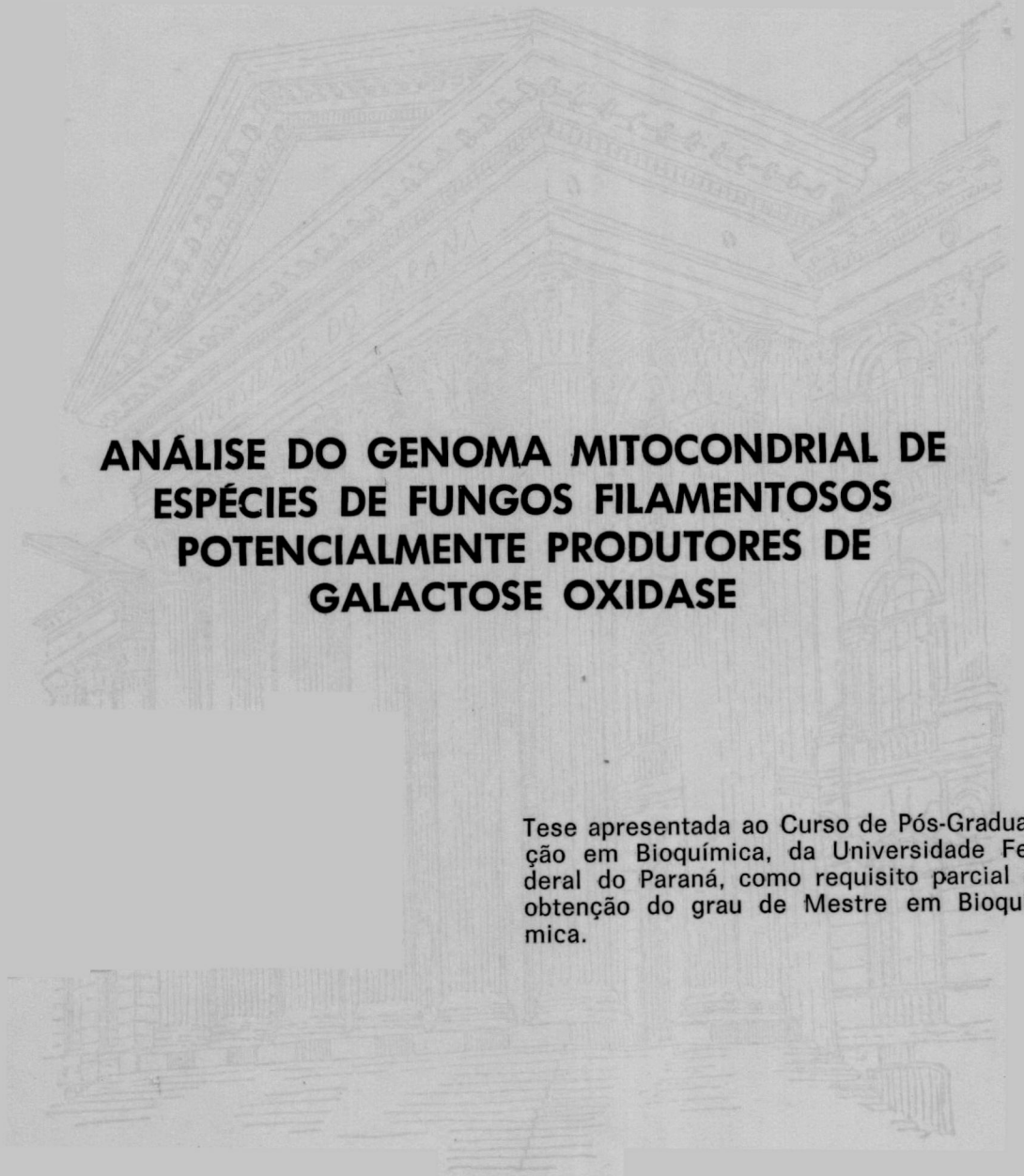


IARA MARIA PEREIRA



**ANÁLISE DO GENOMA MITOCONDRIAL DE
ESPÉCIES DE FUNGOS FILAMENTOSOS
POTENCIALMENTE PRODUTORES DE
GALACTOSE OXIDASE**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA
1993

IARA MARIA PEREIRA

**ANÁLISE DO GENOMA MITOCONDRIAL DE
ESPÉCIES DE FUNGOS FILAMENTOSOS
POTENCIALMENTE PRODUTORES DE
GALACTOSE OXIDASE**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA

1993

IARA MARIA PEREIRA

ANALISE DO GENOMA MITOCONDRIAL DE ESPÉCIES DE FUNGOS
FILAMENTOSOS POTENCIALMENTE PRODUTORES DE GALACTOSE OXIDASE

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientadora: Prof. Dr^a Glaci Therezinha Zancan
Departamento de Bioquímica, UFPR

Prof. Dr^a Muriel Mourão Vieira
Departamento de Bioquímica, UFPR

Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa
Departamento de Bioquímica, UFPR

Curitiba, 13 de abril de 1993

ORIENTADORA:

Drª Glaci Therezinha Zancan

A DEUS
pela infinita bondade

Aos meus pais
pela dedicação

Ao Hidevaldo
pela infinita paciência

AGRADECIMENTOS

A Dr^a Glaci Therezinha Zancan pela confiança no desenvolvimento desta tese;

à Dr^a N.M. Martinez Rossi do Departamento de Genética da FMRP-USP, pelo fornecimento da técnica de isolamento de DNA_{mt};

ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, pelo incentivo, pelo empréstimo de equipamentos e leitura crítica do trabalho;

ao doutorando Hidevaldo Bueno Machado, meu querido esposo, pelo apoio e auxílio constante na confecção da tese e também pela paciência dispendida durante o desenvolvimento dos trabalhos;

a todos os colegas do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e amigos que acompanharam o desenvolvimento desta tese, pelo apoio e companherismo;

aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica pela atenção e auxílio;

à equipe da biblioteca do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, em especial à Telma Teresinha Stresser de Assis, pela colaboração prestada;

ao grupo Cardápio, em especial à Liane Guariente e Andréia Bernardini que tornaram esta caminhada menos árdua;

à minha família que compreendeu minha ausência durante o desenvolvimento desta tese.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1 MICROORGANISMOS	11
2.2 REAGENTES QUÍMICOS	11
2.3 MEIOS DE CULTURA	12
2.3.1 MEIO DE ESTOCAGEM	12
2.3.2 MEIO LÍQUIDO PARA CULTIVO (MEIO DE MARKUS)	12
2.3.3 CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM DOS MICROORGANISMOS	13
2.3.4 OBTENÇÃO DO PRÉ-INÓCULO	14
2.3.5. MÉTODO DE CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO	14
2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE GALACTOSE OXIDASE EXTRACELULAR	14
2.5 UNIDADE DE ENZIMA	16
2.6 DETERMINAÇÃO DE PESO SECO	16
2.7 OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS	16
2.8 EXTRAÇÃO DE DNA MITOCONDRIAL	17
2.9 PREPARO DE FENOL E FENOL:CLOROFÓRMIO	18
2.10 QUANTIFICAÇÃO DO DNA ISOLADO	19
2.11 TRATAMENTO COM ENDONUCLEASES	20
2.12 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	22

2.13	DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DOS FRAGMENTOS DE DNA _{mt}	23
2.14	CÁLCULO DA FREQUÊNCIA DE BANDAS COMIGRANTES ENTRE AS DIVERSAS LINHAGENS DE FUNGOS	23
3	RESULTADOS	25
3.1	ISOLAMENTO DO DNA MITOCONDRIAL	25
3.2	ELETROFORESE DO DNA _{mt} ISOLADO	26
3.3	PERFIL DE RESTRIÇÃO DO DNA _{mt} POR ENDONUCLEASES	27
3.4	DETERMINAÇÃO DO TAMANHO TOTAL DO DNA _{mt} ISOLADO	28
3.5	ANÁLISE COMPARATIVA DO FUNGO PRODUTOR DE GALACTOSE OXIDASE COM O FUNGO <i>Dactylium dendroides</i>	29
3.6	CÁLCULO DA FREQUÊNCIA DE BANDAS COMIGRANTES ENTRE AS DIVERSAS LINHAGENS DE FUNGOS	30
3.7	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE GALACTOSE OXIDASE	31
4	DISCUSSÃO	47
5	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	PERFIL ELETROFORÉTICO DE DNA _{mt} s ISOLADOS DE DIFERENTES LINHAGENS DE FUNGOS	32
FIGURA 2	PERFIL ELETROFORÉTICO DE DNA _{mt} s DIGERIDOS COM <i>Eco</i> RI	33
FIGURA 3	PERFIL ELETROFORÉTICO DE DNA _{mt} s DIGERIDOS COM <i>Hind</i> III	34
FIGURA 4	PERFIL ELETROFORÉTICO DOS DNA _{mt} s DO FUNGO PRODUTOR DE GALACTOSE OXIDASE (GAO-01) E DAS LINHAGENS GAO-02 E GAO-03 DIGERIDOS COM <i>Eco</i> RI E <i>Hind</i> III	35
FIGURA 5	PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA _{mt} DA LINHAGEM GAO-01 E <i>Dactylium dendroides</i> NRRL 2575 DIGERIDOS COM <i>Bgl</i> II, <i>Xho</i> I E <i>Pst</i> I	36
FIGURA 6	DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS DOS DNA _{mt} s DE DIFERENTES FUNGOS DIGERIDOS COM <i>Eco</i> RI	37
FIGURA 7	DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS DOS DNA _{mt} s DE DIFERENTES FUNGOS DIGERIDOS COM <i>Hind</i> III	38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	ENDONUCLEASES UTILIZADAS NA RESTRIÇÃO DE DNA _{mt} s	21
TABELA 2	RENDIMENTO E GRAU DE PUREZA DOS DNA _{mt} s ISOLADOS DE DIFERENTES FUNGOS	39
TABELA 3	TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO Eco RI DE DNA _{mt} s DE DIFERENTES FUNGOS	40
TABELA 4	TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO Hind III DE DNA _{mt} s DE DIFERENTES FUNGOS	41
TABELA 5	TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO Eco RI DOS DNA _{mt} s DAS LINHAGENS GAO-01, GAO-02 E GAO-03 .	42
TABELA 6	TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO Hind III DOS DNA _{mt} s DAS LINHAGENS GAO-01, GAO-02 E GAO-03	43
TABELA 7	FREQUÊNCIA DE BANDAS COMIGRANTES DOS DNA _{mt} s DE DIFERENTES LINHAGENS DE FUNGOS DIGERIDOS COM Eco RI	44
TABELA 8	FREQUÊNCIA DE BANDAS COMIGRANTES DOS DNA _{mt} s DE DIFERENTES LINHAGENS DE FUNGOS DIGERIDOS COM Hind III	45
TABELA 9	NÍVEIS DE GALACTOSE OXIDASE EXTRACELULAR EM DIFERENTES FUNGOS FILAMENTOSOS	46

RESUMO

O DNA mitocondrial do fungo produtor de galactose oxidase isolado em Curitiba (GAO-01), foi isolado e comparado com o DNA_{mt} de diferentes fungos filamentosos potencialmente produtores de galactose oxidase *Dactylium dendroides* NRRL 2575, *Hypomyces rosellus* ATCC 6676, *Gibberella fujikuroi* NRRL 2248, *Fusarium graminearum* R-7615 e *Fusarium tricinctum* T-578 e as linhagens GAO-02 e GAO-03, isolados do mesmo ecossistema 26 anos depois. Os DNA_{mts} dos diferentes fungos foram digeridos com endonucleases de restrição *Eco* RI e *Hind* III e os somatórios dos fragmentos forneceram a estimativa para o tamanho do DNA_{mt}. O DNA_{mt} do fungo GAO-01 apresentou peso molecular de 62,1 ± 2,26 kb; GAO-02 apresentou 55,35 ± 2,8 kb; *Hypomyces rosellus*, 58,1 ± 1,76 kb; *Gibberella fujikuroi*, 56,55 ± 2,33 kb; *Fusarium graminearum*, 56,25 ± 1,34 kb; *Fusarium tricinctum* 52,25 ± 3,4 kb. A análise comparativa mostrou que a linhagem GAO-01 apresentou alta homologia com GAO-02 com cerca de 60% de bandas comigrantes, enquanto que com a linhagem de *Dactylium dendroides* a homologia foi baixa (<23%). As demais linhagens de fungos filamentosos apresentaram perfis de restrição bastante distintos quando comparado com a linhagem GAO-01, com frequência de 0 a 39% de bandas comigrantes.

1 INTRODUÇÃO

A identificação e classificação dos fungos sempre se constitui em um desafio para os micologistas. Os caracteres utilizados para a sistemática envolvem análises morfológicas, genéticas e recentemente de biologia molecular (34). Entre os caracteres moleculares encontram-se a análise da composição e estrutura de proteínas e do DNA.

Segundo Bruns *et al.* (7) o DNA mitocondrial vem sendo usado para estudos evolucionários em fungos por apresentar características como:

- a) Tamanho molecular relativamente pequeno, de 17 à 170 kb, de fácil manipulação.
- b) Ausência de bases metiladas, facilitando análise endonucleolítica.
- c) Predomínio de bases A + T facilitando seu isolamento.
- d) O alto número de cópias possibilita a fácil visualização dos fragmentos de restrição com pequenas quantidades de massa micelial.
- e) O DNA mitocondrial (DNA_{mt}) é rico em polimorfismos de comprimento em fragmentos de restrição (RFLP) a nível intraespecífico. As mutações nos comprimentos dos fragmentos são a maior causa da variação em todos os casos estudados.
- f) O DNA_{mt} é o elemento genômico melhor estudado em fungos.

Em animais, tem sido observado que o processo evolutivo é mais rápido no DNA_{mt} do que no DNA genômico. O DNA mitocondrial de animais é pequeno variando de 16 à 19 kb (5), enquanto que em fungos este varia de 18,9 kb em *Torulopsis glabrata* (11) a 176 kb em *Agaricus bitorquis* (26). Em todos os fungos estudados até o momento o genoma mitocondrial é geralmente circular com exceção de *Physarum polycephalum* (29) e *Hansenula mrakii* (62) que apresentam este DNA linearizado.

