 4 isolados de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* que foram cedidos pelo Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (Tabela 1) e 15 isolados (Tabela 3) obtidos de fragmentos de raiz de plantas. O isolado Cup 4 foi utilizado para a obtenção de protoplastos.

Tabela 1 – Isolados de *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, sua origem e variedade da soja de onde foram isolados.

Isolado	Local	Variedade da soja
Cup 1	CNP Soja	ND
Cup 2	MG	Conquista
Cup 3	CEPET	UFV-19
Cup 4	Tupaciguara	UFVS-2003

3.2 - Isolamento do fungo a partir da raiz de soja

Para estudos de variabilidade foram utilizados isolados de diferentes regiões, obtidos de amostras de raiz de plantas de soja infectadas, cedidas pelo Departamento de Fitotecnia da UFV (Tabela 2).

Fragmentos de raiz, de aproximadamente 1 cm de comprimento, foram lavados em água corrente e embebidos em etanol 70% por um minuto. Posteriormente, foram mantidos em hipoclorito de sódio 40% durante 10 minutos. Por fim, lavados em água destilada estéril, secos em papel toalha autoclavada e incubados em meio BDA durante dois dias. Após este tempo, os conídios foram analisados sob microscópio óptico para confirmar se realmente se tratavam de *Fusarium*. Foi então realizada a purificação monospórica dos isolados. As amostras foram plaqueadas em meio BDA e incubadas a 28°C. Semanalmente estas amostras eram repicadas para novas placas afim de se manter a viabilidade dos esporos. Após aproximadamente dez dias de crescimento era observada a formação de halo azul característico dos isolados de *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. Os isolados que não apresentavam o halo azul foram descartados, pois certamente se tratavam de outras espécies de *Fusarium*.

Tabela 2 – Relação das amostras de raízes de soja contaminadas, coletadas em diferentes localidades.

Amostra / variedade	Número de Amostras	Data de coleta	Local
Cristalina-RC	9	Março/2002	São Gotardo - MG
UFV87-279	2	Março/2002	São Gotardo – MG
UFV10-R2	7	Fevereiro/2002	Coromandel - MG
UFVS 2003	1	Março/1998	Bolívia
UFVS 2003	5	Março/2002	Goiás
ND	10	ND	Conquista-MG
IAC-15	3	ND	Conquista-MG
UFV-2002	10	Março/2001	Tupaciguara – MG
UFVS-2003	10	Março/2001	Tupaciguara – MG

ND: Não disponível

3.3 - Manutenção dos estoques das culturas e preparo do inóculo

Para a manutenção dos estoques das culturas, os fungos foram crescidos em placas de Petri contendo meio BDA, por 7 dias a 28 °C. A seguir, foram cortados discos de 8 mm de diâmetro do meio contendo micélio da cultura, que foram mantidos em água destilada estéril em frascos tipo penicilina por até seis meses, sob refrigeração.

Uma suspensão de esporos em Tween 80 0,05% foi plaqueada por espalhamento em meio BDA coberto com papel celofane e incubada a 28°C por cerca de 2 dias. Foram inoculados 10^6 conídios/mL de Tween 80 0,05% em cada placa. Após o tempo apropriado de crescimento, o micélio foi raspado com espátula estéril, pesado e utilizado para extração de DNA total.

Para obtenção de protoplastos, cerca de 10^6 conídios do isolado Cup4 foram inoculados em meio BDA coberto com papel celofane e incubados por 12 horas a 28°C.

3.4 - Meio de Cultivo e Soluções:

Meio BDA (batata dextrose ágar) enriquecido: Este meio é composto por 39,0 gramas de BDA em pó Oxoid, 2,0 gramas de peptona, 1,5 gramas de caseína hidrolizada, 2,0 gramas de extrato de levedura, 1,0 mL de solução de vitaminas e 1000 mL de água destilada. Após o pH ser aferido para 6,8, o meio foi imediatamente autoclavado a 120°C por 20 minutos.

Solução de vitaminas: Foram utilizados 0,20 mg de biotina, 10,0 mg de ácido P-aminobenzóico, 50,0 mg de piridoxina, 50,0 mg de tiamina, 100,0 mg de ácido nicotínico e 100,0 mg de riboflavina. A solução foi completada com água destilada estéril para um volume final de 100 mL. A solução foi tinalizada e protegida da luz.

EDTA 0,5 M pH8,0: Foram dissolvidos 186,1 g de etileno-diamino-tetracetato dissódico bihidratado em água milli-Q, sob agitação contínua com agitador magnético. O pH foi ajustado com 20 g de NaOH e o volume completado para 1000 mL.

Estabilizadores osmóticos: Todos os experimentos de obtenção de protoplastos foram conduzidos na presença de um estabilizador osmótico. A preparação enzimática e qualquer outra substância utilizada na mistura de

digestão foi dissolvida em solução estabilizadora autoclavada a 120°C durante 20 minutos. Testou-se diferentes soluções estabilizadoras, todas com pH 5,8: CaCl₂ 1,2 M KCl 0,8 M, MgSO₄ 0,8 M, MgSO₄ 1,2 M, NaCl 0,8 M, manitol 1,0 M, sacarose 0,8 M, e sorbitol 0,5 M.

Meios de regeneração: Os protoplastos foram regenerados em meio BDA sólido acrescido do estabilizador osmótico mais apropriado. Foram testados os estabilizadores KCl 0,8 M, Manitol 0,6 M, Manitol 1,0 M, Sacarose 0,8 M, Sacarose 1,0 M, Sorbitol 0,5 M e Sorbitol 1,0 M.

Tampão de extração de DNA: Uma solução aquosa foi preparada utilizando-se Tris-HCl 0,20 M pH 8,0, NaCl 0,25 M e Na₂EDTA 50 mM. O pH foi ajustado para 8,2.

Tampão TE (Tris HCl – EDTA): Foi preparada uma solução de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0.

Tampão TEB (5X): Foram dissolvidos 54g de Trizma base (Sigma 7-9®), 27,5g de ácido bórico (Sigma B 7901) e 20 mL de solução estoque EDTA 0,5 M pH 8,0 em 700 mL de água milli-Q, com o auxílio de agitador magnético, até diluição total. Posteriormente o volume foi completado para 1000 mL e a solução foi autoclavada.

Tampão de Amostra: 0,25 g de Azul de bromofenol e 60g de glicerol foram diluídos em 100 mL de tampão TEB 1X.

3.5 - Extração de DNA total

O DNA total foi extraído conforme SPEACHT *et al.* (1982), com algumas modificações. Uma suspensão de esporos em 0,15% de Tween 80 foi espalhada sobre uma placa com meio BDA coberta com papel celofane. Esta placa foi incubada por um período de 48 horas a 28°C. Posteriormente, o micélio foi raspado, congelado com nitrogênio líquido e macerado até a obtenção de um pó fino. Em seguida o pó obtido foi transferido para um tubo Eppendorf ao qual foram adicionados 400 µL de tampão de extração. As amostras foram incubadas a 70°C durante 30 minutos. Passado este tempo, foram adicionados 350 µL de acetato de potássio 5 M e após a mistura, as amostras foram incubadas em gelo por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado, transferido para um novo tubo Eppendorf e tratado com RNase A (R5503 – tipo

I-AS, Sigma). Em seguida foram adicionados 500 µL de fenol-clorofórmio (1:1) e os tubos foram incubados durante 5 minutos no gelo. Posteriormente, as amostras foram novamente centrifugadas a 12000 g por 7 minutos. A fase superior foi coletada, transferida para um novo tubo Eppendorf e um volume de isopropanol foi adicionado para precipitação por no mínimo 2 horas a -20°C. Após este período, centrifugou-se a 12000 g por 30 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70% e deixado secar por alguns minutos. O precipitado foi por fim ressuspenso em TE (Tris-EDTA) e avaliado por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.6 - Amplificação do DNA total por RAPD

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25 µL, contendo 20 ng de DNA total, 40 pmoles de oligonucleotídeo iniciador da Operon Technology, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 100 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) e uma unidade de Taq polimerase.

