

OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS DE *Botryosphaeria* sp.

ISOLATION OF *Botryosphaeria* sp. PROTOPLASTS

Carlos Eduardo Marchi¹, Mírian de Freitas Borges², Sérgio Hermínio Brommonscheke³

¹ Autor para contato: Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil;
fax: (67) 3368-2150; e-mail: cemarchi@cnpqg.embrapa.br

² Superintendência Federal de Agricultura-MS, Campo Grande, MS

³ Universidade Federal de Viçosa - UFV, Departamento de Fitopatologia, Viçosa, MG

Recebido para publicação em 06/09/2006

Aceito para publicação em 20/12/2006

RESUMO

A protoplastização constitui ferramenta importante no estudo de fungos filamentosos. Acredita-se que a obtenção de protoplastos de *Botryosphaeria* spp., ascomicetos causadores de cancro em *Eucalyptus* spp., possa constituir caminho para aumentar o conhecimento sobre esses patógenos. Por isso, visando a obtenção de protoplastos de *Botryosphaeria* sp., avaliou-se a eficiência dos seguintes sistemas líticos: *Glucanex* (Novo Nordisk Ltd.), *Lysing Enzymes* (Sigma Chemicals Co.), *Cellulase Onozuka R-10* (Yakult Biochemical Co. Ltd.), *Cellulase* (Sigma Chemicals Co.), *Driselase* (Sigma Chemicals Co.), *Glucanex + Cellulase Onozuka R10*, *Lysing Enzymes + Cellulase Onozuka R10*, *Driselase + Cellulase Onozuka R10* e *Lysing Enzymes + Glucanex*. Detectado o sistema lítico mais eficiente, avaliaram-se diferentes concentrações de enzimas. Adicionalmente, foram analisados estabilizadores osmóticos à base de MgSO₄, KCl, NaCl, Sorbitol e Sacarose, bem como tempos de protoplastização (1 a 6 horas). Maior produção de protoplastos foi obtida com o uso simultâneo de *Glucanex* e *Lysing Enzymes*. O uso de 7,5 mg de cada complexo enzimático, em 3,5 mL de estabilizador osmótico, resultou em maior liberação de protoplastos. O melhor estabilizador osmótico foi MgSO₄ a 1,2 M / NaH₂PO₄ a 0,01 M (pH = 5,8). A produção de protoplastos foi monitorada a cada 60 minutos, e foi maior com incubação por 4 horas. Os protoplastos obtidos foram aptos a regenerar e reverter à forma hifálica quando plaqueados em meio de regeneração.

Palavras-chave: protoplastização, cancro, *Eucalyptus* sp.

ABSTRACT

Protoplasts are important biological tools in the research of filamentous fungi. The isolation of *Botryosphaeria* spp. protoplasts, etiological agents of canker in *Eucalyptus* spp., may be a way to understand these pathogens. Thus, in order to obtain *Botryosphaeria* sp. protoplasts, we evaluated the efficiency of the lytic systems *Glucanex* (Novo Nordisk Ltd.), *Lysing Enzymes* (Sigma Chemicals Co.), *Cellulase Onozuka R-10* (Yakult Biochemical Co. Ltd.), *Cellulase* (Sigma Chemicals Co.), *Driselase* (Sigma Chemicals Co.), *Glucanex + Cellulase Onozuka R10*, *Lysing Enzymes + Cellulase Onozuka R10*, *Driselase + Cellulase Onozuka R10* and *Lysing Enzymes + Glucanex*. When the most efficient lytic system had been detected different concentrations of enzymes were analyzed. Additionally, osmotic buffers of MgSO₄, KCl, NaCl, Sorbitol and Sucrose were analysed and their digestion time (1 to 6 hours) was established. The highest production of protoplasts was obtained when *Glucanex* and *Lysing Enzymes* were used simultaneously. The best protoplast yields were obtained with 7.5 mg of each enzyme in 3.5 mL of the buffer. The best osmotic buffer was MgSO₄ at 1.2 M / NaH₂PO₄ at 0.01 M (pH = 5.8). The protoplast production, which was monitored every 60 minutes, increased after 4 hours of incubation. When cultivated in regeneration media, the protoplasts were able to regenerate and revert to their hyphal form.

Key words: protoplastization, canker, *Eucalyptus* sp.

Introdução

Botryosphaeria spp. Ces. & De Not. ocorrem endofiticamente em *Eucalyptus* spp., mas também estão associadas ao cancro do eucalipto. O cancro de *Botryosphaeria* é uma das mais sérias doenças de *Eucalyptus* spp. na África do Sul (TPCP, 2002). Na Austrália, *Botryosphaeria* sp. é considerado ameaça significativa para a produção e sustentabilidade das plantações de *Eucalyptus*, sobretudo devido ao aumento da uniformidade genética das plantas (Slippers *et al.*, 2004).

As espécies de *Botryosphaeria* constantemente associadas ao cancro do eucalipto no Brasil são *Botryosphaeria ribis* Grossenb. & Duggar e *Botryosphaeria rhodina* (Berk. & M.A. Curtis) Arx (Krugner & Auer, 1997). O cancro de *Botryosphaeria* é relevante em cultivos onde ocorre deficiência de boro, relatada como fator de predisposição ao patógeno (Silveira & Higashi, 2003). Tal estresse nutricional tem

sido comum nos plantios de *Eucalyptus citriodora* (Silveira *et al.*, 1998). A doença ocorre com frequência nos plantios sob solo arenoso no Estado de São Paulo (Krugner & Auer, 1997; Silveira *et al.*, 1998).