A despeito das diferenças em tamanho, ambos os DNAs mitocondriais de animal e de fungo contém aproximadamente os mesmos genes que codificam para as proteínas envolvidas no transporte de elétrons e na fosforilação oxidativa como citocromo c oxidase, apocitocromo b, RNA e proteínas necessárias à síntese protéica, bem como um número de sequências codificadoras ("open reading frames") cujos produtos e funções não foram ainda identificados. A diferença entre os tamanhos dos DNA_{mts} animal e de fungo e a variabilidade entre DNA_{mt} destes é aparentemente devido a deleções e inserções, que geralmente são consideradas como mutações de comprimento. O entendimento da razão desta diferenças de tamanho constitui um importante desafio para os estudos evolutivos de fungos (53).

As mutações predominantes em DNA_{mt} animal são mutações pontuais embora também possam ocorrer adições e deleções (9). Estas mutações podem ser detectadas através de análises de restrição com endonucleases que reconhecem sequências curtas e específicas de nucleotídeos (53). As

endonucleases de restrição podem clivar as moléculas de DNA na própria sequência (por exemplo, *Eco* RI, *Hind* III, *Sma* I) ou próximo a ela (por exemplo *Hga* I, *Hph* I, *Mbo* II) (49). Os fragmentos de restrição produzidos por estas enzimas podem ser separados e analisados pelos seus diferentes tamanhos moleculares através de eletroforese em gel de agarose, uma vez que o seu tamanho molecular é inversamente proporcional à sua mobilidade eletroforética. Mutações que causam variabilidade entre genomas são observadas como diferenças nos padrões dos fragmentos de restrição, também denominado polimorfismos de comprimento nos fragmentos de restrição (RFLPs) (53).

Nos estudos pioneiros em animais, os RFLPs foram considerados como caracteres taxonômicos e tratados por taxonomia numérica (18). Segundo Upholt (58) e Nei & Li (45) os padrões de fragmentos de restrição poderiam ser usados para estimar a proporção de substituição de nucleotídeos entre várias linhagens.

Saunders *et al.* (50) mostraram que o DNA_{mt}s de fungos apresentavam muitas variações de comprimento. Esta observação foi posteriormente confirmada por outros autores (36, 54).

Em 1982, Kozlowski & Stepien (35) apresentaram as primeiras comparações entre os fragmentos de restrição dos DNA_{mt}s em seus estudos taxonômicos das espécies do gênero *Aspergillus*. Os autores compararam sete espécies morfológicamente distintas mostrando que a análise do DNA mitocondrial poderia ser usada para estabelecer correlações

filogenéticas entre as espécies.

Em 1986, Taylor (53) e Taylor *et al.* (55) mostraram que a mutação de comprimento é a mais importante fonte de variabilidade em DNA mitocondrial de espécies de *Neurospora*. Os dados mostraram a presença de populações geograficamente distintas. Devido à complexidade nas diferenças mutacionais no genoma mitocondrial, que limita as comparações entre gênero e espécies, foi sugerido o emprego de sondas com sequências gênicas altamente conservadas, como por exemplo, os genes que codificam para o RNA ribossomal.

Garder & Yoder (23) mostraram que o RFLP dos DNAs mitocondriais isolados de vinte e três linhagens de *Cochliobolus heterostrophus*, distribuídas universalmente, apresentavam diferenças significativas. A análise por hibridização mostrou a existência de duas populações geograficamente distintas.

A identificação das diferentes espécies de fungos é difícil e tem sido baseada principalmente nas suas características morfológicas. Typas *et al.* (57) mostraram em seus trabalhos, que o RFLP de DNA_{mt} pode contribuir significativamente para a caracterização de espécies e subespécies do gênero *Verticilium*, de considerável importância para a agricultura como fitopatógenos e entomopatógeno.

O interesse no comportamento genético das espécies de *Candida*, bem como na conversão dimórfica de *Candida albicans* levou Wills *et al.* (63) a iniciar um estudo detalhado do genoma mitocondrial deste gênero. Os autores descreveram que

o DNA_{mt} apresenta tamanho molecular de 41 kb, como estimado pela soma de seus fragmentos de restrição. O mapeamento de restrição revelou ainda que tratava-se de um DNA circular confirmando os dados anteriormente fornecidos por estudos de microscopia eletrônica (64).

Hintz *et al.* (26) interessados em homologia interespecífica, isolaram o DNA mitocondrial de quatro linhagens de *Agaricus brunnescens*, um cogumelo comestível, e de dez linhagens de *Agaricus bitorquis*, cogumelo selvagem, verificaram que os DNAs mitocondriais apresentaram 60% de homologia entre si. As linhagens de *Agaricus bitorquis*, entretanto mostraram maior heterogeneidade entre si do que entre as linhagens de *A. brunnescens*.

Vinte isolados do fungo patogênico *Histoplasma capsulatum*, identificados através de caracteres morfológicos e imunológicos, foram divididos em três classes pelo padrão de restrição do DNA_{mt}. Cada classe apresentou perfil próprio sendo que 40% dos fragmentos eram comuns a todas as linhagens analisadas (61).

Um outro fungo patogênico, *Cryptococcus neoformans*, apresenta duas variedades com quatro tipos sorológicos distintos. A análise de restrição revelou que vinte isolados mostravam grande diversidade. Dentro de cada variedade houve coincidências no padrão de restrição dos DNA_{mts}, mas nenhuma similaridade foi vista entre os diferentes sorotipos (59).

O mapa de restrição e a localização dos genes do genoma mitocondrial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *meloni* foram determinados utilizando-se fragmentos clonados de *Neurospora*

crassa como sondas (28). O DNA total de setenta e oito linhagens deste mesmo fungo, isoladas de várias partes do mundo, foi hibridizado com fragmentos do DNA_{mt} de uma linhagem de referência (P-2, raça 2, VCG 0130). Verificou-se que havia uma estreita correlação dos perfis de fragmentos de restrição com a distribuição de grupos compatibilidade vegetativa (VCG) das linhagens. O padrão de restrição do DNA_{mt} indicou associação de cada linhagem vegetativamente auto-incompatível com o VCG de raça e origem geográfica similar. Este estudo demonstrou que o VCG e os padrões de restrição do DNA_{mt} podem ser usados para definir populações geneticamente isoladas dentro de uma mesma espécie, no caso o *Fusarium oxysporum* (28).

Seis espécies do gênero *Phytophthora*, de origem geográfica distinta e hospedeiro variado, foram isolados e mostraram diferentes graus de diversidade nos padrões de restrição no genoma mitocondrial. Em algumas espécies não havia variação enquanto que em outras, a variação permitiu distinguir linhagens quanto ao tipo de hospedeiro ou origem geográfica (20).

A análise de restrição do DNA_{mt} de vinte e nove isolados de *Phytium* sp correlacionando o percentual de bandas comuns entre eles, revelou baixa similaridade, de 20 a 32%, entre espécies que apresentavam muitas características morfológicas comuns (40). Entretanto, quando o estudo foi realizado com isolados de uma mesma espécie de *Phitium ultimum* foi demonstrado que os padrões de restrição eram praticamente idênticos, com exceção de uma linhagem que

compartilhava 80% de similaridade (39).

Penicillium chrysogenum e *Penicillium urticae* são fungos filamentosos de importância industrial, por produzirem penicilina e griseofulvina respectivamente (37). Comparando os DNAs mitocondriais destas espécies, Sekiguchi *et al.* (51) verificaram que ambos mostravam similaridade quanto ao tamanho e arranjo do genoma, bem como quanto a localização dos genes que codificam para RNAs ribossomais.

O DNA_{mt} do basidiomiceto *Clavicornia pyxidata* foi isolado, analisado e verificou-se que apresentava um tamanho molecular de 56 kb valor intermediário entre aqueles descritos para outros basidiomicetos. O mapa de restrição foi determinado através da localização dos genes para citocromo oxidase, citocromo b e ATPase (13).

Specht *et al.* (52) analisaram o DNA_{mt} de quatro cepas independentes de *Schizophyllum commune* e estimaram o tamanho de seu DNA mitocondrial em torno de 50 kb. Mesmo assim cada uma das cepas apresentava um padrão distinto de fragmentos de restrição.

Os dados da literatura demonstram grande heterogeneidade nos perfis de restrição dos DNA_{mts} entre gênero, espécies e populações analisadas. Segundo Bruns *et al.* (7) e Kohn (34), a análise de restrição e mapeamento do DNA_{mt} permite distinção entre espécies e intraespécies desde que considere esses dados em conjunto com os demais caracteres utilizados para classificação de fungos.

O primeiro fungo capaz de produzir galactose oxidase foi isolado em Curitiba, em 1955, e representa até hoje um

desafio para a sua classificação taxonômica, devido, principalmente, à impossibilidade de se obter em laboratório conídios ou corpos de frutificação (31), cujas características morfológicas permitiriam sua classificação (10). Esse fungo foi depositado no American Type Culture Collection sob número ATCC 46032 e no Northern Regional Research Laboratories sob o número NRRL 2903.

Este fungo foi inicialmente classificado pelo Prof. A. Chaves Batista do Instituto de Micologia da Universidade de Recife como sendo *Polyporus circinatus* (12). Mais tarde, em 1963, Nobles & Madhosingh (46) sugeriram tratar-se de *Dactylium dendroides*, um ascomiceto. O fungo *Dactylium dendroides* foi descrito como sendo a forma conidial do *Hypomyces rosellus*, um parasita de cultura de cogumelos (60). Entretanto, Lockwood, citado em Amaral *et al.* (3), não conseguiu demonstrar atividade de galactose oxidase em várias linhagens desta espécie. Contudo, a literatura internacional costuma correlacionar a produção de galactose oxidase com o fungo *Dactylium dendroides* (3, 19, 42, 46,).

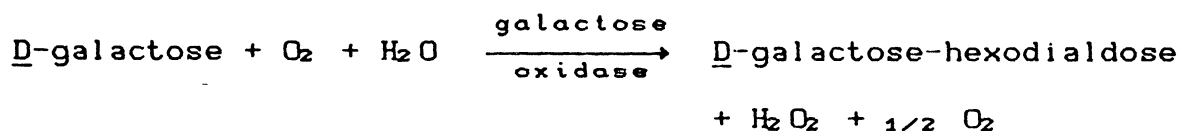
Em 1976, Kemmelmeier & Zancan (30) confirmaram por microscopia eletrônica que o fungo isolado em Curitiba tem características de um ascomiceto como o *Dactylium dendroides*. Em estudos posteriores verificou-se que tanto o *Hypomyces rosellus* quanto o *Dactylium dendroides* não produziam galactose oxidase como também mostravam diferenças imunológicas em relação ao fungo produtor de enzima isolado em Curitiba (33).

A análise da parede celular do fungo produtor de

galactose oxidase e do fungo *Dactylium dendroides* revelou que ambos apresentavam variação na relação do conteúdo de galactose/manose (31), sugerindo diferenças nas galactoglucomananas presentes na parede celular. Os polissacarídeos isolados apresentaram estruturas e reações antigênicas distintas (32).

A presença de galactose oxidase tem sido demonstrada em vários microorganismos. Gancedo *et al.* (21) descreveram a produção de galactose oxidase por uma cepa do fungo *Fusarium moniliforme* isolado na Espanha. Aisaka & Terada (1), por outro lado, reportaram a produção desta enzima por uma linhagem de *Gibberella fujikuroi* isolada no Japão. Buglova *et al.* (8) relataram a produção da galactose oxidase por *Fusarium graminearum*. Dias & Kemmelmeier (16) observaram a produção desta enzima por linhagens de *Fusarium* sp isolado no Brasil.

A galactose oxidase (EC 1.1.3.9) é uma metaloenzima contendo cobre, que catalisa a reação de oxidação da D-galactose formando um dialdeído conforme a reação abaixo:



Esta enzima tem sido extensivamente estudada devido as suas propriedades catalíticas, como cobre-enzima (19) e ao seu amplo emprego como reagente para determinação de galactose e seus polímeros (15, 41). A galactose oxidase intracelular foi estudada quanto a sua purificação e

cinética, bem como o efeito do etanol e tunicamicina, na síntese e secreção da enzima por Mendonça & Zancan (43, 44).

Recentemente o gene para expressão da enzima foi clonado e sequenciado (42) e a estrutura da enzima extracelular foi estudada por métodos de cristalografia (27).

A despeito de todo o estudo dispensado à enzima galactose oxidase, a classificação do fungo isolado em Curitiba permanece indefinida.

Com a finalidade de dispor de maior número de dados que auxiliem na classificação taxonômica do fungo produtor da enzima galactose oxidase, realizamos estudos de análise comparativa dos fragmentos de restrição produzidos por endonucleases no DNAs mitocondriais de diferentes linhagens de fungos citadas na literatura como produtoras de galactose oxidase.

Segundo Viennot-Bourgin (60), as espécies analisadas neste trabalho pertencem a classe dos *Ascomycetes*, ordem das *Hypocreales* onde se inclui o *Hypomyces rosellus* cuja forma conidial é o *Dactylium dendroides*, *Fusarium graminearum*, *Gibberella fujikuroi* e *Fusarium tricinctum*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMOS

Polyporus circinatus NRRL 2903, *Dactylium dendroides* NRRL 2575 e *Gibberella fujikuroi* NRRL 2248 foram fornecidos pelo Northern Regional Research Laboratories, Department of Agriculture, Peoria, Illinois U.S.A. *Hypomyces rosellus* ATCC 6676 fornecido pela American Type Culture Collection, U.S.A. *Fusarium graminearum* R-7615 e *Fusarium tricinctum* T-578 foram gentilmente cedidos pelo professor Paul E. Nelson, do Fusarium Research Center, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Pennsylvania State University, U.S.A. A amostra original produtora de galactose oxidase (GAO-01) e as amostras GAO-02 e GAO-03 fazem parte da micoteca do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

2.2 REAGENTES QUÍMICOS

Agarose tipo II, RNase, Ficoll, foram adquiridos da Sigma Chemical Company. Etanol absoluto, clorofórmio, fenol, álcool isoamílico, Tris base, sulfato de magnésio,

D-glucose, acetato de amônio foram adquiridos da E. Merck. As endonucleases e tampões de restrição 10x concentrados foram adquiridos da Pharmacia P-L Biochemicals Inc. ou da Boehringer Corporation. Novozym 234 (batch 1961, Novo Industri-Copenhagen, Denmark). Os demais reagentes utilizados foram provenientes de diversas fontes, todos pré-análise e tidos como puros.