As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) programado para 40 ciclos. Cada ciclo consistiu de três passos: desnaturação (15 segundos a 94°C), anelamento (30 segundos a 35°C) e extensão (1 minuto a 72°C). Após os 40 ciclos foi feita uma extensão final de sete minutos a 72°C, com a redução da temperatura para 15°C até a retirada das amostras.

Após a amplificação, foram adicionados 5 µL de tampão de amostra a cada reação e estas foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo em tampão TEB 1X. Finalizadas as corridas, os géis foram visualizados sobre luz UV e as imagens digitalizadas no sistema de fotodocumentação "Eagle eyeTMII" da Stratagene.

3.7 - Análise dos dados

Os resultados de RAPD foram analisados atribuindo-se 1 à presença da banda e 0 à ausência nas diferentes amostras. A distância foi calculada aos pares, utilizando-se o coeficiente de Nei e Li (1979). Os isolados foram agrupados pelo método UPGMA.

3.8 - Obtenção de protoplastos

O micélio do isolado Cup 4 (300 mg) crescido em meio BDA sobre papel celofane foi incubado em cada um dos diferentes estabilizadores osmóticos, acrescidos de preparação enzimática, misturados em Erlenmeyer de 50 mL, e incubados a 25°C, sob agitação de 80 rpm por períodos de até 4 horas. De hora em hora foi retirada uma alíquota da mistura para contagem do número de protoplastos em câmara de Neubauer.

Após o período de digestão, a mistura foi filtrada em seringa contendo gase e o filtrado centrifugado a 2000 g, para sedimentação dos protoplastos. Após centrifugação os protoplastos foram diluídos em solução estabilizadora e novamente contados.

3.9 - Regeneração dos protoplastos

Foi testado o efeito de diferentes estabilizadores osmóticos e concentrações dos mesmos na regeneração dos protoplastos. Para cada tratamento foi realizado plaqueamento em meio não estabilizado como controle. Diferentes concentrações de protoplastos foram plaqueadas em meio contendo cada um dos estabilizadores osmóticos pela técnica de espalhamento.

A taxa de regeneração foi calculada com base na seguinte fórmula:

$$\% \text{ de regeneração} = \frac{X - Y}{Z} \times 100$$

Onde X corresponde ao número de colônias crescidas em BDA + estabilizador, Y corresponde ao número de colônias crescidas em BDA e Z é o número de protoplastos/mL que foram plaqueados.

3.10 – Coloração de núcleos

Para a visualização de núcleos dos esporos de *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, foi utilizada a coloração com Sybr Green I, um corante fluorescente que pode ser visualizado sob filtro apropriado, no comprimento de onda de 520 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Isolamento de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* a partir de raízes de soja

Fragmentos de raízes de plantas de soja (*Glycine max*) com sintomas de síndrome da morte súbita, provenientes de diferentes localidades, foram utilizados no isolamento de *F. solani* f. sp. *glycines* (Tabela 2). Foram identificados 15 isolados de *F. solani* f. sp. *glycines* (Tabela 3).

Os isolados foram identificados pela morfologia dos macroconídios e aspecto da colônia. Ao microscópio óptico os macroconídios do gênero *Fusarium* apresentam-se alongados e curvos, com três a cinco septos quando maduros (Figura 1). As colônias de *F. solani* f. sp. *glycines* formam um halo azul característico quando cultivadas em meio BDA (Figura 2), que as diferenciam das demais espécies de *Fusarium* (ROY *et al.*, 1989). Os isolados que não apresentaram o halo azul após aproximadamente dez dias de crescimento, foram descartados. Isolados com diferentes graus de esporulação, apresentam variável intensidade de pigmentação azul (Figura 2), o que também foi observado por ROY (1997).

Fusarium solani f. sp. *glycines* por vezes possui massas de esporos de pigmentação rosa ou violeta, principalmente quando cultivadas por longos períodos (Figura 2), de acordo com as observações de ROY (1997). Os isolados obtidos apresentaram alta variabilidade morfológica, como pode-se observar na Figura 2. É interessante ressaltar que morfológicamente não houve maior semelhança entre isolados de uma mesma região, o que fica evidente quando se comparam os isolados T3.6 e T3.10, ambos provenientes de Tupaciguara - MG.

Tabela 3 – Isolados de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* obtidos de raízes de cultivares de soja com sintomas da síndrome da morte súbita.

Isolado	Variedades	Data de coleta	Local
T3.1	UFV2003	Março/2001	Tupaciguara
T3.2	UFV2003	Março/2001	Tupaciguara
T3.5	UFV2003	Março/2001	Tupaciguara
T3.6	UFV2003	Março/2001	Tupaciguara
T3.7	UFV2003	Março/2001	Tupaciguara
T3.8	UFV2003	Março/2001	Tupaciguara
Conq1	Conquista	ND	ND
Conq6	Conquista	ND	ND
Conq7	Conquista	ND	ND
Conq8	Conquista	ND	ND
Conq10	Conquista	ND	ND
Conq12	Conquista	ND	ND
G3	UFV2003	Março/2002	Goiás
G5	UFV2003	Março/2002	Goiás
T5	UFV2002	Março/2001	Tupaciguara

ND: Não disponível

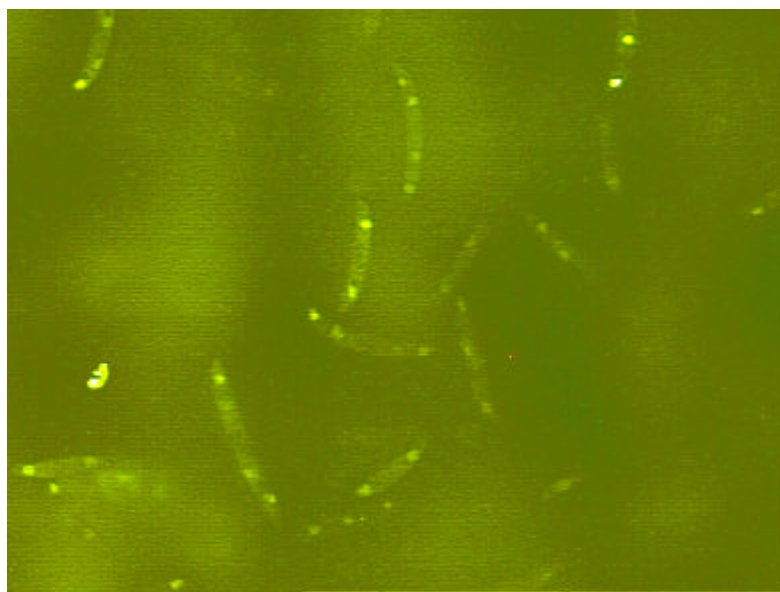


Figura 1 – Aspecto dos macroconídios de *F. solani* f. sp. *glycines* corados com Sybr Green I e observados ao microscópio óptico.

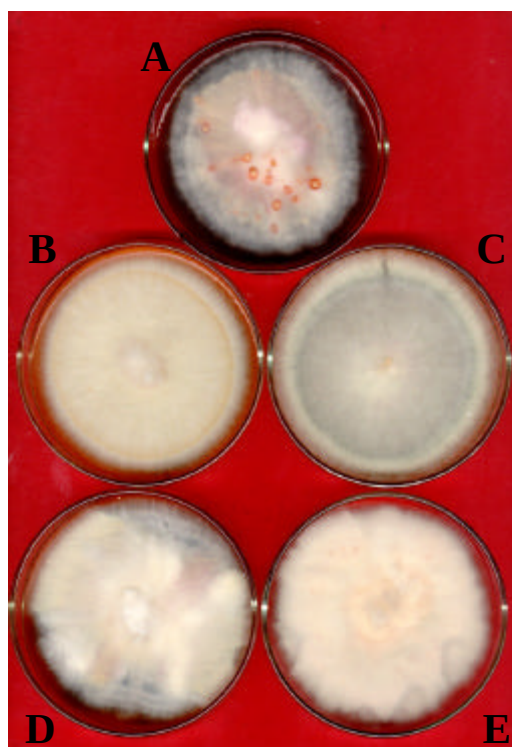


Figura 2 – Aspecto das colônias de diferentes isolados de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* cultivadas em meio BDA. **(A)** G3, **(B)** T3.10, **(C)** T3.6, **(D)** Conq7 e **(E)** Conq12.