O limitado conhecimento acerca da patogênese de *Botryosphaeria* spp. e dos fatores que afetam o seu desenvolvimento têm dificultado o estabelecimento de estratégias específicas para o manejo da doença (Krugner & Auer, 1997).

A protoplastização de *Botryosphaeria* spp. é um dos caminhos que podem levar à melhor compreensão desses patógenos. Com a obtenção de protoplastos de *Botryosphaeria* spp., isto é, células artificialmente desprovidas de parede, seria possível, por exemplo, estabelecer simples e práticos sistemas de transformação genética. Mutantes com patogenicidade alterada poderiam ser obtidos, possibilitando a clonagem e análise de genes relacionados à patogênese. Adicionalmente, os protoplastos possibilitariam a determinação do cariótipo eletroforético das

espécies e isolados fúngicos envolvidos com o cancro do eucalipto, e conseqüentemente inferir sobre a participação do polimorfismo cromossômico como fonte de variabilidade patogênica na relação patógeno-hospedeiro.

Diante das perspectivas apresentadas, objetivou-se estabelecer protocolo para a produção de protoplastos de *Botryosphaeria* sp., analisando tipos e concentrações dos sistemas líticos, tipos de estabilizadores osmóticos e tempos de protoplastização.

Material e Métodos

Cultivo de *Botryosphaeria* sp.

O isolado de *Botryosphaeria* sp., obtido de planta de *Eucalyptus* sp. infectada, foi rotineiramente cultivado em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) por 5 a 7 dias a 28°C, no escuro. A preservação do isolado em curto prazo foi feita por meio de repicagens sucessivas.

Obtenção dos protoplastos de *Botryosphaeria* sp.

Para o isolamento de protoplastos, fragmentos miceliais de *Botryosphaeria* sp. foram distribuídos sobre folha de papel celofane estéril, acondicionada em placas de Petri contendo meio BDA. Estas placas foram incubadas a 28°C, no escuro, por 17 horas. O micélio obtido foi raspado com o auxílio de espátula.

O procedimento padrão para a protoplastização foi a adição do sistema lítico em 3,5 mL de estabilizador osmótico contendo aproximadamente 80 mg de micélio fresco. Esta mistura foi agitada (100 rpm) a 28-30°C, por tempo variando de 1 a 6 horas.

Para garantir maior confiabilidade aos resultados, todos os fatores (tipo e concentração de enzimas; estabilizador osmótico e tempo de digestão) foram analisados em dois ensaios independentes, e cada tratamento foi aplicado em quatro unidades experimentais (erlenmeyer 25 mL). Os protoplastos foram observados ao microscópio e quantificados em câmara de Neubauer.

Digestão do micélio

Foram testados os sistemas líticos: 1 - Controle (sem enzima lítica); 2 - *Glucanex* (Novo Nordisk Ltd.); 3 - *Lysing Enzymes* (Sigma Chemicals Co.); 4 - *Cellulase Onozuka R-10* (Yakult Biochemical Co. Ltd.); 5 - *Cellulase* (Sigma Chemicals Co.); 6 - *Driselase* (Sigma Chemicals Co.); 7 - *Glucanex* + *Cellulase Onozuka R10*; 8 - *Lysing Enzymes* + *Cellulase Onozuka R10*; 9 - *Driselase* + *Cellulase Onozuka R10*; e 10 - *Lysing Enzymes* + *Glucanex*. Quinze miligramas de enzima foram misturadas ao estabilizador osmótico $MgSO_4$ a 1,2 M / NaH_2PO_4 a 0,01 M (pH = 5,8). Quando em combinações, as enzimas foram usadas em proporções iguais (7,5 mg de cada enzima). A protoplastização foi conduzida por 4 horas.

Concentração da enzima lítica

Para estabelecer a melhor relação massa micelial/enzima, seguindo os procedimentos descritos anteriormente, foram preparadas misturas para a digestão com diferentes quantidades (mg) do sistema enzimático que liberou o maior número de protoplastos. A protoplastização foi efetuada por 4 horas, utilizando-se o estabilizador osmótico $MgSO_4$ a 1,2 M / NaH_2PO_4 a 0,01 M (pH = 5,8).

Tipos de estabilizadores osmóticos

Verificou-se a eficiência de estabilizadores osmóticos: 1 - Controle (água destilada); 2 - $MgSO_4$ a 1,2 M / NaH_2PO_4 a 0,01 M (pH = 5,8); 3 - KCl a 0,7 M / NaH_2PO_4 a 0,1 M (pH = 5,9); 4 - NaCl a 0,8 M / NaH_2PO_4 a 0,1 M (pH = 5,8); 5 - Sorbitol a 0,6 M / Na_2HPO_4 a 0,1 M (pH = 8,0) e 6 - Sacarose 20% / EDTA a 50 mM / citrato tri-sódico a 20 mM (pH = 8,0). A protoplastização foi efetuada por 4 horas, utilizando-se o binômio sistema enzimático/concentração mais eficiente.

Tempos de exposição ao sistema enzimático

Detectada a combinação sistema enzimático/concentração/estabilizador osmótico mais eficiente, monitorou-se a protoplastização em função do tempo de incubação (1 a 6 horas). A cada hora, frações da suspensão de protoplastos foram retiradas assepticamente de cada repetição, com micropipeta, e quantificadas em câmara de Neubauer.