2.3 MEIOS DE CULTURA

2.3.1 MEIO DE ESTOCAGEM

Todas as linhagens de fungos foram mantidas em meio ágar malte 2,0% que apresentava a seguinte composição:

Dextrose	20,0 g
Peptona	1,0 g
Extrato de malte	20,0 g
Ágar	20,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

O meio foi esterilizado por autoclavação a 120°C por 20 minutos.

2.3.2 MEIO LÍQUIDO PARA CULTIVO (MEIO DE MARKUS)

Para crescimento das diferentes linhagens de fungo

foi utilizado o meio líquido proposto por Markus *et al.* (38) apresenta a seguinte composição:

KH_2PO_4	9,0 g
Na_2HPO_4	8,0 g
$(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$	2,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
NH_4NO_3	1,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,0 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5 mg
Água destilada q.s.p.	1000 ml

O pH final do meio foi corrigido para 5,8 com HCl 50% (v/v) e esterilizado por autoclavação a 120°C por 20 min. Como fonte de carbono foi utilizado D-glucose previamente esterilizada em vapor vapor fluente, sendo adicionada assepticamente ao meio de cultura no momento de uso, nas concentrações requeridas.

Para determinação da atividade de galactose oxidase extracelular das diferentes linhagens, foi utilizado como fonte de carbono L-sorbose, esterilizada como a D-glucose.

2.3.3 CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM DOS MICRORGANISMOS

As linhagens foram cultivadas em ágar malte, incubadas à 28°C por 72 h ou até o desenvolvimento de micélio e estocadas à 4°C. Novos repiques foram realizados

trimestralmente.

2.3.4 OBTENÇÃO DE PRÉ-INÓCULOS

Fragmentos de micélio das diferentes linhagens crescidos em ágar malte foram transferidos para frascos erlenmeyer de 250 ml de contendo 50 ml de meio de Markus suplementado com 1% de D-glucose. O crescimento foi conduzido por um período de 48 h sob agitação contínua à 150 rpm e 28°C.

2.3.5. MÉTODO DE CULTIVO EM LARGA ESCALA

O cultivo dos microrganismos foi realizado em frascos erlenmeyer de 2000 ml com 400 ml de meio de Markus contendo 0,5% de D-glucose. O pré-inóculo foi homogeneizado em liquidificador Waring Blender por 30 s em velocidade máxima. Oito ml do homogeneizado foram transferidos assepticamente para cada frasco. O crescimento foi conduzido por 15 h sobre agitação contínua de 150 rpm e 28°C.

2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE GALACTOSE OXIDASE EXTRACELULAR

Para determinação da atividade de galactose oxidase extracelular, o crescimento foi realizado em frascos

erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio de Markus com 1% de L-sorbitose como fonte de carbono. Os frascos foram inoculados com 0,25 ml pré-inóculo homogeneizado e incubados por um período de 60 h sobre agitação contínua de 150 rpm e 28°C. Após este período, as culturas foram filtradas, e o filtrado foi utilizado como fonte de galactose oxidase extracelular e o micélio para a determinação do peso seco.

A atividade da enzima galactose oxidase extracelular foi determinada segundo o método proposto por Aisaka & Terada (1) que baseia-se na dosagem colorimétrica de H_2O_2 formada. A água oxigenada, formada como produto da catálise da enzima galactose oxidase, é decomposta em presença de peroxidase, acoplando oxidativamente a 4-aminoantipirina ao fenol, o que resulta em um produto colorido, a quinoneimina, com absorção máxima a 500 nm.

O sistema de incubação continha 150 μ moles de tampão fosfato pH 7,0, 900 μ moles de D-galactose, 1,2 μ moles de 4-aminoantipirina, 21 μ moles de fenol e 20 unidades de peroxidase, em um volume final de 3,0 ml. A reação era iniciada com a adição da enzima. Após a incubação à 30°C a formação da quinoneimina foi determinada a 500 nm em um espectrofotometro Beckman DU-2. A conversão de unidades de absorbância de quinoneimina em μ moles de H_2O_2 produzido foi determinada empregando-se uma curva padrão (10 a 280 nmoles de água oxigenada).

Os controles sem a adição de enzima e substrato foram efetuados, não se verificando desenvolvimento de cor.

2.5 UNIDADE DE ENZIMA

Uma unidade de enzima (U) galactose oxidase foi definida como sendo a quantidade de enzima que produz um μmol de H_2O_2 por minuto, nas condições definidas.

2.6 DETERMINAÇÃO DO PESO SECO

Para a determinação do peso seco, os micélios das culturas foram coletadas a vácuo sobre discos de papel Wheaton de peso conhecido. Os micélios obtidos foram colocados em estufa à 60°C para secagem até peso constante. O peso de cada disco contendo micélio foi determinado em balança analítica, após atingir a temperatura ambiente dentro de um dessecador contendo sílica gel.

2.7 OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS

Protoplastos a partir das diversas linhagens de fungos foram obtidos pelo método proposto por Amaral *et al.* (4). Cerca de 3.0 g de micélio úmido foi coletado por filtração, lavado três vezes com água destilada estéril e três vezes com tampão fosfato 5 mM pH 5,6 gelado. O micélio foi então suspenso em 100 ml de solução para obtenção de protoplastos. O sistema de incubação era composto de tampão fosfato 15 mM

pH 7,0, $MgSO_4$ 0,8 M, β -mercaptoetanol 10 mM e Novozime na concentração de 2 mg/ml. A suspensão foi incubada em um agitador tipo Dubnoff a 50 rev./min e 30°C por 4 h. A formação de protoplastos foi monitorada por microscopia ótica a 100x de aumento. Confirmado a formação dos protoplastos, a mistura de incubação foi filtrada através de placa porosa para remover fragmentos miceliais e o filtrado foi usado como fonte de protoplastos.

2.8 EXTRAÇÃO DE DNA MITOCONDRIAL

A extração do DNA_{mt} foi realizada conforme o método descrito por Defontaine *et al.* (14). A suspensão de protoplastos mantida sobre gelo, foi submetida a um tratamento com ultrassom a 60 Watts de potência até o rompimento dos protoplastos. O tempo de exposição ao ultrassom variou de 15 a 30 s de acordo com a espécie de fungo. O tratamento foi acompanhado por microscopia ótica, como acima.

Após a lise, o material foi centrifugado a 1.000 $\times g$ por 10 min a 4°C. O sobrenadante contendo as mitocôndrias foi transferido para outro tubo estéril e novamente centrifugado à 15.000 $\times g$ por 20 min a 4°C. O resíduo contendo mitocôndrias foi lavado por quatro vezes com uma solução estéril composta de sorbitol 0,5 M; EDTA 10 mM; tampão Tris-HCl 50 mM e β -mercaptoetanol 2% e pH final de

7,5.

Após a quarta centrifugação o resíduo foi suspenso em 1 ml de solução para lise de mitocôndrias constituída de NaCl 100 mM; EDTA 10 mM; Tris-HCl 50 mM e SDS à 1% e pH final de 7,8. O tempo de lise das mitocôndrias foi de 15 min à temperatura ambiente. O lisado mitocondrial foi desproteínizado com fenol:clorofórmio, preparado conforme o item 2.9. Após adição de igual volume de fenol:clorofórmio a mistura era homogeneizada gentilmente, centrifugada em microcentrífuga Spin I (marca Incibrás) por 5 min e a fase aquosa transferida para tubo estéril. Este tratamento foi repetido até não mais haver presença de proteína na fase intermediária. Finalmente, a fase aquosa era transferida para outro tubo estéril e submetido a tratamento com RNase (10 µg/ml) por 30 min à 37°C.

A precipitação do DNA mitocondrial foi realizado pela adição de 0,5 volume de acetato de amônio 7,5 M e 2 volumes de etanol 95%. Esta suspensão foi mantida à 4°C por, pelo menos, 1 h e centrifugada à 10.000 ×g durante 15 min. O resíduo resultante foi lavado três vezes com etanol à 70%, seco à vácuo e ressuspenso em 0,1 ml de água bidestilada estéril.

2.9 PREPARO DE FENOL E FENOL:CLOROFÓRMIO

A utilização de fenol:clorofórmio é importante para a

remoção de proteínas durante a purificação de ácidos nucleicos. Fenol tamponado foi preparado conforme o método descrito por Sambrook *et al.* (49) modificado como se segue. O fenol cristalino foi fundido em banho-maria e adicionado de 8-hidroxiquinolina a uma concentração final de 0,1%. Ao fenol fundido foi adicionado um volume equivalente de solução de Tris base 0,5 M, agitado e deixado decantar. A fase aquosa foi descartada e a seguir foi adicionado um volume equivalente de tampão Tris-HCl 0,5 M pH 8,0, agitado, decantado e a fase aquosa descartada. Esta operação foi repetida com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 até obtenção de um pH da fase aquosa maior que 7,5. O fenol foi então acrescido de um volume de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo 0,2% de β -mercaptoetanol e mantido em frasco âmbar a 4°C por até 30 dias.

A solução de fenol:clorofórmio foi preparada misturando-se partes iguais de fenol tamponado com uma solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), e mantidos com uma fase aquosa de Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 em frasco âmbar a 4°C por até 30 dias.

2.10 QUANTIFICAÇÃO DO DNA ISOLADO

A concentração de ácidos nucleicos obtidos na etapa final do isolamento de DNA mitocondrial foi determinada pelo método espectrofotométrico (49). O material a ser

quantificado foi diluído 100 vezes em água destilada e a sua absorvância em 260 nm foi determinada em um espectrofotômetro Gilford modelo 252. A concentração foi calculada considerando-se que uma solução de DNA de dupla fita a 50 $\mu\text{g/ml}$ apresenta uma absorvância de 1,0 em 260 nm (49).

A razão entre as absorvâncias em 260 e 280 nm fornece uma estimativa do grau de pureza do material analisado (49). Preparações puras de DNA apresenta uma relação DO_{260}/DO_{280} de 1,8. Contaminações com proteínas ou fenol, diminuem o valor desta relação e atrapalham a quantificação precisa do ácidos nucléicos (49).

2.11 TRATAMENTO COM ENDONUCLEASES

Amostras (3,0 à 10,0 μg) de DNA mitocondrial foram utilizadas para os experimentos de clivagem com endonucleases. As condições de reação usadas foram aquelas especificadas pelo fabricante. O tampão utilizado para restrição com as enzimas *Eco* RI e *Hind* III apresentava a seguinte composição final: Tris-HCl 10 mM pH 8,0, MgCl_2 5 mM, NaCl 100 mM e β -mercaptoetanol 1 mM. O utilizado para a enzima *Bgl* II: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl_2 10 mM, NaCl 50 mM e ditioeritritol 1 mM. O tampão utilizado para as enzimas *Pst* I e *Xho* I continha Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl_2 10 mM, NaCl 100 mM e ditioeritritol 1 mM.

As reações de restrição foram realizadas em tubos de plástico tipo Eppendorf em um volume final de 10 μ l contendo de 2 a 3 U de endonuclease e incubados por cerca de 12 h a 37°C.

As enzimas de restrição utilizadas estão listadas na tabela 1.

TABELA 1 ENDONUCLEASES UTILIZADAS NA RESTRIÇÃO DE DNA_{mt}s

ENDONUCLEASES	UNIDADES*	SÍTIO DE RECONHECIMENTO
<i>Eco</i> RI	10 U/ μ l	5'-G↓AATT C-3' 3'-C TTAA↑G-5'
<i>Hind</i> III	10 U/ μ l	5'-A↓AGCT T-3' 3'-T TCGA↑A-5'
<i>Bgl</i> II	15 U/ μ l	5'-A↓GATC T-3' 3'-T CTAG↑A-5'
<i>Xho</i> I	10 U/ μ l	5'-C↓TCGA G-3' 3'-G AGCT↑C-5'
<i>Pst</i> I	12,5 U/ μ l	5'-C↓TGCA G-3' 3'-G ACGT↑C-5'

Uma unidade de enzima é definida como a quantidade de enzima necessária para digerir completamente 1 μ g de DNA em 60 min nas condições adequadas para cada enzima. Os valores foram fornecidos pelo fabricante.

2.12 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

As condições de eletroforese em gel de agarose foram aquelas descritas por Sambrook *et al.* (49). As amostras contendo DNA íntegro e aquelas com DNA digerido com as enzimas de restrição, foram submetidas a eletroforese em gel de agarose à 0,8% e 1% respectivamente. O gel foi preparado em tampão TBE (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, Na₂EDTA 2,5 mM) em placa de 10 x 0,5 cm, com capacidade para 8 amostras.

As amostras de DNA foram misturadas com tampão TE-F.SUDS (Tris.HCl 65 mM pH 8,0, EDTA 1,75 mM, azul de bromofenol 0,008%, Ficoll 400 1%, SDS 1%) que tem a finalidade de aumentar a densidade da amostra e facilitar a sua aplicação no gel de agarose, além de possibilitar a visualização da migração através do corante azul de bromofenol.

As corridas eletroforéticas com os geis horizontais submersos foram realizada em tampão TBE com corrente de 3 volts/cm por 8 h ou até o corante atingir a extremidade do gel. Após a corrida, os geis foram corados com solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 30 min. O excesso de brometo de etídio foi removido por lavagens sucessivas com água destilada. A visualização do DNA complexado com corante foi feito em transiluminador de luz ultravioleta (302 nm). Os resultados foram registrados fotograficamente com câmera Minolta de 35 mm equipada com filtros ultravioleta e vermelho em filme Kodak preto e branco ISO/ASA 100, com

abertura máxima (f 1.8) e exposições de 1, 1/2 e 1/4 s.