4.2 – Análise de variabilidade genética por RAPD

Para a análise da variabilidade genética entre isolados de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* de diferentes localidades, optou-se pela técnica de RAPD em função das inúmeras vantagens desta técnica em relação a outras ferramentas moleculares, como baixo custo, rapidez na obtenção de resultados, e detecção de polimorfismos intraespecíficos.

Amostras de DNA dos 15 isolados obtidos (Tabela 3) e de outros quatro isolados (tabela 1) de diferentes localidades, foram extraídas e as suas concentrações foram estimadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, comparando-se com um padrão de DNA de quantidade conhecida. O DNA mostrou-se pouco degradado e adequado às subseqüentes análises por RAPD (Figura 3). A amplificação das amostras com 15 oligonucleotídeos, gerou 180 fragmentos de DNA, com tamanhos variando de 130 a 2560 pares de bases (pb) e uma média de 12 bandas por oligonucleotídeo (Tabela 4).

Os resultados obtidos com dois dos oligonucleotídeos utilizados estão mostrados nas Figuras 4 e 5. Dos 180 fragmentos de DNA analisados, 175 foram polimórficos, ou seja, estavam presentes ou ausentes em pelo menos um dos isolados considerados, e somente 5 monomórficos. As distâncias genéticas entre os 19 isolados variaram entre 12,2% no par Cup2 / Cup3 e 85% no par Cup4 / Conq1 (Tabela 5). Estes dados foram obtidos com base na presença ou ausência dos fragmentos de DNA amplificados.

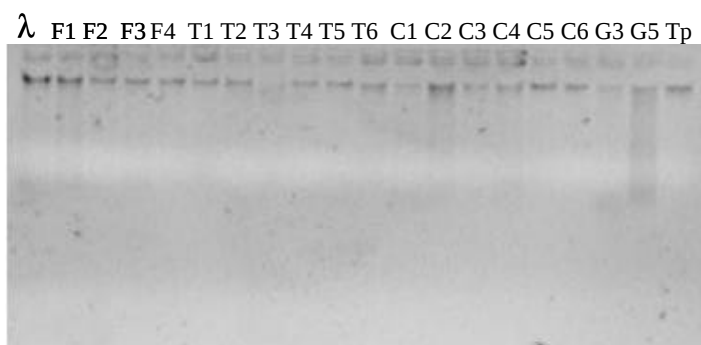


Figura 3 - Amostras de DNA total dos isolados de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%. F1: Cup1, F2: Cup2, F3: Cup3, F4: Cup4, T1: T3.1, T2: T3.2, T3: T3.5, T4: T3.6, T5: T3.7, T6: T3.8, C1: Conq1, C2: Conq6, C3: Conq7, C4: Conq8, C5: Conq10, C6: Conq12, G3: G3, G5: G5, Tp: T5. λ: 25 ng de DNA do fago lambda.

Tabela 4 – Relação dos oligonucleotídeos, número e tamanho dos fragmentos de DNA polimórficos e monomórficos analisados.

Oligonucleotídeos	Seqüência 5' ® 3'	Número de fragmentos polimórficos	Número de fragmentos monomórficos	Tamanho dos fragmentos de DNA (pb)
OPG16	AGCGTCCTCC	20	-	490 – 2010
OPI13	CTGGGGCTGA	13	-	220 – 2560
OPM05	GGGAACGTGT	11	-	230 – 2400
OPM17	TCAGTCCGGG	11	01	520 – 2410
OPM18	CACCATCCGT	08	-	130 – 950
OPN06	GAGACGCACA	09	01	280 – 2010
OPN09	TGCCGGCTTG	12	-	300 – 1000
OPN18	GGTGAGGTCA	12	01	190 – 1200
OPN19	GTCCGTACTG	09	-	220 – 2350
OPO02	ACGTAGCGTC	12	-	260 – 2030
OPT20	GACCAATGCC	03	01	240 – 580
OPU02	CTGAGGTCTC	10	-	250 – 2000
OPU11	AGACCCAGAG	12	01	300 – 980
OPU14	TGGGTCCCTC	13	-	270 – 2920
OPU16	CTGCGCTGGA	20	-	280 – 2020
Total		175	05	130 – 2560

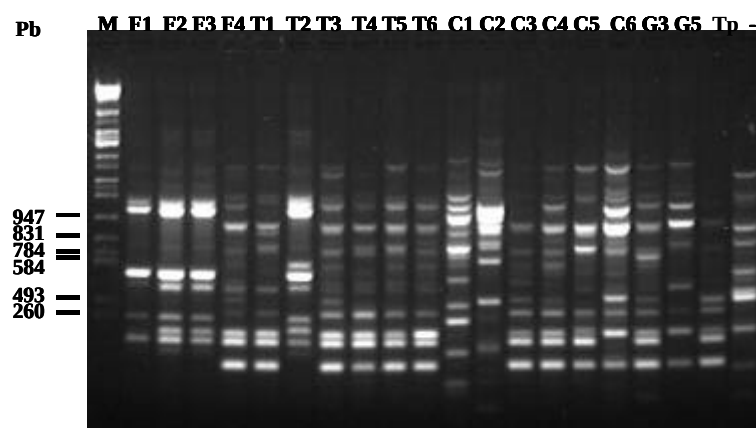


Figura 4 - Padrão de amplificação por RAPD do DNA total dos isolados de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* em gel de agarose 1,5%. As bandas foram amplificadas utilizando-se o oligonucleotídeo OPN09. M corresponde ao DNA do bacteriófago lambda clivado com as enzimas de restrição *Eco* RI, *Bam* HI e *Hind* III. F1: Cup1, F2: Cup2, F3: Cup3, F4: Cup4, T1: T3.1, T2: T3.2, T3: T3.5, T4: T3.6, T5: T3.7, T6: T3.8, C1: Conq1, C2: Conq6, C3: Conq7, C4: Conq8, C5: Conq10, C6: Conq12, G3: G3, G5: G5, Tp: T5, -: controle negativo.

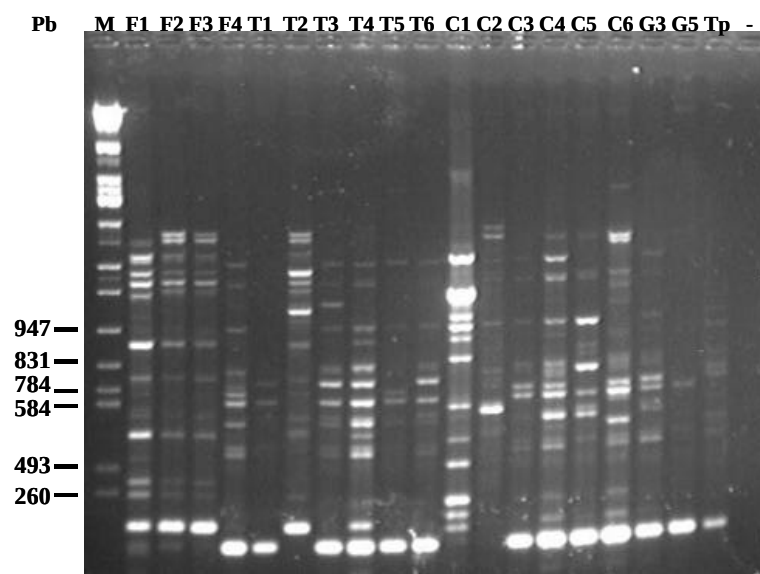


Figura 5 - Padrão de amplificação por RAPD do DNA total dos isolados de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* em gel de agarose 1,5%. As bandas foram amplificadas utilizando-se o oligonucleotídeo OPU16. M corresponde ao DNA do bacteriófago lambda clivado com as enzimas de restrição *Eco* RI, *Bam* HI e *Hind* III. F1: Cup1, F2: Cup2, F3: Cup3, F4: Cup4, T1: T3.1, T2: T3.2, T3: T3.5, T4: T3.6, T5: T3.7, T6: T3.8, C1: Conq1, C2: Conq6, C3: Conq7, C4: Conq8, C5: Conq10, C6: Conq12, G3: G3, G5: G5, Tp: T5, -: controle negativo.