Resultados

Digestão do micélio

A liberação de protoplastos de *Botryosphaeria* sp. foi influenciada pelo sistema enzimático. Nos dois ensaios, observou-se a mesma tendência para a eficiência dos tratamentos (Figura 1). Menor número de protoplastos foi obtido quando *Driselase* + *Cellulase Onozuka R10*, *Cellulase*, *Driselase* ou *Cellulase Onozuka R10* foram utilizadas.

O micélio de *Botryosphaeria* sp. foi sensível a *Glucanex*, e em menor grau a *Lysing Enzymes*.

Contudo, a combinação desses sistemas líticos constituiu o tratamento mais eficiente na protoplastização do fungo. No segundo ensaio, a mistura resultou em incremento na liberação de protoplastos de aproximadamente 37%, em relação à *Glucanex* isolada (Figura 1). Em contrapartida, não foram evidenciados benefícios com a adição de *Cellulase Onozuka R10* nos sistemas líticos compostos por *Glucanex*, *Lysing Enzymes* ou *Driselase*. Pelo contrário, no caso de *Glucanex*, em ambos os ensaios, agindo isoladamente promoveu maior liberação de protoplastos do que em combinação com a celulase.

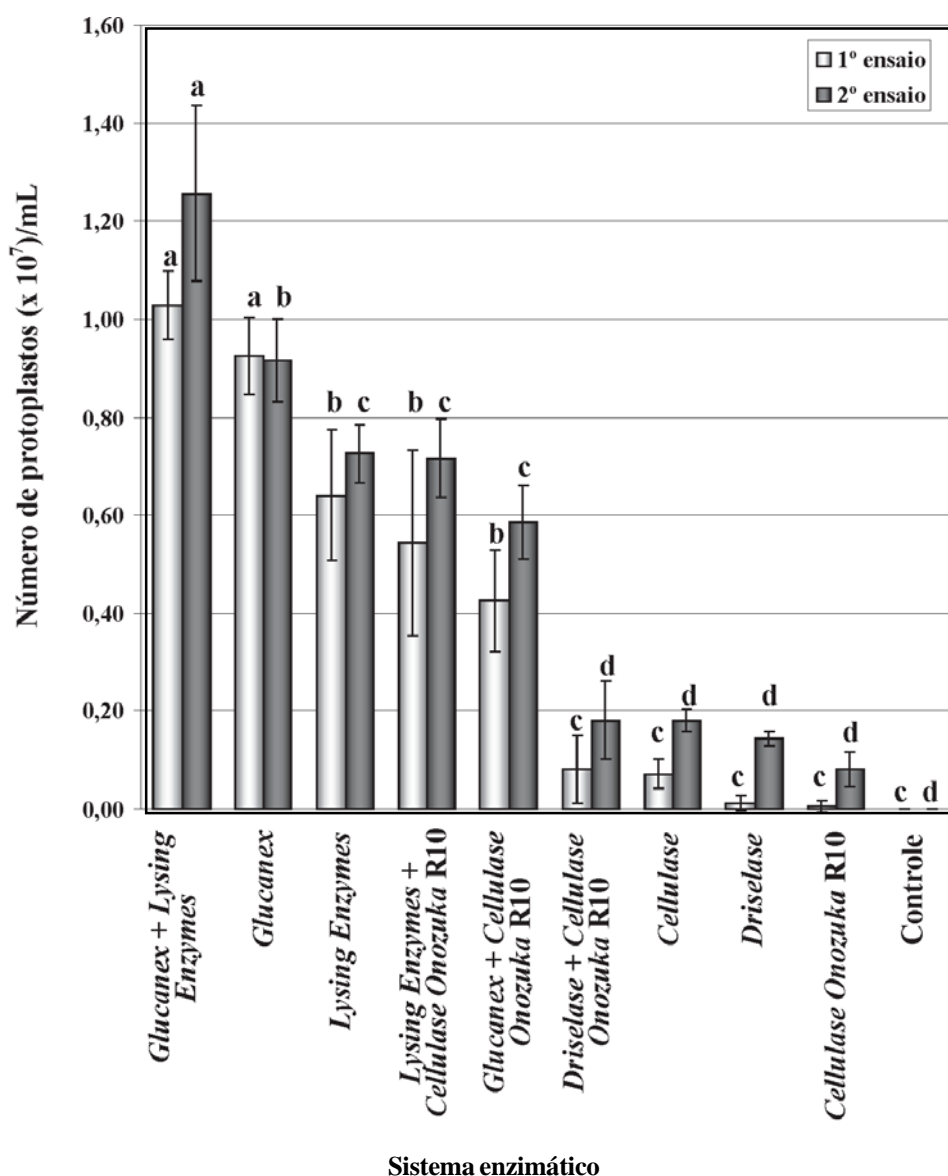


Figura 1 - Número de protoplastos de *Botryosphaeria* sp. obtidos com diferentes sistemas enzimáticos. Barras representam o desvio padrão. Em cada ensaio, tratamentos com a mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Concentração da enzima lítica

O efeito da concentração enzimática na protoplastização de *Botryosphaeria* sp. foi testado com base na combinação *Glucanex-Lysing Enzymes*. Foi verificado que a liberação de protoplastos foi influenciada pela concentração enzimática, a qual variou de 2,5 a 15 mg para cada enzima (Figura 2).