2.13 DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DOS FRAGMENTOS DE DNA_{mt}

Os pesos moleculares dos fragmentos de DNA foram determinados através de comparação com uma mistura padrão de fragmentos de DNA de pesos moleculares conhecidos adquirida da Gibco/BRL, denominado 1 Kb DNA Ladder, que apresenta os seguintes fragmentos em ordem descendente (em kb): 12,216, 11,198, 10,180, 9,162, 8,144, 7,126, 6,108, 5,090, 4,072, 3,054, 2,036, 1,636, 1,018, 0,506/0,517, 0,396, 0,344, 0,298, 0,220, 0,201, 0,154, 0,134 e 0,075. Os tamanhos dos fragmentos clivados por endonucleases foram obtidos por interpolação em um gráfico semi-logarítmico construído a partir da distância de migração dos fragmentos padrões (mm) contra o peso molecular (kb).

2.14 CÁLCULO DA FREQUÊNCIA DE BANDAS COMIGRANTES ENTRE AS DIVERSAS LINHAGENS DE FUNGOS

Para se obter a frequência de bandas comigrantes entre as espécies de fungos correlacionados foi utilizada a equação 21 de Nei & Li (45):

$$F = \left[\frac{2 N_{xy}}{(N_x + N_y)} \right] \times 100$$

onde, F é a percentagem de fragmentos comuns; N_{xy} é o número de fragmentos comuns para as linhagens x e y; e, N_x e N_y são os números totais de bandas de cada linhagem. As bandas com menos de 0,8 kb não foram incluídas no cálculo devido a dificuldade na sua visualização e identificação.

3 RESULTADOS

3.1 ISOLAMENTO DO DNA MITOCONDRIAL

O método escolhido para o isolamento do DNA mitocondrial das diferentes linhagens foi o descrito por Defontaine *et al.* (14) por ser mais simples e rápido.

Os protoplastos foram obtidos seguindo a técnica de Amaral *et al.* (4) que permitiu a obtenção de protoplastos de todas as linhagens de fungo utilizadas, o que não ocorreu quando se empregou a metodologia descrita por Defontaine *et al.* (14). Os protoplastos obtidos foram então lisados com ultrassom uma vez que também não foi possível rompê-los apenas por lise osmótica. Os protoplastos intactos remanescentes após tratamento com o ultrassom, foram eliminados do lisado contendo mitocôndrias através de centrifugação a 1.000 $\times g$ por 5 min, evitando assim uma possível contaminação posterior com resíduos de DNA cromossômico durante a lise das mitocôndrias. As mitocôndrias foram coletadas por centrifugação a 15.000 $\times g$ por 20 min e submetidas a sucessivas lavagens para eliminar contaminantes ou restos de DNA nuclear. As etapas seguintes que envolvem a lise mitocondrial, extração e purificação do DNA_{mt} seguiram a metodologia indicada por Defontaine *et al.*

(14).

As quantidades de DNA_{mt} obtidos das diversas linhagens de fungos e seu grau de pureza estão apresentados na tabela 2. Todas as linhagens apresentaram um rendimento médio de 50 µg de DNA_{mt} por grama de micélio úmido, com exceção das linhagens GAO-01 e GAO-02 que renderam 25 µg/g de micélio úmido. Todos os DNA mitocondriais obtidos apresentaram uma relação DO_{260}/DO_{280} superior a 1,8, indicando um alto grau de pureza.

3.2 ELETROFORESE DO DNA_{mt} ISOLADO

A análise eletroforética permite avaliar as condições em que o DNA_{mt} se encontra, após as várias etapas a que foi submetido. O perfil eletroforético das amostras de DNA mitocondrial das diferentes linhagens de fungos é mostrado na (figura 1), onde apresentam-se como bandas únicas, de pesos moleculares em torno de 50 kb, tomando como referência o DNA do fago λ de 48,5 kb.

As amostras dos DNA_{mt}s dos fungos *Dactylium dendroides* e GAO-03 mostraram bandas largas, difusas em relação às demais, embora apresentem uma banda discreta central.

Com o objetivo de eliminar a provável contaminação com DNA nuclear, o DNA_{mt} de *Dactylium dendroides* foi tratado com exonuclease III. Houve apenas uma ligeira redução no DNA

total sugerindo ser pequena a contaminação com DNA cromossomal. Além disso, o fato do DNA_{mt} não ter sido digerido sugere se tratar de uma forma circular.

3.3 PERFIL DE RESTRIÇÃO DOS DNA_{mts} POR ENDONUCLEASES

Os perfis de restrição do DNA_{mt} das diferentes linhagens de fungos são apresentados nas figuras 2 e 3. Estudos preliminares com diferentes endonucleases como *Pst* I, *Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III, *Xho* I, *Bgl* II mostraram que somente as enzimas *Eco* RI e *Hind* III ream capazes de clivar os DNA_{mts} de todas as linhagens sendo então utilizadas para a análise comparativa.

O DNA mitocondrial das linhagens estudadas apresentaram de 9 a 17 sítios de clivagem para a *Eco* RI enquanto com a enzima *Hind* III apresentou em torno de 11 a 19 sítios de reconhecimento.

Os fragmentos de tamanhos inferiores a 1 kb não foram considerados nas análises devido a dificuldade de visualização.

O DNA_{mt} do fungo *Polyporus circinatus* NRRL 2903 apresentou um perfil similar àquele do fungo GAO-01 (figuras 2 e 3). Comparando-se o perfil de restrição do DNA_{mt} do fungo GAO-01 com aqueles das linhagens GAO-02 e GAO-03 isoladas no mesmo ecossistema vinte e seis anos depois (figuras 4, 6, 7 e tabelas 5 e 6), foi observado que

o DNA_{mt} do fungo GAO-02 apresentou perfil semelhante àquele do GAO-01 exceto pelos fragmentos *Eco* RI de 1,1, 2,7 e 5,9 kb; e fragmentos *Hind* III de 1,05, 1,2, 3,3 e 4,0 kb. Enquanto que, o DNA_{mt} da linhagem GAO-03 apresentou um perfil distinto em relação as linhagens GAO-01 e GAO-02. Apesar disso, foram observadas fragmentos comuns entre as três linhagens, fragmentos *Eco* RI de 1,7, 2,0 e 3,0 kb; e fragmentos *Hind* III de 1,4, 1,75, 2,1, 2,4, 2,5, 2,7 e 2,9 kb).

Os fungos *Dactylium dendroides* NRRL 2575 e GAO-03 apresentaram um perfil de restrição pouco nítido, no caso da linhagem GAO-03 foram considerados os fragmentos *Eco* RI e *Hind* III com tamanho inferior a 5 kb, com o *Dactylium dendroides* a análise foi feita a partir dos fragmentos inferiores a 7,2 e 5 kb (*Eco* RI e *Hind* III respectivamente). A análise comparativa dos perfis de restrição do DNA_{mt} da linhagem padrão do fungo produtor de galactose oxidase, GAO-01, com aqueles do fungo *Dactylium dendroides* mostrou uma grande heterogeneidade, isto se estende também ao fungo *Hypomyces rosellus* e às espécies de *Fusarium* utilizadas (figuras 2, 3, 6 e 7)

3.4 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO TOTAL DO DNA_{mt} ISOLADO

A estimativa para o tamanho do DNA mitocondrial das difentes linhagens foi feito através do somatório dos

fragmentos de restrição. Duas endonucleases foram utilizadas e os resultados estão apresentados nas tabelas 3, 4, 5 e 6. Os tamanhos dos DNAs mitocondriais calculados desta forma apresentaram valores próximos daqueles obtidos por eletroforese do DNA_{mt} intacto (figura 1), igual ou superior a 50 kb. No caso do *Dactylium dendroides* e GAO-03, os valores menores observados se deve ao fato de que nem todos os fragmentos puderam ser visualizados.

3.5 ANÁLISE COMPARATIVA DOS PADRÕES DE RESTRIÇÃO DOS DNAs MITOCONDRIAIS DO FUNGO PRODUTOR DE GALACTOSE OXIDASE COM O FUNGO *Dactylium dendroides*

Visando ampliar a análise comparativa entre o fungo GAO-01, citado na literatura como sendo um *Dactylium dendroides*, e a linhagem padrão do fungo *Dactylium dendroides* NRRL 2575, foram obtidos os perfis de restrição do DNA_{mt} dessas linhagens com outras endonucleases, *Xho* I, *Bgl* II e *Pst* I (figura 5).

O DNA_{mt} do *Dactylium dendroides* mostrou muitos sítios de reconhecimento para enzima *Xho* I resultando em perfil eletroforético difuso, sem bandas nítidas. O DNA_{mt} do fungo GAO-01 aparentemente não sofreu digestão por esta endonuclease demonstrando uma ausência de sítio de reconhecimento para esta enzima ou alguma contaminação do material que afetou sua atividade. O mesmo foi observado

para a enzima *Pst* I com o DNA_{mt} das duas linhagens. Uma nova reprecipitação e purificação do DNA com etanol na presença de acetato de amônio muitas vezes elimina possíveis contaminantes das preparações que inibem a atividade das endonucleases (17). Entretanto, mesmo com este tratamento o DNA_{mt} de ambos os fungos não foi clivado por *Xho* I e *Pst* I.

O tratamento com a endonuclease *Bgl* II, mostrou um comportamento diferente. O DNA_{mt} do fungo *Dactylium dendroides* apresentou digestão parcial mesmo após repurificação do DNA ou aumentando a quantidade de endonuclease. O do fungo produtor de galactose oxidase mostrou possuir mais de 10 sítios de clivagem e o perfil de restrição aparenta diversas bandas duplas.

3.6 CALCULO DA FREQUÊNCIA DE BANDAS COMIGRANTES ENTRE AS DIVERSAS LINHAGENS DE FUNGOS

A percentagem de bandas comigrantes bem como a proporção de bandas compartilhadas pelas diversas linhagens de fungos estudadas são mostradas nas tabelas 7 e 8.

A maior frequência de fragmentos comuns foi observado entre as linhagens GAO-01 e GAO-02, que mostraram um valor médio de 60% para o DNA_{mt} clivado com as enzimas *Eco* RI e *Hind* III. Correlacionando-se as linhagens GAO-01 e GAO-3 foi obtido uma frequência de 48% com *Hind* III, e 20% para a *Eco* RI. Entre o fungo GAO-02 e GAO-03 foi observado uma

frequência de 27% para a *Eco* RI e 47% para a *Hind* III.

A correlação entre o fungo GAO-01 e as demais linhagens mostrou uma frequência que variou de 0 a 25% para a *Eco* RI e de 11 a 39% para a *Hind* III. Estas linhagens quando correlacionadas entre si mostraram uma frequência que variou de 0 a 18% para a *Eco* RI e de 6 a 23% para a *Hind* III.

3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE GALACTOSE OXIDASE

O fungo GAO-01 e o *Polyporus circinatus* apresentaram atividade de galactose oxidase similares, 1,9 e 2,3 U/mg de peso seco respectivamente. As linhagens GAO-02 e 03 também apresentaram atividade enzimática, porém mais baixas, 0,53 e 0,12 U/mg de peso seco respectivamente. As demais linhagens não foram capazes de expressar atividade para esta enzima, nas condições experimentais empregadas (tabela 9).

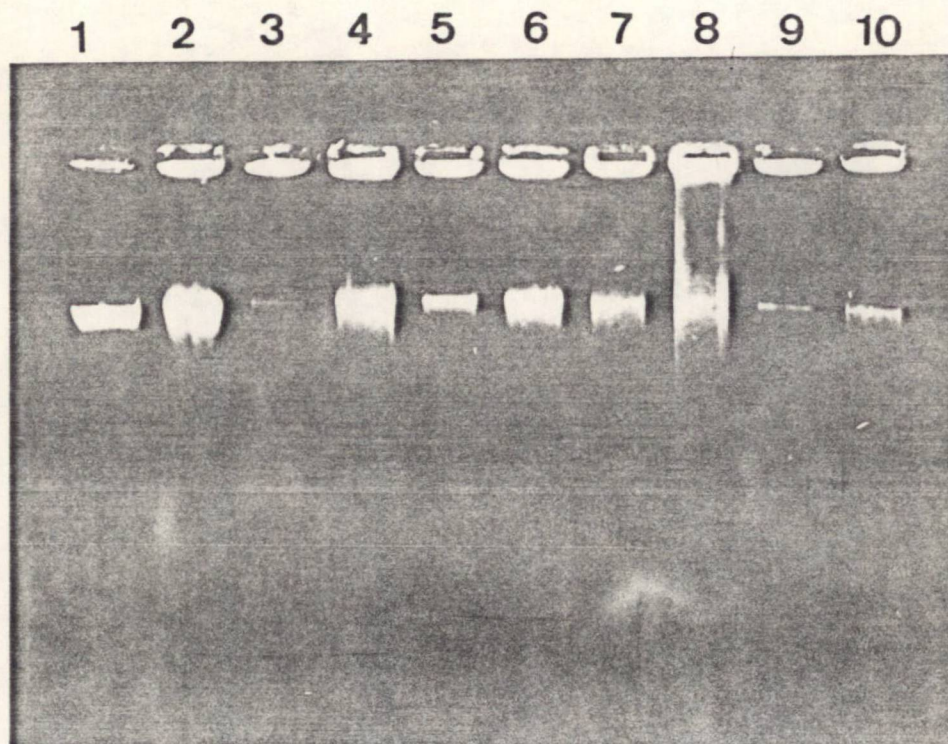


FIGURA 1 PERFIL ELETROFORÉTICO DE DNA_{mt}s ISOLADOS DE DIFERENTES LINHAGENS DE FUNGOS

O perfil eletroforético do DNA_{mt} intacto (3,0 à 9,4 μ g) foi determinado em gel de agarose a 0,8% conforme descrito em Materiais e Métodos.