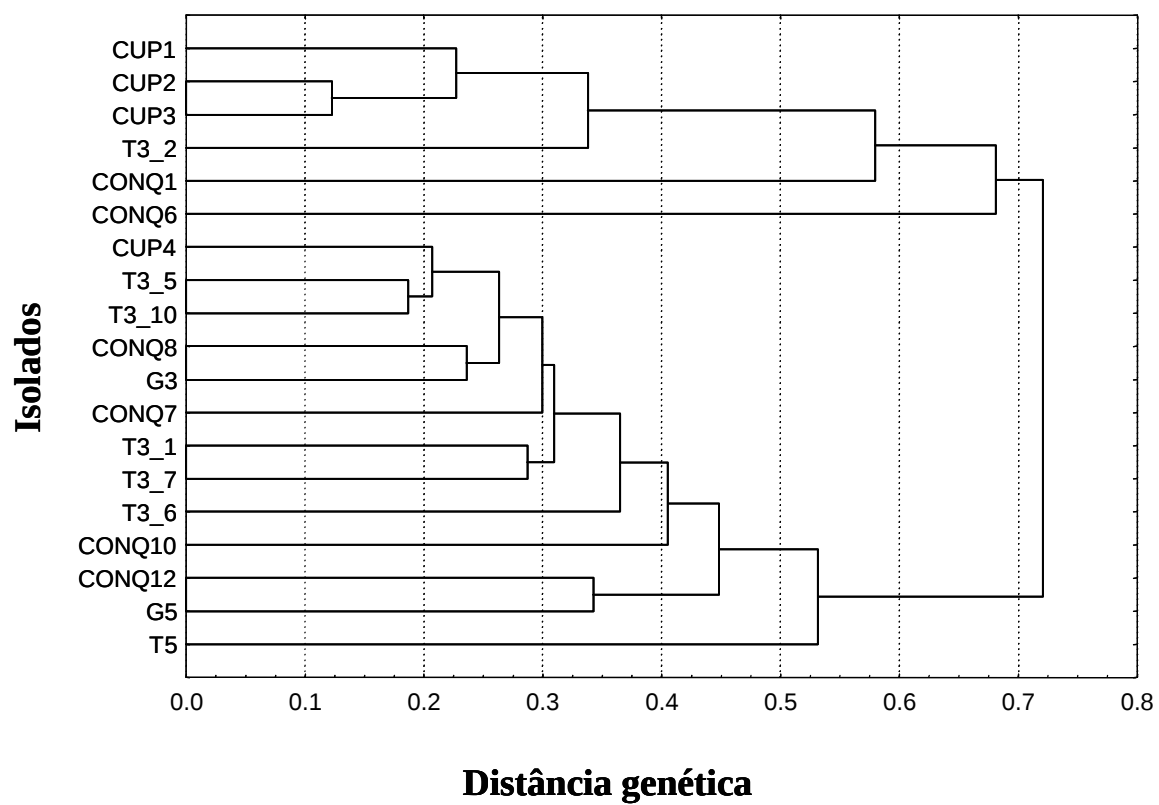


Figura 6- Dendrograma gerado pelo agrupamento dos isolados de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* a partir da matriz de distâncias genéticas.

Como pode-se observar, foi detectada alta variabilidade genética entre os isolados estudados, o que contrasta com os resultados obtidos para *F. solani* f. sp. *phaseoli* por ACHENBACH *et al.* (1996), em que os isolados causadores de síndrome da morte súbita, provenientes de diferentes localidades dos Estados Unidos, analisados por RAPD, demonstraram alto nível de similaridade genética. Entretanto, a maioria dos trabalhos de análise da variabilidade com espécies do gênero *Fusarium*, exibem resultados semelhantes aos aqui expostos. Alta variabilidade também foi observada entre isolados de *F. graminearum* analisados por RAPD (OUELLET e SEIFERT, 1993). A técnica de RAPD também foi útil na detecção de polimorfismos genômicos diretamente relacionados à especialização de *F. oxysporum* f. sp. *pisi* a diferentes hospedeiros (GRAJAL-MARTÍN, 1993).

Pode-se observar a separação de dois grupos com distância genética de aproximadamente 68%, sendo que todos os isolados provenientes de Tupaciguara encontram-se num mesmo grupo, exceto T3.2 (Figura 6). Os isolados Conq1 e Conq6, apresentaram alta divergência genética em relação aos demais isolados analisados, o que já era de se esperar, pois o padrão de amplificação destes isolados para a maioria dos oligonucleotídeos utilizados foi bastante diferente daquele observado nos demais isolados (Figuras 4 e 5). A maioria dos isolados da variedade Conquista, foram agrupados juntamente com os isolados de Tupaciguara e Goiás. O isolado Cup1 apresentou 77% de similaridade com o grupo Cup2/Cup3, apesar de serem provenientes de diferentes locais (Tabela 1).

Dados de RAPD obtidos a partir de 74 isolados de *F. oxysporum*, patógeno de amendoim, analisados com três oligonucleotídeos por KELLY *et al.* (1994), permitiram a separação destes isolados em dois grupos diferentes. Entretanto, não houve relação entre o grupo obtido por RAPD e a reação causada pelos isolados no amendoim. Nesse mesmo trabalho, foi possível distinguir *F. oxysporum* e *F. solani*. As duas espécies apresentaram entre 82 e 89% de dissimilaridade.

O método RAPD revelou polimorfismos entre isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e estabeleceu marcas úteis na caracterização de raças desta *formae speciales* (ASSIGBETSE *et al.*, 1994). Estes autores observaram alta diversidade genética em 46 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

originados de vários países. Os isolados foram classificados em três grupos de patogenicidade em algodão, de acordo com sua localização geográfica.

Valores elevados de diversidade genética também foram encontrados em outras espécies de fungos do gênero *Fusarium* analisadas por RAPD, como *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (KELLY *et al.*, 1994) e *F. molinifirme* (AMOAHA *et al.*, 1995). A análise por RFLP de diferentes espécies do gênero *Fusarium*, demonstrou convergência morfológica entre espécies geneticamente dissimilares, além de grande variabilidade intraespecífica (BATEMAN *et al.*, 1996).

Trabalhando com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, WOO *et al.* (1996) puderam identificar cinco raças fisiológicas compreendendo isolados provenientes de cinco continentes por meio da análise de grupos de compatibilidade vegetativa (VCG). Os 20 isolados analisados apresentaram alta diversidade genética, evidenciada pelas análises moleculares por RAPD e RFLP.

O polimorfismo obtido por marcadores genéticos relaciona-se, na maioria das vezes, com a diversidade ecológica, fisiológica e morfológica observada dentro de uma mesma espécie (EGGER *et al.*, 1991). Um dos problemas encontrados quando se estuda genética de população de fungos fitopatogênicos é definir o que constitui uma população de fungos. Este problema é bastante evidente em fungos anamórficos, em que as espécies não são claramente delineadas (KLISTER, 1997). O gênero *Fusarium*, pertence à subdivisão Deuteromycotina, na qual se desconhece a fase sexual. A estes organismos, o conceito biológico de espécie não pode ser aplicado, e as espécies são definidas com base nas características dos conídios e na morfologia da cultura, bem como em caracteres fisiológicos, como esporulação, tempo de crescimento e virulência (KLISTER, 1997).