Em ambos os ensaios, maior número de protoplastos foi liberado quando o sistema lítico foi composto

por 15 mg de enzimas (7,5 mg de *Glucanex* + 7,5 mg de *Lysing Enzymes*). Tal concentração permitiu a obtenção de $1,10$ e $1,70 \times 10^7$ protoplastos/mL no primeiro e segundo ensaio, respectivamente. À medida que o sistema enzimático ficou mais concentrado, houve redução da eficiência de protoplastização. A média dos ensaios foi reduzida para $0,90 \times 10^7$ protoplastos/mL quando se utilizou 30 mg de enzimas, ou seja, 15 mg de *Glucanex* + 15 mg de *Lysing Enzymes* (Figura 2).

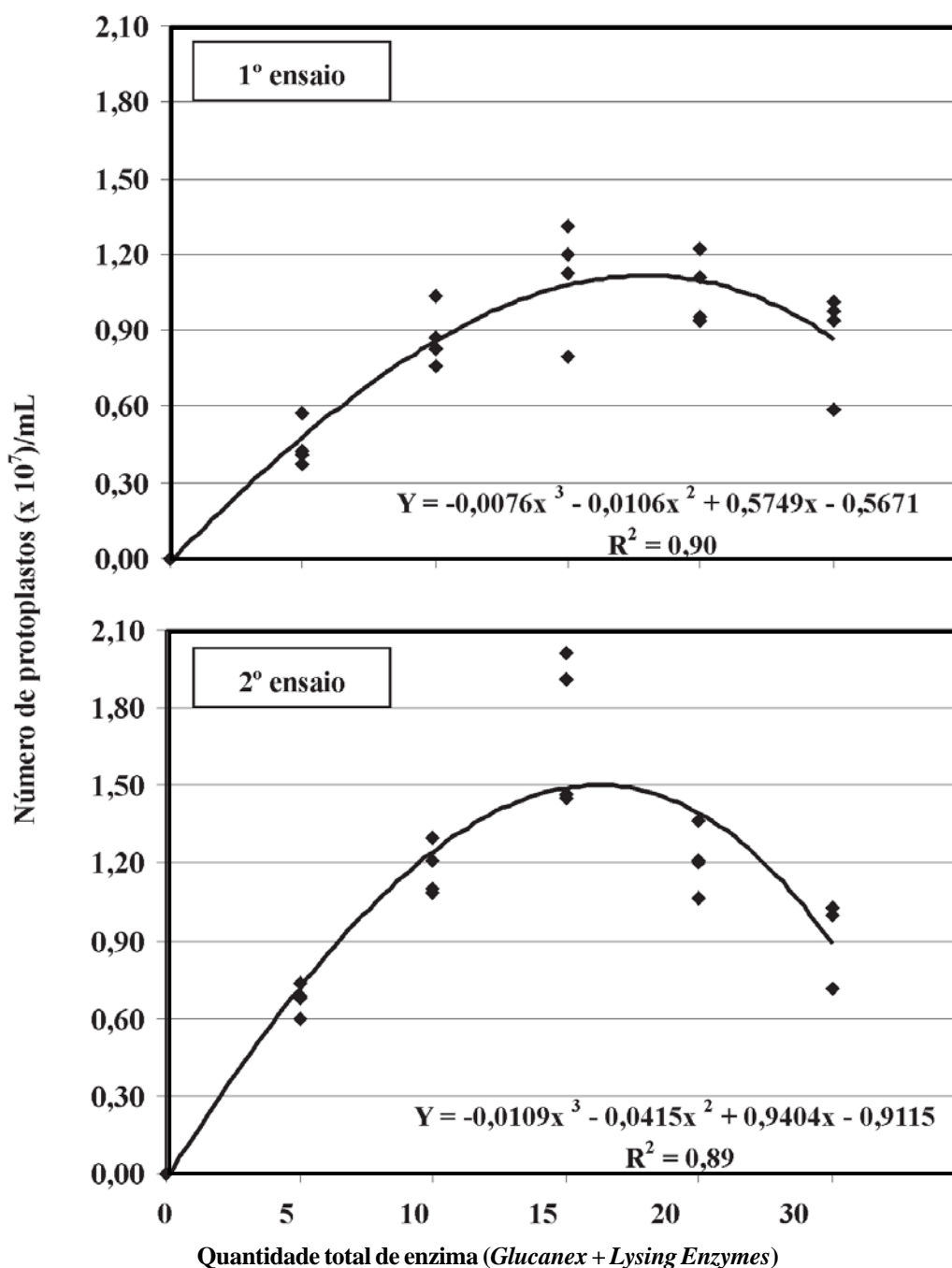


Figura 2 - Número de protoplastos de *Botryosphaeria* sp. em função da concentração de *Glucanex* e *Lysing Enzymes*.

Tipos de estabilizadores osmóticos

O soluto usado no sistema lítico influenciou a protoplastização de *Botryosphaeria* sp. (Figura 3). Nos dois ensaios se observou a mesma tendência para a eficiência dos estabilizadores osmóticos. Maior liberação de protoplastos foi constatada com a solução MgSO_4 a 1,2 M, em média $1,78 \times 10^7$ protoplastos/mL.