- | | |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| 1. λ DNA (48,5 kb) | 6. GAO-03 |
| 2. GAO-01 | 7. <i>H. rosellus</i> ATCC 6676 |
| 3. <i>P. circinatus</i> NRRL 2903 | 8. <i>G. fujikuroi</i> NRRL 2248 |
| 4. <i>D. dendroides</i> NRRL 2575 | 9. <i>F. graminearum</i> R-7615 |
| 5. GAO-02 | 10. <i>F. tricinctum</i> T-578 |

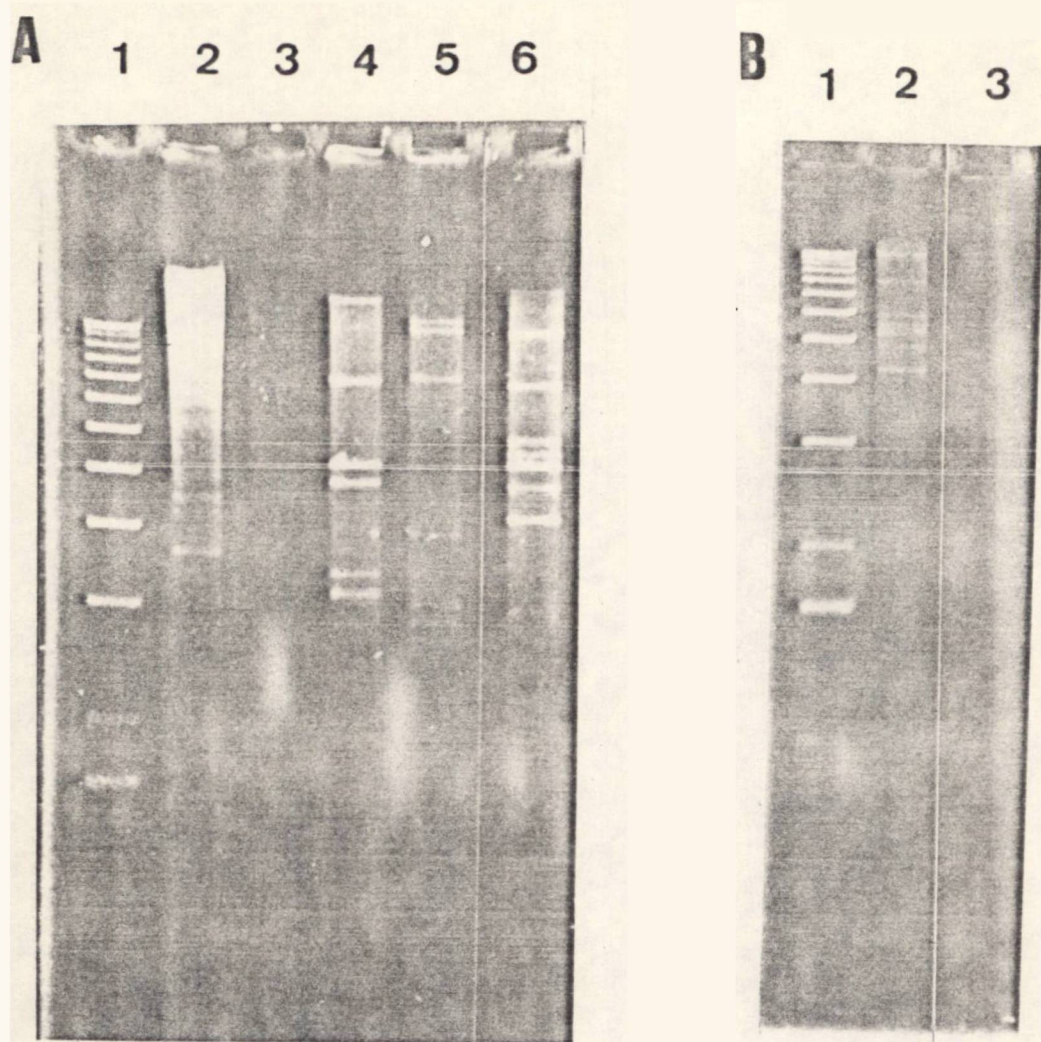


FIGURA 2 PERFIL ELETROFORÉTICO DE DNA_{mt}s DIGERIDOS COM *Eco* RI

O perfil eletroforético das amostras de DNA_{mt} digeridas com *Eco* RI foi determinado em gel de agarose a 1% conforme descrito em Materiais e Métodos.

(A) 1. Padrão 1 Kb Ladder

2. *D. dendroides* NRRL 2575

3. *H. rosellus* ATCC 6676

4. *G. fujikuroi* NRRL 2248

5. *F. tricinctum* t-578

6. GAO-01

(B) 1. Padrão 1 Kb Ladder

2. *P. circinatus* NRRL 2903

3. *F. graminearum* R-7615

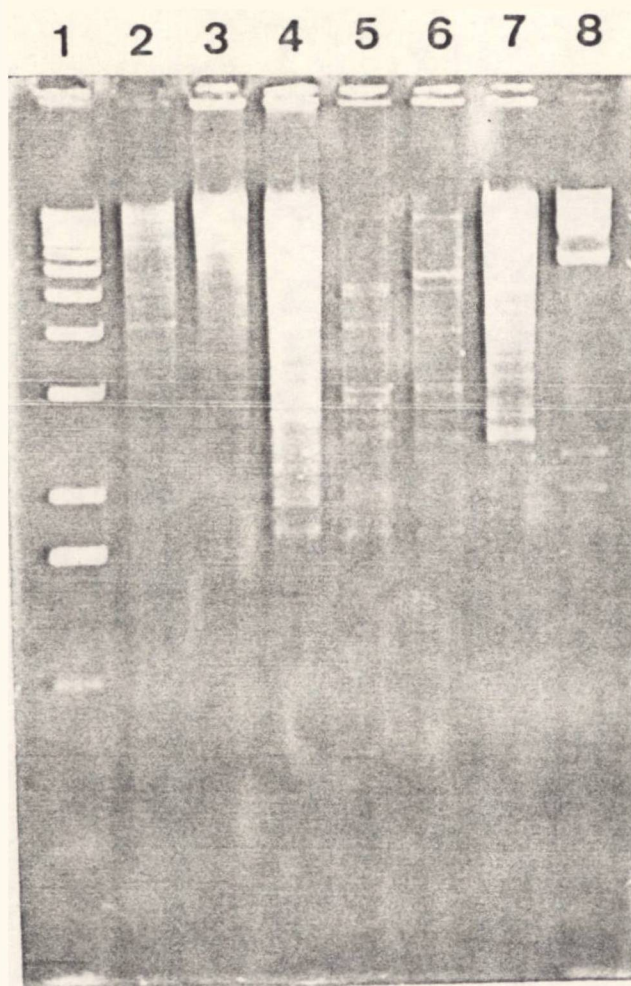


FIGURA 3 PERFIL ELETROFORÉTICO DE DNA_{mt}s DIGERIDOS COM *Hind* III

O perfil eletroforético das amostras de DNA_{mt} digeridas com *Hind* III foi determinado em gel de agarose a 1% conforme descrito em Materiais e Métodos.

- | | |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| 1. Padrão 1 Kb Ladder | 5. <i>F. graminearum</i> R-7615 |
| 2. GAO-01 | 6. <i>H. rosellus</i> ATCC 6676 |
| 3. <i>P. circinatus</i> NRRL 2903 | 7. <i>G. fujikuroi</i> NRRL 2248 |
| 4. <i>D. dendroides</i> NRRL 2575 | 8. <i>F. tricinctum</i> T-578 |

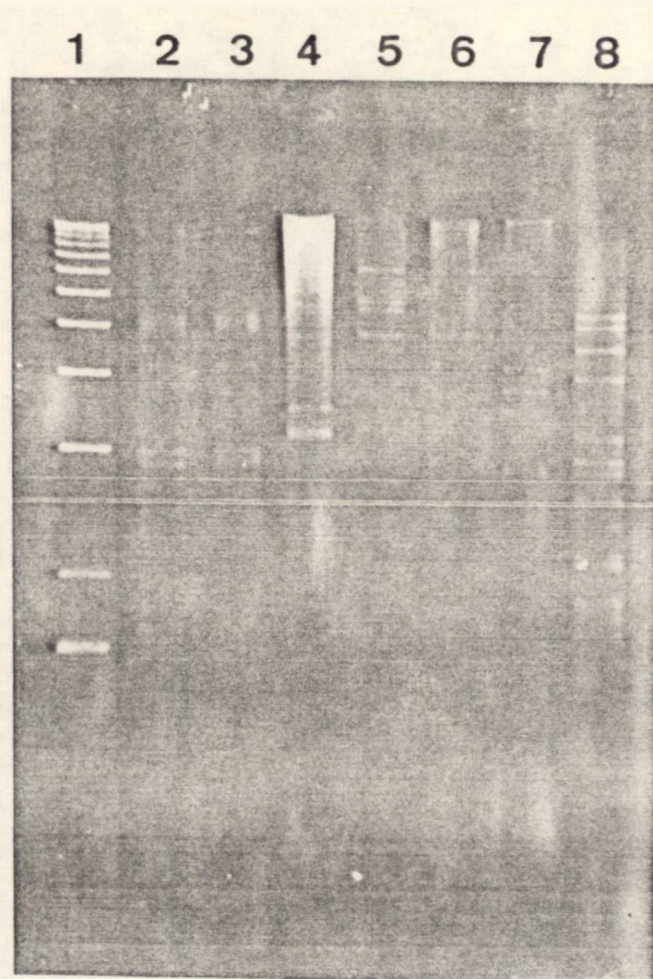


FIGURA 4 PERFIL ELETROFORÉTICO DOS DNA_{mt}s DO FUNGO PRODUTOR DE GALACTOSE OXIDASE (GAO-01) E DAS LINHAGENS GAO-02 E GAO-03 DIGERIDOS COM *Eco* RI E *Hind* III.

O perfil eletroforético das amostras de DNA_{mt} digeridas com *Eco* RI ou *Hind* III foi determinado em gel de agarose a 1% conforme descrito em Materiais e Métodos.

1. Padrão 1 Kb Ladder
2. GAO-01 tratado com *Eco* RI
3. GAO-02 tratado com *Eco* RI
4. GAO-03 tratado com *Eco* RI
5. GAO-01 tratado com *Hind* III
6. GAO-02 tratado com *Hind* III
7. GAO-03 tratado com *Hind* III
8. Padrão de λ -*Hind* III

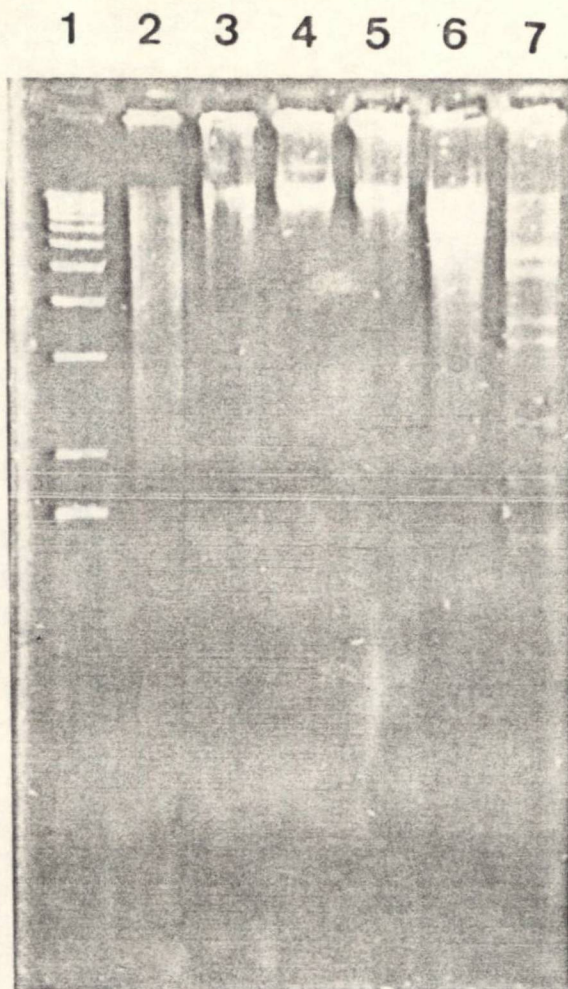


FIGURA 5 PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA_{mt} DA LINHAGEM GAO-01 E DE *Dactylium dendroides* NRRL 2575 DIGERIDOS COM *Bgl* II, *Xho* I E *Pst* I.

O perfil eletroforético das amostras digeridas com as respectivas endonucleases foram determinadas em gel de agarose à 1% conforme descrito em Materiais e Métodos.