Fusarium solani f. sp. *glycines* não apresenta fase sexual conhecida (ROY *et al.*, 1997). AGARWAL e SARBHOY (1975) descreveram *Nectria haematococca* como sendo a forma perfeita de *F. solani*. Entretanto, as colônias por eles estudadas não produziam macroconídios e por isso não correspondiam a *F. solani* f. sp. *glycines* (ROY *et al.*, 1989). As análises moleculares são especialmente úteis na genética de população de fungos, já

que a taxonomia destes organismos é confusa, deixando várias lacunas que prejudicam a classificação das inúmeras espécies identificadas no Reino Fungi.

O padrão de RAPD obtido não reflete por si só a organização genética das populações de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* estudadas. Seriam necessárias análises de grupos de compatibilidade vegetativa, bem como a inoculação dos isolados numa série diferenciadora de soja, para que se pudesse comparar a reação por eles causada ao agrupamento genético obtido. Além disso, não está claro se a diversidade fenotípica observada nesta espécie, bem como em outras espécies deste gênero está diretamente relacionada à sua variabilidade genotípica (KLISTER, 1997).

Para uma caracterização mais apurada destes isolados, seriam necessários novos estudos que permitissem a elucidação dos eventos responsáveis pelo padrão genético observado por RAPD. A utilização de outras técnicas moleculares como RFLP, detecção de transposons por hibridização com sonda específica e análise do rDNA talvez revele padrões genéticos mais claros, que permitam o entendimento da organização genética das populações de *F. solani* f. sp. *glycines*.

Vários fatores podem ser responsáveis pela alta variabilidade genotípica observada entre os isolados estudados, como elementos transponíveis, que permitem troca horizontal de material genético e por isso geram recombinação genética, outros eventos de mutação, recombinação devido a reprodução sexuada e migração. Como todos os isolados estudados foram obtidos de regiões relativamente próximas entre si, talvez não tenha havido isolamento geográfico e temporal suficiente para a diferenciação dos isolados em populações com características genéticas próprias. ACHENBACH *et al.* (1996) foram capazes de distinguir isolados de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* causadores de síndrome da morte súbita de isolados não patogênicos por RAPD. Entretanto estes autores também não obtiveram agrupamento de isolados da mesma origem geográfica, o que demonstra que esta espécie provavelmente não apresenta um padrão de agrupamento genético por localidade.

4.3 – Obtenção de Protoplastos

Muitos fatores influenciam a obtenção de protoplastos em fungos filamentosos. Dentre eles destacam-se a enzima lítica, o estabilizador osmótico e a idade do micélio (PEDERDY *et al.*, 1976, ANUNCIAÇÃO *et al.*, 1990).

Várias enzimas líticas vêm sendo utilizadas na digestão da parede celular de fungos para obtenção de protoplastos, numa série de combinações e concentrações. As principais enzimas disponíveis comercialmente são Novozym 234, Glucanex, Lysing enzymes e Celulase (CHENG *et al.*, 2000, KIM *et al.*, 2000). No presente trabalho foi testado o efeito da enzima Glucanex em diferentes concentrações na liberação de protoplastos de *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. Como mostra a Tabela 6, não houve grande diferença no número de protoplastos liberados quando se utilizou 15 mg.mL⁻¹ e 20 mg.mL⁻¹ da enzima. Desta forma, optou-se pela utilização de Glucanex na concentração de 15 mg.mL⁻¹ de estabilizador.

Tabela 6 – Efeito da concentração enzimática sobre a liberação de protoplastos de *Fusarium solani* f. sp. *glycines*.

Concentração da enzima	Tempo de digestão			
	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas
10 mg.mL ⁻¹ Glucanex	0	3,0 X 10 ⁴	9,0 X 10 ⁴	4,0 X 10 ⁵
15 mg.mL ⁻¹ Glucanex	5,0 X 10 ⁵	2,7 X 10 ⁶	7,7 X 10 ⁶	2,0 X 10⁷
20 mg.mL ⁻¹ Glucanex	4,5 X 10 ⁵	3,6 X 10 ⁶	7,8 X 10 ⁶	1,8 X 10 ⁷

Dentre os estabilizadores testados, a maior eficiência de protoplastização foi alcançada quando utilizou-se MgSO₄ 1,2 M. Este estabilizador mostrou-se apropriado à liberação de protoplastos em outras espécies do gênero *Fusarium*, como *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (BOEHM *et al.*, 1994) e *Fusarium* seção *Liseola* (XU *et al.*, 1995). Não se conhece a causa da grande variação na eficiência de diferentes estabilizadores (WARWAR, 1990), mas de fato diferentes espécies requerem estabilizadores osmóticos distintos. A Tabela 7 mostra o número de protoplastos obtidos nos diferentes estabilizadores. Após 5 horas de digestão, o número de protoplastos obtidos decaiu ou manteve-se estável para todos os estabilizadores. Segundo KIM *et*

al. (2000), tempos prolongados de incubação podem levar à degeneração dos protoplastos formados devido ao contato com a enzima, que pode danificar a membrana plasmática dos protoplastos, devido à presença de proteases no complexo enzimático.

Tabela 7 – Efeito dos diferentes estabilizadores osmóticos sobre a liberação de protoplastos de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* durante 4 horas de digestão enzimática.

Estabilizador	Número de protoplastos / mL			
	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas
CaCl ₂ 1,0 M	2,0 X 10 ⁴	2,3 X 10 ⁴	1,7 X 10 ⁵	2,0 X 10 ⁵
KCl 0,6 M	8,5 X 10 ⁴	3,5 X 10 ⁵	3,5 X 10 ⁵	6,0 X 10 ⁵
KCl 0,8 M	1,2 X 10 ⁵	9,5 X 10 ⁵	1,1 X 10 ⁶	7,6 X 10 ⁶
MgSO ₄ 0,8 M	5,0 X 10 ⁴	1,3 X 10 ⁵	5,4 X 10 ⁶	4,1 X 10 ⁶
MgSO ₄ 1,2 M	1,6 X 10 ⁵	2,7 X 10 ⁶	8,6 X 10 ⁶	2,4 X 10⁷
NaCl 0,8 M	2,8 X 10 ⁵	9,5 X 10 ⁵	1,8 X 10 ⁶	1,7 X 10 ⁶
Manitol 1,0 M	1,0 X 10 ⁵	2,6 X 10 ⁵	1,7 X 10 ⁶	2,4 X 10 ⁶
Sacarose 0,8 M	3,0 X 10 ⁴	7,0 X 10 ⁴	9,8 X 10 ⁵	1,4 X 10 ⁶
Sorbitol 0,5 M	2,3 X 10 ⁵	1,4 X 10 ⁶	8,4 X 10 ⁶	9,5 X 10 ⁶

A idade do micélio foi bastante expressiva, já que não foram obtidos protoplastos quando micélio com mais de doze horas de crescimento foi utilizado. *F. solani* f. sp. *glycines* apresenta esporulação rápida em meio BDA, o que certamente comprometera o processo de protoplastização, já que micélios com mais de doze horas de crescimento apresentam grande número de macroconídios, cuja parede é espessa e de difícil degradação. A liberação de protoplastos a partir do micélio em fase exponencial de crescimento geralmente é maior do que a observada a partir de micélio em outras fases de crescimento (THOMPSON, 1986).