A estabilização proporcionada com KCl a 0,7M ou com NaCl a 0,8 M foram similares, porém menos eficiente do que a observada com MgSO_4 a 1,2 M.

Duas soluções compostas por açúcares foram testadas para estabilizar osmoticamente a protoplastização do fungo. O uso de solução à base de sacarose ou sorbitol promoveu baixa produção de protoplastos, médias dos ensaios de $0,31$ e $0,15 \times 10^7$ /mL, respectivamente (Figura 3).

Embora não mensurados, protoplastos maiores foram observados ao microscópio óptico quando se usou estabilizadores salinos, especialmente KCl a 0,7 M. Por outro lado, soluções compostas por sorbitol ou sacarose produziram protoplastos menores.

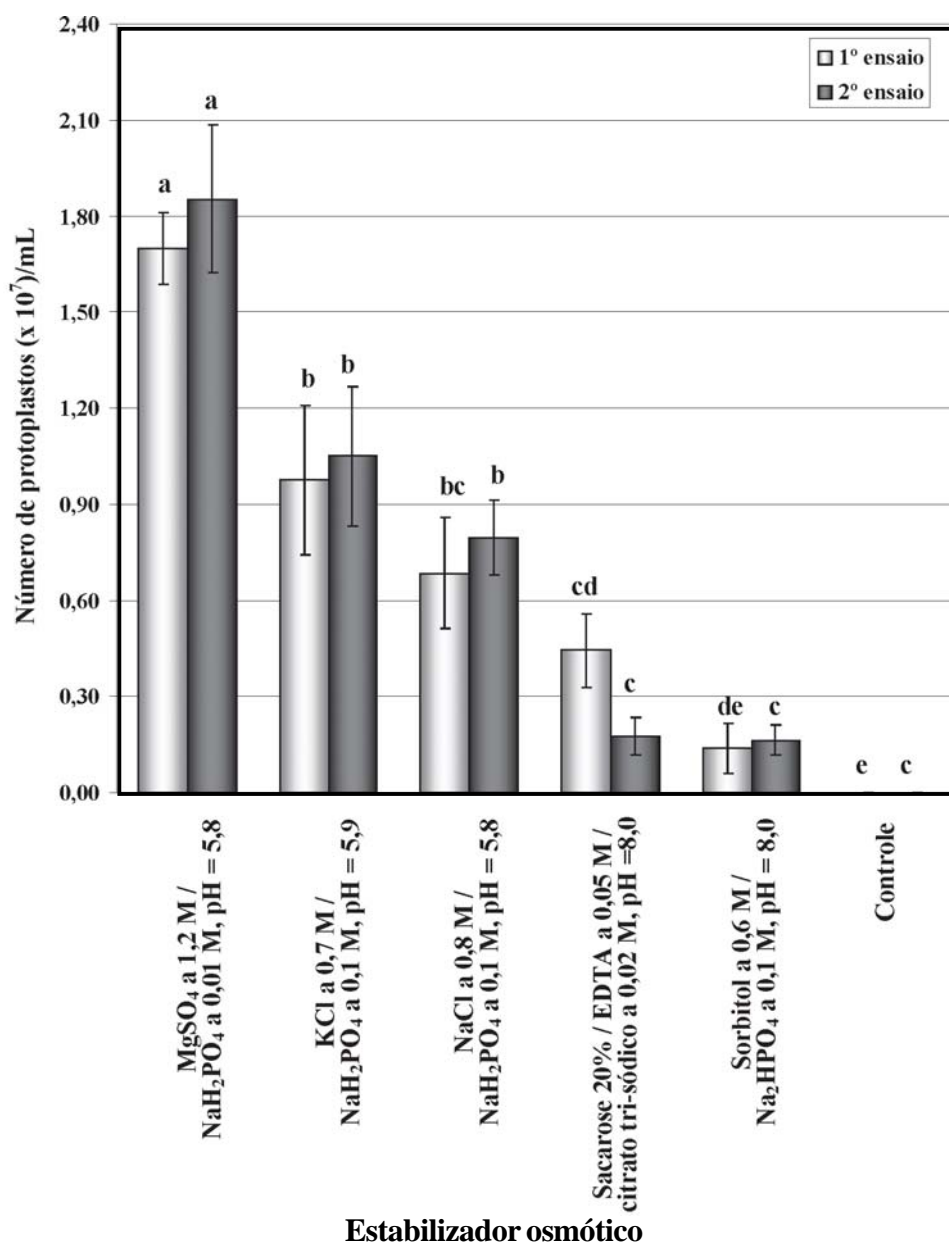


Figura 3 - Número de protoplastos de *Botryosphaeria* sp. em função do estabilizador osmótico. Barras representam o desvio padrão. Em cada ensaio, tratamentos com mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Tempos de exposição ao sistema enzimático

A protoplastização de *Botryosphaeria* sp. foi monitorada a cada 60 minutos, durante 6 horas de digestão, e em ambos os ensaios, protoplastos já foram observados com apenas 1 hora de incubação, porém em baixo número (Figura 4). Aumento considerável na liberação de protoplastos foi constatado a partir da

segunda hora de incubação. As maiores produções de protoplastos foram registradas com 4 horas de digestão enzimática do micélio. Foram observados $1,50$ e $1,70 \times 10^7$ protoplastos/mL no primeiro e segundo ensaio, respectivamente. A partir da quarta hora de incubação, se observou redução na liberação de protoplastos em ambos os ensaios (Figura 4).