1. Padrão 1 Kb Ladder
2. *D. dendroides* tratado com *Xho* I
3. GAO-01 tratado com *Xho* I
4. *D. dendroides* tratado com *Pst* I
5. GAO-01 tratado com *Pst* I
6. *D. dendroides* tratado com *Bgl* II
7. GAO-01 tratado com *Bgl* II

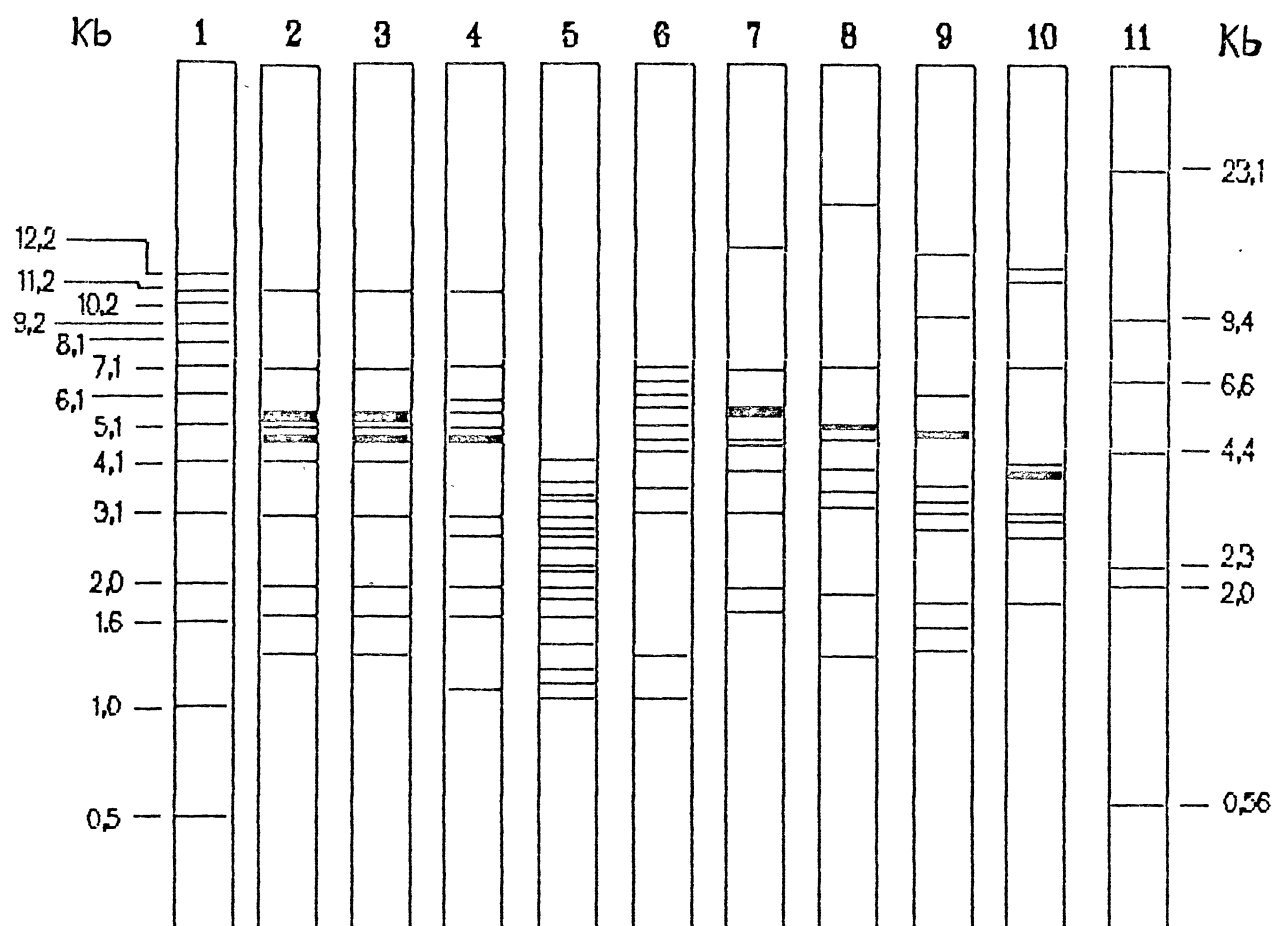


FIGURA 6 DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS DOS DNA_{mt}s DE DIFERENTES FUNGOS DIGERIDOS COM *Eco* RI.

O peso molecular dos fragmentos foi calculado conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.13).

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Padrão 1 Kb Ladder | 7. <i>H. rosellus</i> ATCC 6676 |
| 2. GAO-01 | 8. <i>G. fujikuroi</i> NRRL 2248 |
| 3. <i>P. circinatus</i> NRRL 2903 | 9. <i>F. graminearum</i> R-7615 |
| 4. GAO-02 | 10. <i>F. tricinctum</i> T-578 |
| 5. GAO-03 | 11. Padrão de λ -Hind III |
| 6. <i>D. dendroides</i> NRRL 2575 | |

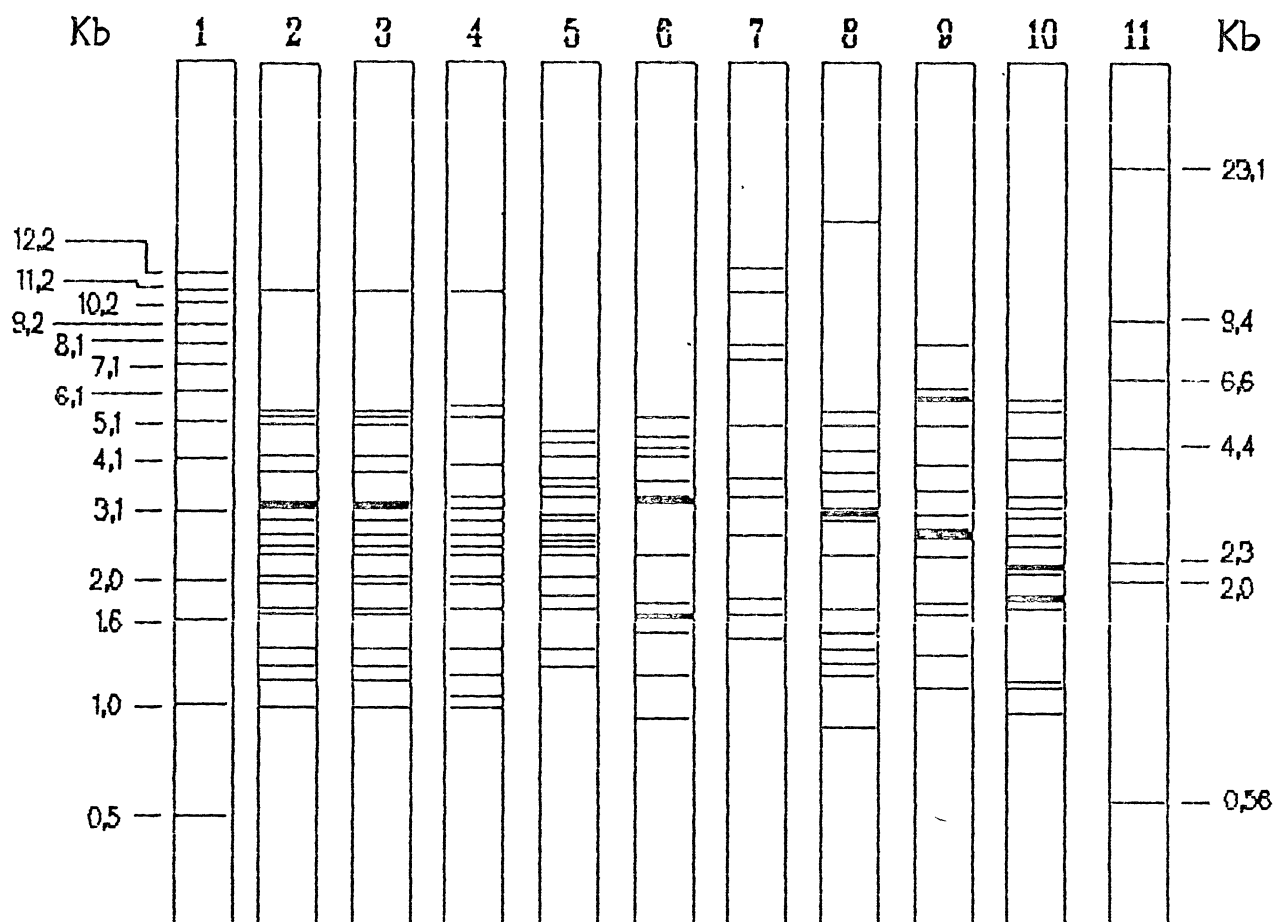


FIGURA 7 DIAGRAMA ESQUEMATICO DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS DOS DNA_{mt s} DE DIFERENTES FUNGOS DIGERIDOS COM *Hind* III.

O peso molecular dos fragmentos foi calculado conforme descrito em Materiais e Métodos (item 2.13).

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 1. Padrão 1 Kb Ladder | 7. <i>H. rosellus</i> ATCC 6676 |
| 2. GAO-01 | 8. <i>G. fujikuroi</i> NRRL 2248 |
| 3. <i>P. circinatus</i> NRRL 2903 | 9. <i>F. graminearum</i> R-7615 |
| 4. GAO-02 | 10. <i>F. tricinctum</i> T-578 |
| 5. GAO-03 | 11. Padrão de λ - <i>Hind</i> III |
| 6. <i>D. dendroides</i> NRRL 2575 | |

TABELA 2 RENDIMENTO E GRAU DE PUREZA DOS DNA_{mt} ISOLADOS DE DIFERENTES LINHAGES DE FUNGOS

LINHAGENS	MICÉLIO ^a (g)	DNA _{mt} ^b (μg)	PUREZA ^c DO ₂₆₀ /DO ₂₈₀
GAO-01	3,0	75	1,9
GAO-02	3,0	74	2,0
GAO-03	3,0	157	2,0
<i>P. circinatus</i>	3,0	175	2,0
<i>G. fujikuroi</i>	2,0	85	2,0
<i>F. graminearum</i>	3,0	119	2,0
<i>F. tricinctum</i>	3,0	135	2,0
<i>H. rosellus</i>	3,0	168	2,0
<i>D. dendroides</i>	4,0	196	2,0

^a Quantidade inicial de micélio úmido utilizado para o isolamento de DNA mitocondrial.

^b Massa total de DNA_{mt} obtido.

^c Grau de pureza do material genômico obtido.

TABELA 3 TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO *Eco* RI DE
DNA_{mt}s DE DIFERENTES FUNGOS

Fr.	*	D.	H.	G.	F.	F.
nº	GAO-01	<i>dendroides</i>	<i>rosellus</i>	<i>fugikuroi</i>	<i>graminearum</i>	<i>tricinctum</i>
1	11,1	7,2	14,5	19,0	14,0	13,0
2	7,1	6,6	7,1	7,2	9,6	12,0
3	5,5	6,1	5,5 ^{a, b}	5,0 ^{a, b}	6,1	7,2
4	5,2 ^{a, b}	5,7	5,4	4,7	4,9 ^{a, b}	4,1
5	5,0	5,1	4,7	4,0	3,65	3,9 ^{a, b}
6	4,6 ^{a, b}	4,7	4,5	3,5	3,3	3,1
7	4,1	4,4	3,9	3,2	3,1	2,95
8	3,0	3,55	3,1	1,95	2,8	2,7
9	2,0	3,1	2,0	1,35	1,85	1,85
10	1,7	1,35	1,75		1,6	
11	1,35	1,05			1,4	
Σ	60,5	49,3	56,9	54,9	57,2	54,7

O tamanho dos fragmentos foram determinados conforme item 2.13 de Materiais e Métodos.

^{a, b} referem-se a dois fragmentos que comigraram no gel.

* GAO 01 e *Polyporus circinatus* NRRL 2903

TABELA 4 TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO *Hind* III DE
DNA_{mt}s DE DIFERENTES FUNGOS

Fr. n:	* GAO-01	D. <i>dendroides</i>	H. <i>rosellus</i>	G. <i>fugikuroi</i>	F. <i>graminearum</i>	F. <i>tricinctum</i>
1	11,1	5,2	13,0	17,0	8,1	5,8
2	5,4	4,7	11,1	5,4	6,2	5,4
3	5,2	4,4	8,1	5,0	5,9 ^{a, b}	4,7
4	5,0	4,2	7,4	4,3	5,0	4,1
5	4,2	3,6	5,0	3,8	4,0	3,3
6	3,8	3,3 ^{a, b}	3,7	3,4	3,4	3,1
7	3,1 ^{a, b}	2,4	3,3	3,0 ^{a, b}	3,0	2,95
8	2,9	1,8	2,7	2,9	2,75 ^{a, b}	2,7
9	2,7	1,7 ^{a, b}	1,85	2,4	2,35	2,5
10	2,5	1,55	1,7	1,75	1,8	2,2 ^{a, b}
11	2,4	1,2	1,5	1,55	1,7	2,15
12	2,1	0,92		1,4	1,35	1,85 ^{a, b}
13	2,0			1,3	1,1	1,75
14	1,75			1,2		1,15
15	1,7			0,88		1,1
16	1,4					0,96
17	1,25					
18	1,15					
19	0,98					
Σ	63,7	40,0	59,4	58,2	55,3	49,8

O tamanho dos fragmentos foram determinados conforme item 2.13 de Materiais e Métodos.

^{a, b} referem-se a dois fragmentos que comigraram no gel.

* GAO 01 e *Polyporus circinatus* NRRL 2903

TABELA 5 TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO *Eco* RI DOS
DNA_{mt}s DAS LINHAGENS GAO-01, GAO-02 E GAO-03

Fr. nº	GAO-01 [*]	GAO-02	GAO-03
1	11,1	11,1	4,2
2	7,1	7,2	3,7
3	5,5	5,9	3,4
4	5,2 ^{a, b}	5,5	3,3
5	5,0	5,0	3,0
6	4,6 ^{a, b}	4,6 ^{a, b}	2,8
7	4,1	3,0	2,7
8	3,0	2,7	2,5
9	2,0	2,0	2,3
10	1,7	1,7	2,2
11	1,35	1,1	2,0
12			1,9
13			1,7
14			1,45
15			1,25
16			1,15
17			1,05
Σ	60,5	57,4	40,6

O tamanho dos fragmentos foram determinados conforme item 2.13 de Materiais e Métodos.

^{a, b} referem-se a dois fragmentos que comigraram no gel.

* GAO 01 e *Polyporus circinatus* NRRL 2903

TABELA 6 TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO *Hind* III DOS
DNA_{mt}s DAS LINHAGENS GAO-01, GAO-02 E GAO-03

Fr. n.º	GAO-01*	GAO-02	GAO-03
1	11,1	11,1	4,8
2	5,4	5,6	4,5
3	5,2	5,2	4,2
4	5,0	4,0	3,7
5	4,2	3,3	3,5
6	3,8	3,1	3,3
7	3,1 ^{a, b}	2,9	3,0
8	2,9	2,7	2,9
9	2,7	2,5	2,7
10	2,5	2,4	2,6
11	2,4	2,1	2,5
12	2,1	2,0	2,4
13	2,0	1,75	2,1
14	1,75	1,4	1,9
15	1,70	1,2	1,75
16	1,4	1,05	1,4
17	1,25	0,98	1,25
18	1,15		
19	0,98		
Σ	63,7	53,3	48,4

O tamanho dos fragmentos foram determinados conforme item 2.13 de Materiais e Métodos.

^{a, b} referem-se a dois fragmentos que comigraram no gel.