4.2 – Regeneração dos Protoplastos

A taxa de regeneração é bastante variável entre as diferentes espécies de fungos e depende principalmente do estabilizador osmótico e da presença de protoplastos sem núcleo (PEDERDY, 1991). No presente trabalho, a taxa máxima de regeneração obtida foi de 5,5% quando utilizou-se sacarose 1,0M como estabilizador osmótico em meio BDA. A baixa taxa de regeneração obtida provavelmente se deve a protoplastos anucleados, que são incapazes de regenerar a parede celular, ou mesmo a danos causados na membrana plasmática dos protoplastos pelas proteases presentes na preparação enzimática. Na Figura 7 estão detalhadas as taxas de regeneração para os diferentes estabilizadores testados. A Figura 8 apresenta as colônias crescidas em meio BDA acrescido dos diferentes estabilizadores. Como pode-se observar, as colônias apresentam maior crescimento em açúcares como estabilizadores do que em sais, que parecem de alguma forma inibir o desenvolvimento micelial.

SANTOS (2001) obteve 2% de regeneração dos protoplastos de *Crinipellis perniciosa* em meio BDA com sacarose 0,5M, ao passo que CHENG *et al.* (2000) obtiveram 75% de regeneração dos protoplastos de *Pseudozyma flocculosa* utilizando sacarose 0,8M como estabilizador. A taxa de regeneração obtida no presente trabalho foi relativamente baixa. Novos experimentos visando a otimização do protocolo de regeneração de protoplastos aqui proposto talvez permitam a obtenção de maior taxa de regeneração. A utilização de outra enzima lítica que favoreça a obtenção de protoplastos com menor tempo de digestão bem como o teste de outras formas de plaqueamento devem ser testados afim de se obter maior taxa de regeneração dos protoplastos de *Fusarium solani* f. sp. *glycines*.

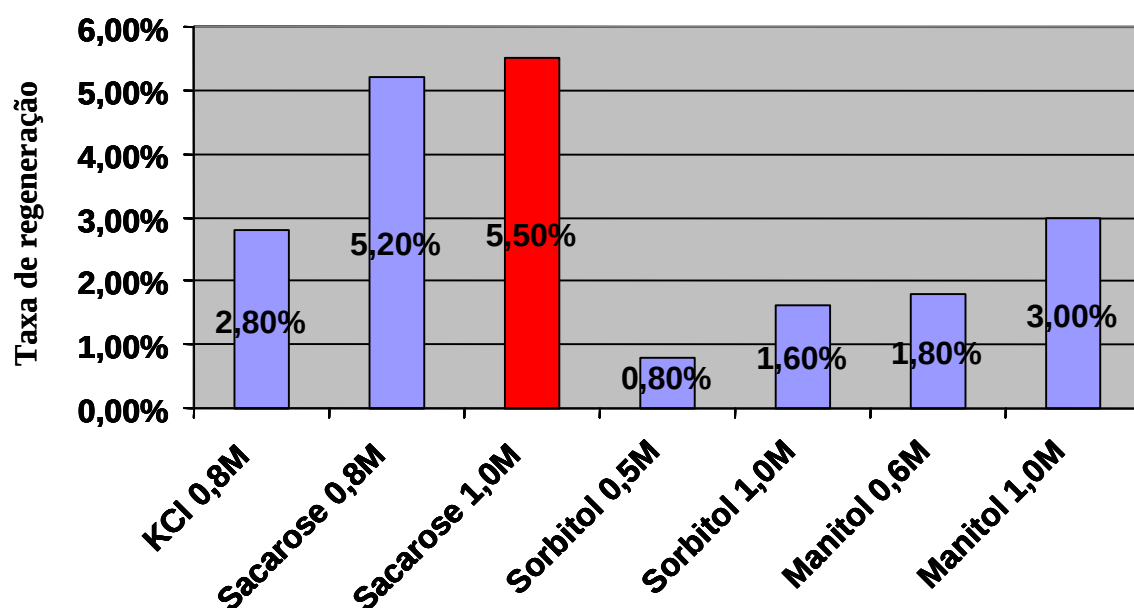


Figura 7 - Porcentagem de regeneração dos protoplastos de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* nos diferentes estabilizadores osmóticos adicionados ao meio BDA sólido.

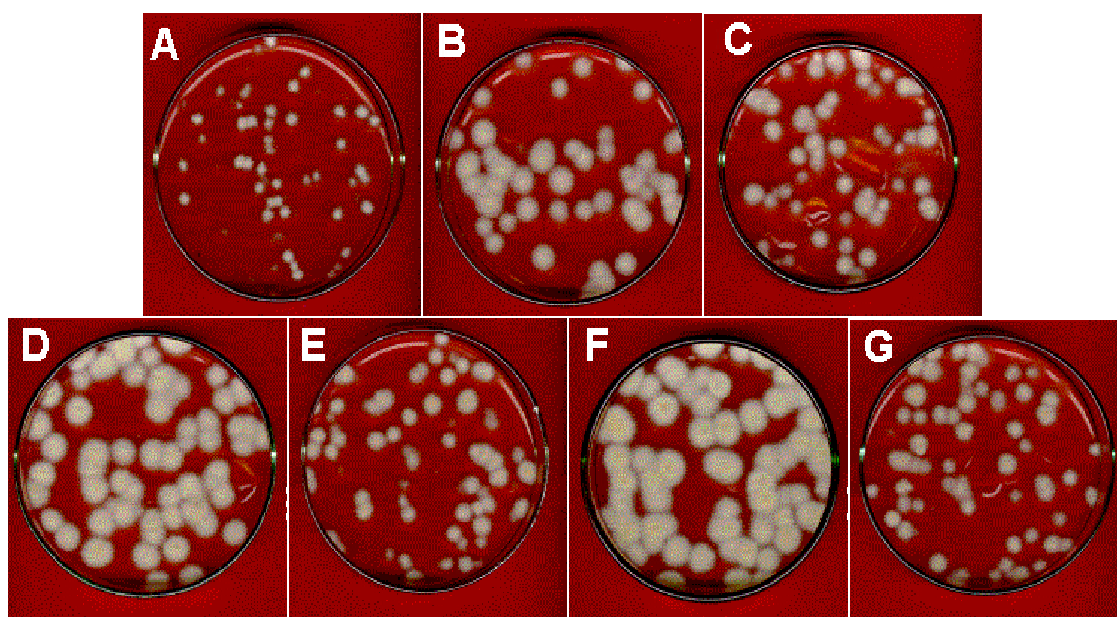


Figura 8 - Regeneração dos protoplastos de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* em meio BDA com diferentes estabilizadores. **(A)** BDA + KCl 0,8 M, **(B)** BDA + Sacarose 0,8 M, **(C)** BDA + Sacarose 1,0 M, **(D)** BDA + Manitol 0,6 M, **(E)** BDA + Manitol 1,0 M, **(F)** BDA + Sorbitol 0,5 M e **(G)** BDA + Sorbitol 1,0 M.

Os fatores responsáveis por taxas variáveis de regeneração em fungos de diferentes gêneros, espécies e linhagens são pouco entendidos. Foi observado que em curtos períodos de exposição à enzima lítica a capacidade de regeneração é maior, já que a membrana tem menores chances de ser danificada (LAKSHMI e CHANDRA, 1993). Mudanças na membrana plasmática gerados por enzimas do complexo lítico poderiam afetar o processo de síntese da parede na superfície do protoplasto (PEDERDY, 1979, 1991).

Os microtúbulos, componentes do citoesqueleto, são rapidamente despolimerizados e desorganizados em protoplastos isolados de fungos filamentosos. A propriedade de repolimerização dos microtúbulos parece ser um fator importante tanto na regeneração da parede quanto no desenvolvimento polarizado da hifa. A fisiologia da regeneração de protoplastos é afetada por fatores ambientais da mesma maneira que o crescimento das células normais (PEDERDY, 1991).