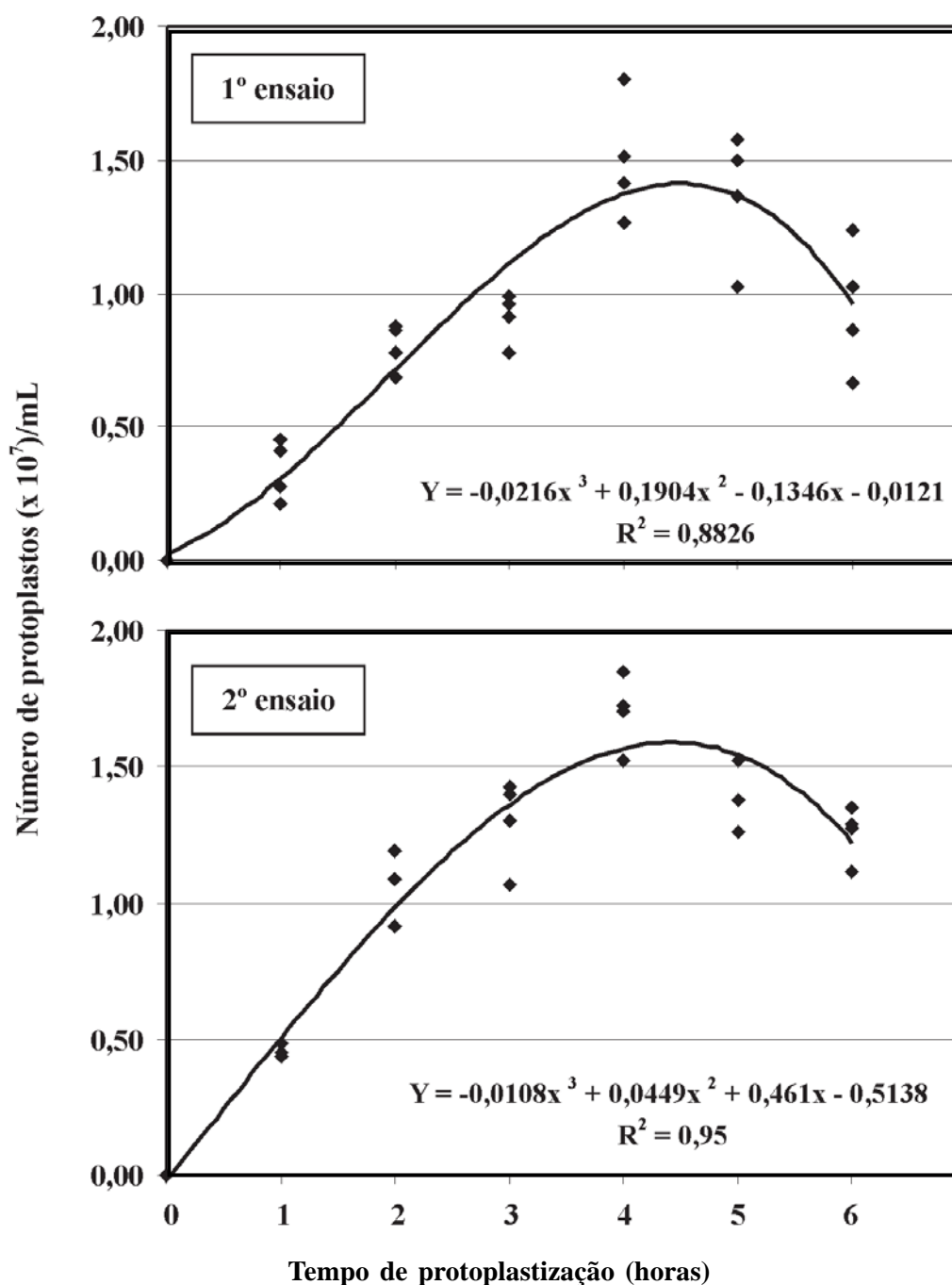


Figura 4 - Número de protoplastos de *Botryosphaeria* sp. em função do tempo de protoplastização.

Na Figura 5 estão apresentados protoplastos de *Botryosphaeria* sp. obtidos com 4 horas de incubação do micélio em estabilizador osmótico KCl a 0,7 M / NaH_2PO_4 a 0,1 M (pH = 5,9) contendo 7,5 mg de *Glucanex* e 7,5 mg de *Lysing Enzymes*.

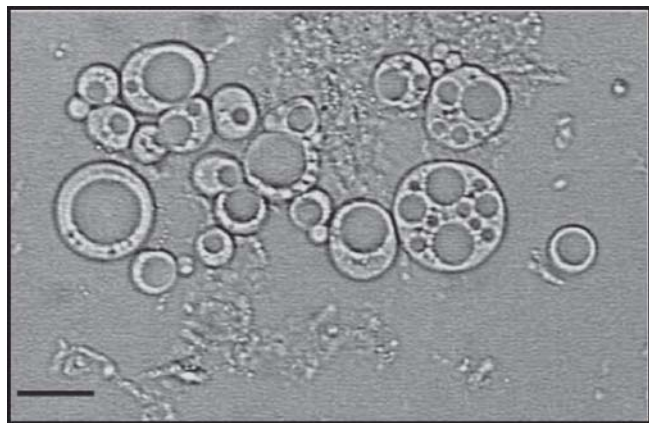


Figura 5 - Fotomicrografia de protoplastos de *Botryosphaeria* sp. Barra na parte inferior da figura corresponde a 10 μm .