* GAO 01 e *Polyporus circinatus* NRRL 2903

TABELA 7 FREQUÊNCIA DE BANDAS COMIGRANTES DOS DNAs DE DIFERENTES LINHAGENS DE FUNGOS DIGERIDOS COM *Eco RI*

LINHAGEM ^a	G1	G2	G3	<i>Dd</i>	<i>Hr</i>	<i>Gf</i>	<i>Fg</i>	<i>Ft</i>
GAO-01		14/25	6/30	2/24	6/24	4/23	0/25	2/23
GAO-02	56		8/29	2/23	4/23	4/22	0/24	4/22
GAO-03	20	27		2/28	2/28	0/27	4/29	2/27
<i>D. dendroides</i>	8	8	7		4/22	4/21	4/23	4/21
<i>H. rosellus</i>	25	17	7	18		2/21	2/23	4/21
<i>G. fujikuroi</i>	17	18	0	19	9		0/22	2/20
<i>F. graminearum</i>	0	0	14	17	9	0		4/22
<i>F. tricinctum</i>	9	18	7	19	19	10	18	

Os valores na posição inferior da diagonal, na tabela correspondem a percentagem de bandas comigrantes e, os valores acima da diagonal à proporção de bandas compartilhadas ($2N_{xy}$) em relação ao número de bandas totais ($N_x + N_y$), de acordo com o item 2.14 de Materiais e Métodos.

^a As linhagens abreviadas correspondem respectivamente a: G1, GAO-01; G2, GAO-02; G3, GAO-03; *Dd*, *Dactylium dendroides*; *Hr*, *Hypomyces rosellus*; *Gf*, *Gibberella fujikuroi*; *Fg*, *Fusarium graminearum*; *Ft*, *Fusarium tricinctum*.

TABELA 8 FREQUÊNCIA DE BANDAS COMIGRANTES DOS DNAm_{ts} DE DIFERENTES LINHAGENS DE FUNGOS DIGERIDOS COM *Hind* III

LINHAGEM ^a	G1	G2	G3	<i>Dd</i>	<i>Hr</i>	<i>Gf</i>	<i>Fg</i>	<i>Ft</i>
GAO-01		24/37	18/37	8/34	8/31	14/36	4/35	12/38
GAO-02	64		16/34	8/31	6/28	8/33	2/32	8/35
GAO-03	48	47		6/31	6/28	10/33	2/32	8/35
<i>D. dendroides</i>	23	25	19		4/25	4/30	4/29	4/32
<i>H. rosellus</i>	25	21	21	16		2/27	6/26	6/29
<i>G. fujikuroi</i>	39	24	30	13	7		6/31	4/34
<i>F. graminearum</i>	11	6	6	14	23	19		2/33
<i>F. tricinctum</i>	31	23	23	12	21	12	6	

Os valores na posição inferior da diagonal, na tabela correspondem a percentagem de bandas comigrantes e, os valores acima da diagonal à proporção de bandas compartilhadas ($2N_{xy}$) em relação ao número de bandas totais ($N_x + N_y$), de acordo com o item 2.14 de Materiais e Métodos.

^a As linhagens abreviadas correspondem respectivamente a: G1, GAO-01; G2, GAO-02; G3, GAO-03; *Dd*, *Dactylium dendroides*; *Hr*, *Hypomyces rosellus*; *Gf*, *Gibberella fujikuroi*; *Fg*, *Fusarium graminearum*; *Ft*, *Fusarium tricinctum*.

TABELA 9 NÍVEIS DE GALACTOSE OXIDASE EXTRACELULAR EM
DIFERENTES FUNGOS FILAMENTOSOS

LINHAGENS	ATIVIDADE ENZIMÁTICA ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ formada. min^{-1} .mg peso seco $^{-1}$)
GAO-01	1,9
GAO-02	0,53
GAO-03	0,12
<i>P. circinatus</i> NRRL 2903	2,30
<i>G. fujikuroi</i> NRRL 2248	0
<i>F. graminearum</i> R-7615	0
<i>F. tricinctum</i> T-578	0
<i>H. rosellus</i> ATCC 6676	0
<i>D. dendroides</i> NRRL 2575	0

A atividade da galactose oxidase foi determinada conforme método descrito em Materiais e Métodos, item 2.4.

4 DISCUSSÃO

A dificuldade no isolamento de DNA de fungos filamentosos causado por nucleases fúngicas, polissacarídeos e pigmentos tem levado ao desenvolvimento de técnicas dispendiosas com consumo grande de tempo envolvendo ultracentrifugação (21, 52), ou cromatografia em coluna (50).

Para o isolamento do DNA mitocondrial foi utilizada a técnica descrita por Defontaine *et al.* (14), modificada na etapa de obtenção de protoplastos. A técnica original inclui obtenção de esferoplastos de levedura seguido de lise osmótica. Nas condições desenvolvidas pela técnica, não foi possível obter protoplastos das linhagens de fungos estudados. Por esta razão foi necessário empregar a técnica estabelecida por Amaral *et al.* (4) para a produção de protoplastos a partir do fungo produtor de galactose oxidase, GAO-01, considerado pelos autores como sendo *Dactylium dendroides*.

Amaral *et al.* (4) estudaram os fatores que influenciam a obtenção de protoplastos a partir do fungo GAO-01. Entre esses fatores, devem ser levados em conta as condições de crescimento do fungo, o uso de $MgSO_4$ como estabilizador osmótico e o pH da solução para a liberação de protoplastos que deve ficar em torno de 5.6.

Para o isolamento do genoma mitocondrial, as diferentes linhagens foram cultivadas por 15 h. Este período foi escolhido com base nos resultados de Amaral *et al.* (4) que trabalhando com o fungo GAO-01, obtinham liberação máxima de protoplastos com culturas desta idade. A idade do micélio afeta acentuadamente a produção de protoplastos, decaindo sensivelmente quando o crescimento micelial foi superior à 24 h. Peberdy (47) sugeriu que este fato ocorre porque as células jovens e velhas possuem diferenças de composição e estrutura da parede celular.

Utilizando esta técnica foi possível reproduzir a obtenção de protoplastos tanto para fungo produtor de galactose oxidase como para as outras linhagens. O bom rendimento de protoplastos permitiu o isolamento do DNA_{mt} das diversas linhagens de fungo, em quantidade e grau de pureza semelhantes as obtidas por Defontaine *et al.* (14), que obteve um rendimento de 50 µg de DNA_{mt}/g de micélio úmido.

Garder & Yoder (22) utilizando-se a técnica de ultracentrifugação por gradiente de cloreto de céσιο/bisbenzimidida para o isolamento do DNA mitocondrial do fungo filamentosso *Cochliobolus heterostrophus* obtiveram um rendimento de 0,7 µg de DNA_{mt}/g de micélio úmido. Utilizando a mesma técnica Specht *et al.* (52) conseguiu apenas 0,5 µg de DNA_{mt}/100 g de micélio úmido.

Na técnica de isolamento de DNA_{mt} por gradiente de cloreto de céσιο/bisbenzimidida, as frações de DNA nuclear e mitocondrial ficam nitidamente separadas, porém esta técnica

é muito dispendiosa e de baixo rendimento. A técnica estabelecida por Defontaine *et al.* (14) e aqui modificada, é eficiente. Entretanto, não se descarta a possibilidade de contaminação do DNA mitocondrial isolado com DNA cromosomal. O DNA_{mt} assim obtido foi utilizado para análise estrutural comparativa entre as diversas linhagens de fungos filamentosos potencialmente produtores de galactose oxidase.

Análises comparativas mostraram que o DNA_{mt} isolado da cepa NRRL 2903 de *Polyporus circinatus* e cepa GAO-01 apresentam o mesmo perfil de restrição, por este motivo nas tabelas 3 e 4 não foram colocados os valores para a cepa de *Polyporus circinatus* NRRL 2903. O fungo GAO-01, isolado em Curitiba em 1955, foi originalmente classificado como *Polyporus circinatus* e depositado no Northern Regional Research Laboratory, USA, sob número NRRL 2903. Portanto, este resultado mostra que: 1) a técnica utilizada para o isolamento do DNA mitocondrial é reprodutível; e 2) que o DNA mitocondrial deste fungo mantido em laboratórios distintos por 38 anos, apresenta alta estabilidade. Embora o DNA mitocondrial de *Neurospora intermedia* possa evoluir rapidamente quando este é continuamente transferido na forma de conídios em laboratório, o mesmo não ocorre quando a transferência é feita na forma de hifas (6, 24, 48). O fato das cepas GAO-01 e *Polyporus circinatus* NRRL 2903 (GAO-01) não apresentar a forma conidial em laboratório, pode ter contribuído para a estabilidade observada deste DNA mitocondrial. As diferenças encontradas nos perfis de restrição do DNA_{mt} das linhagens GAO-02 e GAO-03 quando

comparados àquele do fungo GAO-01, sugere que na natureza, este fungo pode ter encontrado um meio propício para o desenvolvimento de forma conidial, permitindo uma evolução mais rápida. Os resultados da análise estrutural dos DNAs das linhagens GAO-01, GAO-02 e GAO-03 sugerem tratar-se de variedades da mesma espécie, sendo a linhagem GAO-02 a mais próxima da GAO-01.

Os perfis de restrição da cepa NRRL 2575 de *Dactylium dendroides* são bastante heterogêneos em relação à cepa GAO-01 e corrobora os dados sobre distinção imunológica (33) e diferenças de composição na parede celular destes fungos (34). Além disso, não foi observado atividade de galactose oxidase desta cepa de *Dactylium dendroides*, mesmo sendo crescido em meio contendo L-sorbose a 1%. A L-sorbose é um agente surfactante que parece induzir alterações estruturais na parede celular de *Neurospora crassa* (56), como também foi verificado que a L-sorbose é capaz de aumentar a secreção da galactose oxidase para o meio de cultura em *Polyporus circinatus* NRRL 2903 (38) e no fungo GAO-01 (Dr. Glaci T. Zancan, comunicação pessoal). A ausência de atividade desta enzima na linhagem de *Dactylium dendroides* confirma os dados anteriormente obtidos por Lockwood (3). Assim os estudos estruturais, imunológicos e fisiológicos (31, 32) bem como os resultados de análise do DNA apresentados neste trabalho, sustentam que o fungo produtor de galactose oxidase, GAO-01, é uma espécie distinta do *Dactylium dendroides*.

Embora as análises sorológicas demonstrem alguma

similaridade entre os fungos *Hypomyces rosellus* ATCC 6676 e *Gibberella fujikuroi* NRRL 2284 com o fungo GAO-01 (33), estas mesmas linhagens mostraram alta heterogeneidade a nível de DNA_{mt}. Além disso, como o *Dactylium dendroides*, também não apresentaram atividade de galactose oxidase extracelular nas condições experimentais empregadas. A linhagem de *Gibberella fujikuroi* estudada não apresentou atividade de galactose oxidase embora tenha sido relatado uma linhagem produtora isolada no Japão (1). Esta divergência pode ser devido à existência de diferenças intraespécie em linhagens de *Gibberella fujikuroi* isoladas em diferentes regiões geográficas, conforme foi observado em outros fungos (7, 28, 34).

Como as linhagens anteriores, as do gênero *Fusarium*, *F. graminearum* R-7615 e *F. tricinctum* T-578, também apresentaram um padrão de restrição de DNA_{mt} distinto daquele mostrado pela linhagem GAO-01 com frequência de comigração menor que 35%. Gancedo *et al.* (21), Buglova *et al.* (8) e Dias & Kemmelmeier (16) observaram a secreção da galactose oxidase por linhagens de *Fusarium graminearum*. No entanto a linhagem R-7615 utilizada aqui não apresentou atividade de galactose oxidase e mostrou o perfil de restrição do DNA_{mt} com baixa homologia, o que permite descartar a hipótese do fungo GAO-01 se tratar de uma das linhagem de *Fusarium* analisadas.

As análises bioquímicas de parede celular (32) e imunológicas dos determinantes antigênicos miceliais (33) anteriormente realizadas, bem como o estudo comparativo do

perfil de restrição dos DNAs de diferentes espécies fúngicas descritas como produtoras de galactose oxidase, mostraram que a cepa GAO-01, isolado em Curitiba em 1955, erroneamente classificada como *Polyporus circinatus* ou como *Dactylium dendroides* é na verdade uma espécie distinta. Contudo, os dados taxonômicos até o momento obtidos da análise destes microrganismos não permitem classificá-lo dentro dos gêneros e espécies fúngicas já descritas, mas por outro lado suportam sua individualidade.

CONCLUSÕES

1. Análises de restrição de DNAs mitocondriais mostraram que o fungo produtor de galactose oxidase GAO-01 apresentou perfil de restrição distinto dos fungos *Dactylium dendroides* NRRL 2575, *Hypomyces rosellus* ATCC 6676, *Gibberella fujikuroi* NRRL 2248, *Fusarium graminearum* R-7615 e *Fusarium tricinctum* T-578.
2. A linhagem GAO-02 mostrou um perfil de restrição semelhante ao da linhagem GAO-01, enquanto que a linhagem GAO-03 apresentou um perfil distinto.
3. Somente as linhagens GAO-01, GAO-02, GAO-03 e *Polyporus circinatus* NRRL 2903 apresentaram atividade de galactose oxidase extracelular quando crescidos em meio contendo L-sorbose.
4. A metodologia empregada para o isolamento de DNA mitocondrial mostrou ser uma técnica simples, rápida e fornece material de boa qualidade para as análises de restrição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 AISAHA, K.; TERADA, O. Production of galactose oxidase by *Gibberella fujikuroi*. Agric. Biol. Chem., Tokyo, v.45, p.2311-2316, 1981.
- 02 AMARAL, D; BERNSTEIN, L.; MORSE, D.; HORECKER, B.L.. Galactose oxidase of *Polyporus circinatus*: a copper enzyme. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 238, p.2281-2284, 1963.
- 03 AMARAL, D; FALCOZ, F.K; HORECKER, B.L. Galactose oxidase of *Polyporus circinatus*. Methods. Enzymol., San Diego, v.9, p.87-92, 1966.
- 04 AMARAL, D; KUBISCKI, D; TEREZI, H.F. Release of protoplasts from the galactose oxidase producing mold, *Dactylium dendroides*. Can. J. Microbiol., Ottawa, v. 29, n.7, p. 763-766, 1983.
- 05 AVISE, J.C.; LANDSMAN, R.A. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animal. In: NEI, M.; KEOHN, R.K. (eds.). Evolution of Genes and Proteins. Sunderland: Sinauer, 1983, p.147-164.