Os resultados obtidos neste trabalho podem ser um ponto de partida para se iniciar estudos a nível de biologia molecular de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* com a utilização de protoplastos.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

No presente trabalho foi realizado o isolamento de *Fusarium solani* f. sp. *glycines* a partir de raízes de soja com sintomas de síndrome da morte súbita. Foram obtidos 15 isolados, que juntamente com outros 4 isolados cedidos pelo Departamento de Fitotecnia, foram cultivados em meio BDA por 72 horas, para posterior extração de DNA total. O DNA total foi amplificado utilizando-se 15 oligonucleotídeos. Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Foram identificados 180 fragmentos de DNA, dos quais 175 eram polimórficos. O número de fragmentos de DNA variou de 4 a 20, com média de 12 fragmentos de DNA por oligonucleotídeo. O tamanho dos fragmentos de DNA variou de 130 a 2560 pares de bases.

Com base nos dados de presença e ausência de fragmentos de DNA amplificados, as distâncias genéticas entre os pares de isolados foram calculadas. A distância entre eles variou de 12 a 85%, o que demonstra a grande diversidade genética entre os isolados analisados.

A análise de variabilidade genética permitiu constatar que não houve diferenciação dos isolados quanto à localização geográfica, o que provavelmente se deve ao fluxo gênico entre as populações estudadas, o que não teria permitido a diferenciação das mesmas.

Foi estabelecido um protocolo para obtenção e regeneração de protoplastos do fungo fitopatogênico *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. Diferentes concentrações da enzima lítica Glucanex, bem como diferentes estabilizadores osmóticos foram testados para evidenciar o melhor sistema para liberação de protoplastos a partir de micélio crescido em papel celofane por 12 horas.

O estabilizador MgSO_4 1,2 M foi o mais adequado para a obtenção de protoplastos, utilizando-se 15 mg.mL^{-1} de Glucanex durante 4 horas de incubação a 28°C e 80 rpm. Foram obtidos $2,4 \times 10^7$ protoplastos/mL de estabilizador. A maior taxa de regeneração dos protoplastos obtida foi de 5,5%, quando sacarose 1,0 M em meio BDA foi utilizada como estabilizador osmótico.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHENBACH, L. A., PATRICK, J. e GRAY, L. Use of RAPD markers as a diagnostic tool for the identification of *Fusarium solani* isolates that cause soybean sudden death syndrome. **Plant Disease**, 80: 1228-1232, 1996.
- AGARWAL, D. K. e SARBHOY, A. K. *Nectria haemococca* - a perfect state of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. on soybean from India. **Plant Disease**, 80: 1228-1232, 1975.
- AMOA, B. K., REZANOOR, H. N., NICHOLSON, P. e MACDONALD, M.V. Variation in the *Fusarium* section *Liseola*: pathogenicity and genetic studies of isolates of *Fusarium moliniiforme* Sheldon from different hosts in Ghana. **Plant Pathology**, 44: 563-572, 1995.
- ANUNCIAÇÃO, C. E., GUIMARÃES, W. V., ARAÚJO, E. F., MUCHOVEJ, R. M. C. e SOUZA, D. R. Production and regeneration of protoplasts of *Pisolithus tinctorius*. **Biotechnology Techniques**, 4: 215-220, 1990.
- ASSIGBETSE, K. B., FERNANDEZ, D., DUBOIS, M. P. e GEIGER, J. P. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA RAPD analysis. **Phytopathology**, 84: 622-626, 1994.
- BALOGA, A. O. e HARLANDER, S. K. Comparison of methods for discrimination between strains of *Listeria monocytogenes* from epidemiological surveys. **Applied and Environmental Microbiology**, 57: 2324-2331, 1991.
- BATEMAN, G. L., KWASNA, H. e WARD, E. Relationships among *Fusarium* spp. estimated by comparing restriction fragment length polymorphisms in polymerase chain reaction-amplified nuclear rDNA. **Canadian Journal of Microbiology**, 42: 1232-1240, 1996.
- BERRY, D. R. **The biology of the yeast**. London, Edward Arnold Publ. Ltd, 1982. 61p.
- BOEHM, E. W. A., PLOETZ, R. C. e KLISTER, H. C. Statistical analysis of electrophoretic karyotype variation among vegetative compatibility groups of

- Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 7: 196-207,1994.
- BOERLIN, P., BANNERMAN, E., ISCHER, F., ROCOURT, J. e BILLE, J. Typing *Listeria monocytogenes*: a comparison of random amplification of polymorphic DNA with 5 other methods. **Research in Microbiology**, 146: 35-49, 1995.
- CAETANO-ANOLLÉS, G. e BASSAM, B. J. DNA amplification fingerprinting using arbitrary oligonucleotide primers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 42: 189-200, 1993.
- CHADEGANI, M., BRINK, J. J., SHEHATA, A. e AHMADJIAN, V. Optimization of protoplast formation, regeneration, and viability in *Microsporium gypseum*. **Mycopathology**, 107: 33-50, 1989.
- CHENG,Y. e BÉLANGER, R. R. Protoplast preparation and regeneration from spores of biocontrol fungus *Pseudozyma flocculosa*. **FEMS Microbiology Letters**, 190:287-291, 2000.
- CONAB. **Estimativa da safra 2001/2002**. Brasília: 15/10/02 (<http://www.conab.gov.br/>)
- CZAJKA, J. e BATT, C. A. Verification of causal relationships between *Listeria monocytogenes* isolates implicated in food-borne outbreaks of listeriosis by randomly amplified polymorphic DNA patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, 32: 1280-1287, 1994.
- DIAS, E. S., ARAÚJO, E. F. e GUIMARÃES, W. V. Production and regeneration of protoplasts from the mycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 12: 625-628, 1996.
- DIAS, E. S., ARAÚJO, E. F., GUIMARÃES, W. V. E , COELHO, J. L. e SILVA, D. O. Production and regeneration of *Penicilium expansum* and *Penicillium griseoroseum* protoplasts. **Revista de Microbiologia**, 28: 116-120, 1997.
- EGGER, K. N., DANIELSON, R. M. e FORTIN, J. A. Taxonomy and population structure of E-strain mycorrhizal fungi inferred from ribosomal and mitochondrial DNA polymorphisms. **Mycological Research**, 95: 866-972, 1991.
- EGGER, K. N. Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. **Canadian Journal of Botany**, 73: 1415-1422, 1995.
- FARBER, J. M. e ADDISON, C. J. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. **Journal of Applied Bacteriology**, 77: 242-250, 1994.
- FERREIRA, M. E. e GRATTAPAGLIA, D. Classes de marcadores moleculares para análise genética. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília, DF: Embrapa, Cenargem, 1995. p. 13-68.

- FINCHAM, J. R. Transformation in fungi. **Microbiological Reviews**, 53: 148-170, 1989.
- FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, 9: 275-296, 1971.
- FRITSCH, P. e RIESEBERG, L. H. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: Smith, t. b., Wayne, R. K. (Eds) **Molecular Genetic Approaches in Conservation**. Oxford Press University, New York. 1996.
- GRAJAL-MARTÍN, M. J., SIMON, C. J. e MUEHLBAUER, F. J. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. **Phytopathology**, 83:612-614, 1993.
- GUADET, J., JULIEN, J., LAFAY, J. F. e EBRYGOO, Y. Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. **Molecular Biology Evolution**, 6: 227-242, 1989.
- HAMLYN, P. F., BRADSHAW, R. E., MELLON, F. M., SANTIAGO, C. M., WILSON, J. M. e PEDERDY, J. F. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. **Enzyme Microbial Technology**, 3: 321-325, 1981.
- HERSHAMAN, D. E., HENDRIX, J. W., STUKEY, R. E., BACHI, P. R. e HENSON, G. Influence of planting date and cultivar on soybean sudden death syndrome in Kentucky. **Plant Disease**, 74: 761-766, 1990.
- HEUN, M. e HELENTJARIS, T. Inheritance of RAPDs in F₁ hybrids of corn. **Theoretical and Applied Genetics**, 85: 961-968, 1993.
- HNETKOVSKY, N., CHANG, S. J. C., DOUBLER, T. W., GIBSON, P. T. e LIGHTFOOT, D. A. Genetic mapping of loci underlying field resistance to soybean sudden death syndrome (SDS). **Crop Science**, 36: 393-400, 1996.
- JIN, H., HARTMAN, G. L., NICKELL, C. D., e WIDHOLM, J. M. Characterization and purification of a phytotoxin produced by *Fusarium solani*, the causal agent of soybean sudden death syndrome. **Phytopathology**, 86: 277-282, 1996.
- KELLY, A., ALCALÁ-JIMÉNEZ, A. R., BAINBRIDGE, B. W., HEALE, J. B., PÉREZ-ARTÉS, E. e JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea. **Molecular Plant Pathology**, 84: 1293-1298, 1994.
- KIM, B. K., KANG, J. H., KIM, H. W., SHIM, M. J. e CHOI, E. C. Mycelial protoplasts isolation and regeneration of *Lentinus lepideus*. **Life Science**, 66: 1359-1367, 2000.