Discussão

Os sistemas enzimáticos avaliados apresentaram variações consideráveis na liberação de protoplastos de *Botryosphaeria* sp. Isso era esperado, uma vez que a eficiência do complexo enzimático é dependente da composição da parede celular fúngica (Marchi, 2003).

Individualmente, *Glucanex* e *Lysing Enzymes* foram eficientes na obtenção de protoplastos de *Botryosphaeria* sp. Porém, o uso simultâneo de *Glucanex* e *Lysing Enzymes* resultou em aumentos expressivos na produção de protoplastos. Muitas vezes, devido à complexidade e diversidade da parede celular das hifas, a protoplastização de fungos filamentosos tem sido facilitada pelo enriquecimento de um complexo hidrolítico com outros complexos hidrolíticos (Hamlyn *et al.*, 1981; Hashiba & Yamada, 1982; Asai *et al.*, 1986; Teraoka *et al.*, 1992; Marchi *et al.*, 2006). A eficiência superior das combinações de enzimas é supostamente devido à ação sinérgica dos componentes líticos (Hashiba & Yamada, 1982). É possível que a atuação de um complexo enzimático torne o substrato do outro complexo mais acessível.

Em contraste ao observado com a combinação *Glucanex-Lysing Enzymes*, a combinação de *Cellulase Onozuka R10* com os complexos líticos *Driselase*, *Lysing Enzymes* ou *Glucanex* não foi adequada para potencializar a liberação de protoplastos. Pelo contrário, no caso de *Glucanex-Cellulase Onozuka R10* houve redução na produção de protoplastos em relação à *Glucanex* isolada. É possível que tenha ocorrido atuação excessiva de uma das enzimas sobre o substrato disponibilizado pela outra.

No geral, o que se observou foi a baixa eficiência do complexo enzimático à base de celulase na protoplastização de *Botryosphaeria* sp., inclusive não havendo diferenças entre as duas formulações comerciais avaliadas. Da mesma forma, foi evidenciada baixa eficiência de *Driselase* na liberação de protoplastos do fungo. O desempenho inferior de celulases e de *Driselase* também tem sido relatado para outros fungos filamentosos, como por exemplo, *Magnaporthe grisea* (Asia *et al.*, 1986; Marchi *et al.*, 2006).

A hidrólise da parede celular é potencializada adequando-se a relação micélio/complexo lítico. A composição da parede celular condicionará a concentração da enzima ou o tempo de digestão para a maior liberação de protoplastos (Anunciação, 1989). A relação micélio/enzima testada variou de 2,7:1 a 16:1, e maior número de protoplastos foi observado com a relação 5,3:1. Sistemas líticos mais concentrados levaram à redução do número de protoplastos liberados. Tal redução foi atribuída à atividade enzimática excessiva sobre os protoplastos, o que levou ao rompimento da membrana plasmática.

O estabilizador osmótico é outro componente importante no processo de protoplastização, pois deve promover condições favoráveis para a atividade enzimática e, principalmente, após a remoção da parede celular, o soluto deve garantir a integridade da célula até a síntese da nova parede. Na protoplastização de *Botryosphaeria* sp., constatou-se que os estabilizadores salinos foram superiores aos estabilizadores compostos por açúcares. Efeito semelhante foi reportado para outros fungos fitopatogênicos (Dias *et al.*, 1997; Marchi *et al.*, 2006). Sais inorgânicos são preconizados como mais eficientes para a protoplastização de fungos filamentosos, enquanto açúcares ou açúcares-álcoois como mais apropriados para a liberação de protoplastos

de leveduras (Lalithakumari, 1996). Contudo, é possível que o caráter mais ácido dos estabilizadores salinos tenha favorecido a protoplastização do fungo, uma vez que o pH é fator crítico para a produção de protoplastos, por influenciar a atividade do complexo enzimático e do estabilizador osmótico (Vega, 1990).

O tamanho dos protoplastos foi influenciado pelo estabilizador osmótico. Em geral, se observaram protoplastos maiores quando sais foram usados para compor as soluções. Segundo Peberdy & Gibson (1971), indução ou aumento de vacúolos nos protoplastos pode ocorrer quando a estabilização é promovida por sais. Tal evento foi claramente observado quando se empregou a solução estabilizadora KCl a 0,7 M.

A liberação de protoplastos foi progressiva até a quarta hora de digestão enzimática do micélio. A partir daí, observou-se redução na produção de protoplastos. Segundo Kim *et al.* (2000), incubações prolongadas com enzimas líticas podem levar a degeneração dos primeiros protoplastos liberados.

Para que sejam funcionais nos estudos de fungos filamentosos, os protoplastos são requeridos em grande número ($\geq 10^6$ /mL), e principalmente que apresentem boa capacidade regenerativa. Contudo, as taxas de regeneração e reversão são dependentes da espécie fúngica, em geral, não atingindo 100% (Aguilar, 1991). Os protoplastos de *Botryosphaeria* sp., obtidos segundo o protocolo estabelecido, foram aptos a regenerar e reverter para a forma hifálica quando plaquados em meio TB3, à base de sacarose (dados não apresentados). Contudo, a frequência de regeneração e reversão dos protoplastos não tem sido quantificada. Vale ressaltar que hidrólise enzimática prolongada pode levar a produção de protoplastos com baixa capacidade regenerativa (Dias *et al.*, 1996; Marchi *et al.*, 2006).