- 06 BERTRAND, H.; CHAN, B.S.; GRIFFITHS, A.J. Insertion of a foreign nucleotide sequence into mitochondrial DNA causes senescence in *Neurospora intermedia*. Cell, Cambridge, v.41, p. 877-884, 1985.
- 07 BRUNS, T.; WHITE, T.; TAYLOR, J. Fungal molecular systematics. Annu. Rev. Ecol. Syst., Palo Alto, v.22, p.525-564, 1991.
- 08 BUGLOVA, T.T.; KIRILENKO, T.S.; ZAKHORA, Y.I.; YUNITSKAYA, V.A. Description of *Fusarium graminearum* IMV 1060 a producer of galactose oxidase. Mikol. Fitopatol., v.16, p.503-508, 1982.
- 09 CANN, R.L.; WILSON, A.C. Length mutations in human mitochondrial DNA. Genetics, Baltimore, v.104, p.699-711, 1983.
- 10 CHESTERS, C.G.C. Morphology as a taxonomic criterion. In: THE FUNGI, New York: Academic press, 1968, v.3, p.517-542.
- 11 CLARK-WALKER, G.D.; SRIPRAKASH, K.S. Sequence rearrangements between mitochondrial DNAs of *Torulopsis glabrata* and *Kloeckera africana* identified by hybridization with six polypeptide encoding regions from *Sacharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA. J. Mol. Biol., London, v.151, p.367-387, 1981.

- 12 COOPER, J.A.D.; SMITH, W.; BACILA, M.; MEDINA, H.
Galactose oxidase from *Polyporus circinatus*, Fr. J. Biol. Chem., Baltimore, v.234, p.445-448, 1958.
- 13 COTOLINI, C.; HUGUES, K.W.; PETERSEN, R.H..
Characterization of the mitochondrial genome of *Clavicornia pyxicata*. Mycologia, New York, v.84, p.517-521, 1992.
- 14 DEFONTAINE, D.; LECOCQ, F.M.; HALLET, J.N. A rapid miniprep method for the preparatin of yeast mitochondrial DNA. Nucleic Acids Res., Oxom, v.19, p.185, 1991.
- 15 D-GALACTOSE. In: METABOLITES 1: Carbohydrates. Florida: Verlag Chemie, 1984. p. 281-296. (Methods of Enzymatic Analysis, v.6)
- 16 DIAS, D.; KEMMELMEIER, C. Ocorrência da galactose oxidase em *Fusarium graminearum*. Rev. Microbiol., São Paulo, v.18, p.276-278, 1987.
- 17 DNA precipitation in the presence of ammonium acetate. FOCUS, Gaithersburg, v.4, n.3, p.12, 1982.
- 18 DUNN, G.; EVERITT, B.S. An introduction to mathematical taxonomy. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1982.

- 19 ETTINGER, M.; KOSMAN, D. J. Chemical and catalytic properties of galactose oxidase. Met. Iows. Biol., v.3, p.219-261 1981.
- 20 FORTER, H.; OUDEMANS, P.; COFFEY, M. Mitochondrial and nuclear DNA diversity within six species of *Phytophthora*. Exp. Mycol., Duluth, v.14, p.18-31, 1990.
- 21 GANCEDO, J.M.; GANCEDO, C.; ASENSIO, C. Widespread occurrence of galactose oxidase and glucose oxidase in fungi. Arch. Biochem. Biophys., Duluth, v.266, p.588-590, 1967.
- 22 GARDER, R.; YODER, O.C. Isolation of DNA from filamentous fungi and separation into nuclear, mitochondrial, ribosomal and plasmid components. Anal. Biochem., Duluth, v.135, p.416-422, 1983.
- 23 GARDER, R.; YODER, O.C. Mitochondrial DNA of the filamentous ascomycete *Cochliobolus heterostrophus*. Curr. Genet., Heidelberg, v.8, p.621-628, 1984.
- 24 GRIFFITHS, A.J.F; BERTRAND, H. Unstable cytoplasm in hawaiian strains of *Neurospora intermedia*. Curr. Genet., Heidelberg, v.8, p. 387-398, 1984.

- 25 HAWKSWORTH, D.L.; SUTTON, B.C.; AINSWORTH, G.C.
Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 7ed. Kew:
Commonwealth Mycological Inst., 1983. 445p.
- 26 HINTZ, W.E.; MOHAN, M.; ANDERSON, J.B.; HORGAN, P.A..
The mitochondrial DNAs of *Agaricus*: heterogeneity in
A. bitorquis and homogeneity in *A. brunnescens*. Curr.
Genet., Heidelberg, v.9, p.127-132, 1985.
- 27 ITO, N.; PHILLIPS, S.E.V.; STEVENS, C.; OGEL, Z.B.;
McPHERSON, M.J.; KEEN, J.N.; YADAV, K.D.S.; KNOWLES,
P.F. Novel thioether bond revealed by a 1,7 - a
crystal structure of galactose oxidase. Nature (Lond),
London, v.350, n.6315, p.87-90, 1991.
- 28 JACOBSON, D.J.; GORDON, T.R. Variability of
mitochondrial DNA as an indicator of relationships
between populations of *Fusarium oxysporum* f. sp.
melonis. Mycol. Res., Cambridge, v.6, p.734-744, 1990.
- 29 KAWANO, S.; SUZUKI, T.; KUROIWA, T. Structural
homogeneity of mitochondrial DNA in the mitochondrial
nucleoid of *Physarum polycephalum*. Biochim. Biophys.
Acta, Amsterdam, v.696, p.290-298, 1982.
- 30 KEMMELMEIER, C.; ZANCAN, G. Taxonomy of galactose
oxidase producer fungi strain. Arq. Biol. Tecnol.
(Curitiba), v.19, p.25-30, 1976.

- 31 KEMMELMEIER, C.; ZANCAN, G. Studies on the taxonomy of a mold producing galactose oxidase II. Arq. Biol. Tecnol. (Curitiba), v.21, p.75-85, 1978.
- 32 KEMMELMEIER, C.; ZANCAN, G. Chemical and immunological properties of galactoglucomanans from *Dactylium dendroides*. Exp. Mycol., Duluth, v.5, p.339-348, 1981.
- 33 KEMMELMEIER, C.; ZANCAN, G. Serological differentiation of the galactose oxidase producer mold from *Dactylium dendroides*. Arq. Biol. Tecnol. (Curitiba), v.26, p.403-408, 1983.
- 34 KOHN, L.M. Developing new characters for fungal systematics: an experimental approach for determining the rank of revolution. Mycologia, New York, v.84, n.2, p.139-152, 1992.
- 35 KOZLOWSKI, M.; STEPIEN, P.P. Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of members of the genus *Aspergillus* as an aid in taxonomy. J. Gen. Microbiol., Reading, v.128, p.471-476, 1982.
- 36 MANNELLA, C.A.; PITTENGER, T.H., LAMBOWITZ, A.M. Transmission of mitochondrial deoxyribonucleic acid in *Neurospora crassa* sexual crosses. J. Bacteriol., Washington, v.137, p.1449-1451, 1979.

- 37 MANTLE, P.G. Secondary metabolites of *Penicillium* and *Acremonium*. In: PENICILLIUM AND ACREMONIUM BIOTECHNOLOGY HANDBOOK, New York: Plenum Press, 1987, v.1, p.161-243.
- 38 MARKUS, Z.; MILLER, G.; AVIGAD, G. Effect of culture conditions on the production of D-galactose oxidase by *Dactylium dendroides*. Appl. Microbiol., Washington, v.13, p.686-693, 1965.
- 39 MARTIN, F.N. Taxonomic classification of asexual isolates of *Pythium ultimum* based on cultural characteristics and mitochondrial DNA restriction patterns. Exp. Mycol., Duluth, v.14, p.47-56, 1990.
- 40 MARTIN, F.N.; KISTLER, H.C. Species-specific banding patterns of restriction endonuclease digested mitochondrial DNA from the genus *Pythium*. Exp. Mycol., Duluth, v.14, p.32-46, 1990.
- 41 MATHERSON, N.K.; MCCLEARY, B.V. Enzymes metabolizing polysaccharides and their application to the analysis of structure and function of glycans. In: THE POLYSACCHARIDES. Orlando: Academic Press, 1985. (Molecular Biology: an international series of monographs and textbooks, v.3).

- 42 McPHERSON, M. J.; OGEL, Z.B.; STEVENS, C.; YADAV, K.D.S.; KEEN, J.N.; KNOWLES, P.F. Galactose oxidase of *Dactylium dendroides*. J. Biol. Chem., Baltimore, v.267, n.12, p.8146-8152, 1992.
- 43 MENDONÇA, M.; ZANCAN, G. Purification and characterization of intracellular galactose oxidase from *Dactylium dendroides*. Arch. Biochem. Biophys., Duluth, v.252, n.2, p.507-514, 1987.
- 44 MENDONÇA, M.; ZANCAN, G. Intra-extracellular forms of ethanol modified o-underglycosylated galactose oxidase. Arch. Biochem. Biophys., Duluth, v.275, n.1, p.130-139, 1989.
- 45 NEI, M.; LI, W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v.76, p.5269-5273, 1979.
- 46 NOBLES, M.K.; MADHOSINGH, C. *Dactylium dendroides* (Bull) Fr. misnamed as *Polyporus circinatus* Fr. Biochem. Biophys. Res. Commun., Duluth, v.12, p.146-147, 1963.
- 47 PEBERDY, J.F. Fungal protoplasts. Isolation reversion and fusion. Annu. Rev. Microbiol., Palo Alto, v.33, p.21-39, 1979.

- 48 RIECK, A.; GRIFFITHS, A.J.F.; BERTRAND, H. Mitochondrial variants of *Neurospora intermedia* from nature. Can. J. Genet. Cytol., Ottawa, v.24, p.741-759, 1982.
- 49 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. 3 volumes New York: Cold Harbor Laboratory, 1989.
- 50 SAUNDERS, J.P.M.; HEYTING, C.; VERBEET, M.P.; MEIJLINK, F.C.P.W.; BORST, P. The organization of genes in yeast mitochondrial DNA. III. Comparison of the physical maps of the mitochondrial DNAs from three wild-type *Saccharomyces* strains. Mol. Gen. Genet., Berlin, v.157, p.239-261, 1977.
- 51 SEKIGUCHI, J.; OHSAKI, T.; YAMAMOTO, H.; KOICHI, K.; SHIDA, T. Characterization and comparison of mitochondrial DNAs and rRNAs from *Penicillium urticae* and *Penicillium chrysogenum*. J. Gen. Microbiol., Reading, v.136, p.535-543, 1990.
- 52 SPECHT, A.; NOVOTNY, C.P.; ULLRICH, R.C. Isolation and characterization of mitochondrial DNA from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. Exp. Mycol., Duluth, v.7, p.336-343, 1983.

- 53 TAYLOR, J.W. Fungal evolutionary biology and mitochondrial DNA. Exp. Mycol., Duluth, v.10, p.259-269, 1986.
- 54 TAYLOR, J.W.; SMOLICH, B.D. Molecular cloning and physical mapping of the *Neurospora crassa* 74-OR23-1A mitochondrial genome. Curr. Genet., Heidelberg, v.9, p.597-603, 1985.
- 55 TAYLOR, J.W.; SMOLICH, B.D.; MAY, G. Evolution and mitochondrial DNA in *Neurospora crassa*. Evolution, Lawrence, v.40, p.716-739, 1986.
- 56 TERRA, N.; TATUM, E.L. Colonial growth of *Neurospora crassa*. Science (Washington, DC), v.134, n.3485, p.1066-1068, 1961.
- 57 TYPAS, M.A.; GRIFFEN, A.M.; BAINBRIDGE, B.W.; HEALE, J.B. Restriction fragments length polymorphisms in mitochondrial DNA and ribosomal RNA gene complexes as an aid to the characterization of species and sub-species populations in the genus *Verticillium*. FEMS Microbiol. Lett., Amsterdam, v.95, p.157-162, 1992.
- 58 UPHOLT, W.B. Estimation of DNA divergence from comparison of restriction endonuclease digests. Nucleic Acids Res., Oxom, v.4, p.1257-1265, 1977.

- 59 VARMA, A.; KWON-CHUNG, K.J. Restriction fragment polymorphism in mitochondrial DNA of *Cryptococcus neoformans*. J. Gen. Microbiol., Reading, v.135, p.3353-3362, 1989.
- 60 VIENNOT-BOURGIN, G. Les champignons parasites des plantes cultivées. Paris: Masson & Cia, 1949, p.335-336.
- 61 VINCENT, R.; GOEWERT, R.; GOLDMAN, W.E.; KOBAYASHI, G.S.; LAMBOWITZ, A.M.; MEDOFF, G. Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragments polymorphisms. J. Bacteriol., Washington, v.165, n.3, p.813-818, 1986.
- 62 WESOLOWSKI, M.; FUKUHARA, H. Linear mitochondrial deoxyribonucleic acid from the yeast *Hansenula mrakii*. Mol. Cell. Biol., v.1, p.387-393, 1981.
- 63 WILLS, J.W.; LASKER, B.A.; SIROTKIN, K.; RIGGSBY, W.S. Repetitive DNA of *Candida albicans*: nuclear and mitochondrial components. J. Bacteriol., Washington, v.157, p.918- 924, 1984.
- 64 WILLS, J.W.; TROUTMAN, B.; RIGGSBY, W.S. Circular mitochondrial genome of *Candida albicans* contains a large inverted duplication. J. Bacteriol., Washington, v.164, n.1, p.7-13, 1985.