- KINSCHERF, T. G. e LEONG, S. A. Molecular analysis of the karyotype of *Ustilago maydis*. **Chromosoma**, 96: 427-433, 1988.
- KLISTER, H. C. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, 87: 474-479, 1997.
- KUMARI, J. A. e PANDA, T. Studies on critical analysis of factors influencing improved production of protoplasts from *Trichoderma reesei* micelium. **Enzyme and Microbial Technology**, 14: 241-248, 1992.
- LAKSHMI, B. R. e CHANDRA, T. S. Rapid release of protoplasts from *Eremothecium ashbyii* in comparison with *Trichoderma reesei* and *Penicillium chrysogenum* using Novozyme and Fungelase. **Enzyme and Microbial Technology**, 15: 699-702, 1993.
- McLEAN, K. S. e LAWRENCE, G. W. Interrelationship of *Heterodera glycines* and *Fusarium solani* in sudden death syndrome of soybean. **Journal of Nematology**, 27: 70-77, 1995.
- MELGAR, J. ROY, K. W. e ABNEY, T. S. Sudden death syndrome of soybean: etiology, symptomatology, and effects of irrigation and *Heterodera glycines* on the incidence and severity under field conditions. **Canadian Journal of Botany**, 72: 1647-1653, 1994.
- MICHELI, M. R., BOVA, R., CALISSANO, P. e DÁMBROSIO, E. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting using combinations of oligonucleotide primers. **Biotechniques**, 15: 388-390, 1993.
- NAKAJIMA, T., MITSUEDA, T. e CHARCHAR, M. A. First occurrence of sudden death syndrome of soybean in Brazil. **Japan Agricultural Research Quartely**, 30: 31-34, 1996.
- NEI, M. e LI, W. H. Mathematical model for studing genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, 76: 5269-5273, 1979.
- NJITI, V. N. SHENAUT, M. A., SUTTNER, R. J., SCHMIDT, M. E. e GIBSON, P. T. Soybean response to sudden death syndrome: inheritance influenced by cyst nematode resistance in pyramid X douglas progenies. **Crop Science**, 36: 1165-1170, 1996.
- NJITI, V. N., SUTTNER, R. J., GRAY, L. E., GIBSON, P. T. e LIGHTFOOT, D. A. Rate-reducing resistance to *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* underlies field resistance to soybean sudden death syndrome. **Crop Science**, 37: 132-138, 1997.
- OUELLET, T. e SEIFERT, K. A. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. **Phytopathology**, 83: 1003-1007, 1993.
- PEDERDY, J. F. e GIBSON, R. K. Regeneration of *Aspergillus nidulans* protoplasts. **Journal of General Microbiology**, 69: 325-330, 1971.

- PEDERDY, J. F., BUCKLEY, C. E., DALTREY, D. C. e MOORE, P. M. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, 67: 23-26, 1976.
- PEBERDY, J. F. Fungal protoplasts: isolation, reversion, and fusion. **Annual Review of Microbiology**, 33: 21-39, 1979.
- PEDERDY, J. F. **More gene manipulation in fungi: Fungal protoplasts**. Ed Academic Press. Cap. 14, 307-317, 1991.
- REDMAN, R. S. e RODRIGUEZ, R. J. Factors affecting the efficient transformation of *Colletotrichum* species. **Experimental Micology**, 18: 230-246, 1994.
- ROY, K. W., LAWRENCE, G. W. HODGES, H. H., McLEAN, K.S. e KILLEBREW, J. F. Sudden death syndrome of soybean: *Fusarium solani* as incitant and relation of *Heterodera glycines* to disease severity. **Phytopatology**, 79: 191-197, 1989.
- ROY, K. W. Sporulation of *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, causal agent of sudden death syndrome, on soybeans in the Midwestern and Southern United States, **Plant Disease**, 81: 566-569, 1997.
- RUPE, J. C. Frequency and pathogenicity of *Fusarium solani* recovered from soybean with sudden death syndrome. **Plant Disease**, 73: 581-584, 1989.
- RUPE, J. C., CORREL, J. C. e YOUNT, P. Differentiation of the soybean sudden death syndrome pathogen, *Fusarium solani*, from other isolates of *F. solani* based on cultural morphology and mitochondrial RFLPs. **Phytopathology**, 83:1423-1926, 1993.
- SANDHU, D. K., WADHWA, V. e BAGGA, P. S. Use of lytic enzymes for protoplast production in *Trichoderma reesei* QM9414. **Enzyme and MicrobialTechnology**, 11: 21-25, 1989.
- SANTOS, J. K. Obtenção e regeneração de protoplastos de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, causador da vassoura de bruxa em cacau (*Theobroma cacao* L.) **Dissertação de tese MS.**, Viçosa, MG. 38p, 2001.
- SPEACHT, C. A., DIRUSOP, C. C., NOVOTNY, C. P. e ULLRICH, R. C. A. A method for extracting high molecular weight desoxyribonucleic acid from fungi. **Analytical Biochemistry**, 119: 158-163, 1982.
- STEPHENS, P. A., NICKELL, C. D., e KOLB, F. L. Genetic analysis of resistance to *Fusarium solani* in soybean. **Crop Science**, 33: 929-930, 1993.
- THOMPSON, W., ISAAC, S., COLLIN, H. A. e HARDWICK, K. Isolation of protoplasts from *Crinipellis pernicioso*, causative agent of witches' broom disease of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Café Cacao Thé**, 30: 177-182, 1986.

- TURNER, A. S., LEES, A. K., REZANOOR, H. N. e NICHOLSON, P. Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. **Plant Pathology**, 47: 278-288, 1998.
- VAN DER PLANK, J. E. Genetic and molecular basis of plant pathogenesis. **Springer, Berlin**, 1978.
- VIAUD, M., COUTEAUDIER, Y. e RIBA, G. Molecular analysis of somatic hybrids of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria sulfurescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, 64: 88-93, 1998.
- XU, J. R., YAN, K., DICKMAN, M. B. e LESLIE, J. F. Electrophoretic karyotypes distinguish the biological species of *Giberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). **Molecular Plant-Microbe Interaction**, 8: 74-84, 1995.
- WARWAR, V. Parassexualidade e eletrofusão em *Aspergillus niger*. **Dissertação de tese MS**. Piracicaba, SP, ESALQ, 193p 1990.
- WELSH, J. e McCLELLAND, D. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v.19:p. 303-306, 1990.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J. RAFALSKI, J. A. e TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18: 6531-6535, 1990.
- WOO, S. L., ZOINA, A., SORBO, G.; LORITO, M.; NANNI, B. e SCALA, F. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs, and RAPD. **Phytopathology**, 86: 787-792, 1996.
- ZAPANTA, L. S., HATTORI, T., RZETSKAYA, M. e TIEN, M. Cloning of *Phanerochaete chrysosporium leu2* by complementation of bacterial auxotrophs and transformation of fungal auxotrophs. **Applied and Environmental Microbiology**, 64: 2624-2629, 1998.