Os protoplastos poderão constituir ferramentas biológicas valiosas para a melhor compreensão de *Botryosphaeria* spp., inclusive sendo úteis em eventuais programas de transformação e mutagênese.

Conclusões

Produção eficiente de protoplastos de *Botryosphaeria* sp. é alcançada com a combinação de enzimas *Glucanex* e *Lysing Enzymes*.

O uso simultâneo de 7,5 mg de *Glucanex* e 7,5 mg de *Lysing Enzymes*, em 3,5 mL de estabilizador osmótico, resulta em maior liberação de protoplastos de *Botryosphaeria* sp.

A solução $MgSO_4$ a 1,2 M / NaH_2PO_4 a 0,01 M (pH = 5,8) constitui o estabilizador osmótico mais eficiente para a protoplastização de *Botryosphaeria* sp.

Maior liberação de protoplastos de *Botryosphaeria* sp. é observada com quatro horas de digestão enzimática.

REFERÊNCIAS

1. AGUILAR, M.B.D. **Atividade celulolítica e protoplastização em *Humicola* sp. e *Trichoderma pseudokoningii* var. *rifai*.** Piracicaba. 1991. 112p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo.
2. ANUNCIACÃO, C.E. **Obtenção e regeneração de protoplastos do fungo micorrízico *Pisolithus tinctorius*.** Viçosa. 1989. 57p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa.
3. ASAI, T.; OKUNO, T.; MATSUURA, K. Isolation and germination type of protoplasts of spores and hyphae of *Pyricularia oryzae*. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v.52, p.843-849, 1986.
4. DIAS, E.S.; ARAÚJO, E.F.; GUIMARÃES, W.V.; MUCHOVEJ, R.M.C. Production and regeneration of protoplasts from the mycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.12, p.625-628, 1996.
5. DIAS, E.S.; ARAÚJO, E.F.; GUIMARÃES, W.V.; COELHO, J.L.C.; SILVA, D.O. Production and regeneration of *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum* protoplasts. **Revista de Microbiologia**, v.28, p.116-120, 1997.
6. HAMLYN, P.F.; BRADSHAW, R.E.; MELLON, F.M.; SANTIAGO, C.M.; WILSON, J.M.; PEBERDY, J.F. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.3, p.321-325, 1981.
7. HASHIBA, T.; YAMADA, M. Formation and purification of protoplasts from *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v.72, p.849-853, 1982.
8. KIM, B.K.; KANG, J.H.; JIN, M.; KIM, H.W.; SHIM, M.J.; CHOI, E.C. Mycelial protoplast isolation and regeneration of *Lentinus lepideus*. **Life Sciences**, v.66, p.1359-1367, 2000.
9. KRUGNER, T.L.; AUER, C.G. Doenças do eucalipto. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia**, v.2, São Paulo: Ceres, 1997. p.358-375.

10. LALITHAKUMARI, D. Protoplasts - a biotechnological tool for plant pathological studies. **Indian Phytopathology**, v.49, p.199-212, 1996.
11. MARCHI, C.E. **Mutantes insercionais de *Magnaporthe grisea* com patogenicidade alterada em arroz**. Viçosa. 2003. 136p. Tese (doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa.
12. MARCHI, C.E.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; QUEIROZ, M.V. DE; MIZUBUTI, E.S.G. Obtenção e regeneração de protoplastos de *Magnaporthe grisea*. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p.232-238, 2006.
13. PEBERDY, J.F.; GIBSON, R.K. Regeneration of *Aspergillus nidulans* protoplasts. **Journal of General Microbiology**, v. 69, p.325-330, 1971.
14. SILVEIRA, R.L.V. DE A.; GONÇALVES, A.N.; KRÜGNER, T.L. Estado nutricional de *Eucalyptus citriodora* Hook cultivado sob diferentes doses de boro e sua relação com a agressividade de *Botryosphaeria ribis*. **Scientia Forestalis**, v.53, p.57-70, 1998.
15. SILVEIRA, R.L.V. DE A.; HIGASHI, E.N. Aspectos nutricionais envolvidos na ocorrência de doenças com ênfase para o eucalipto. **Circular Técnica IPEF**, n.200, 2003. 14p.
16. SLIPPERS, B.; FOURIE, G.; CROUS, P.W.; COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, B.D.; CARNEGIE, A.J.; WINGFIELD, M.J. Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced *Eucalyptus* trees in Australia and South Africa. **Studies in Mycology**, p.50, p.343-358, 2004.
17. TERAOKA, T.; SHIMURA, Y.; HOSOKAWA, D.; WATANABE, M. Giant protoplasts of *Pyricularia oryzae* Cavara. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v.58, p.726-733, 1992.
18. TPCP. The Tree Protection Cooperative Programme of FABI (Forestry and Agricultural Biotechnology Institute). **Botryosphaeria canker and die-back of Eucalyptus**. 2002. Disponível em: <<http://www.up.ac.za/academic/fabi/tpcp/pamphlets/pdf/botryosphaeria.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2006.
19. VEGA, M.E. **Aspectos genéticos da paramiose via fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. Piracicaba. 1990. 95p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo.