



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FUSÃO DE PROTOPLASTOS ENTRE *Penicillium echinulatum*
E *Trichoderma harzianum* PARA OBTENÇÃO DE
VARIABILIDADE VISANDO A PRODUÇÃO DE CELULASES

Bárbara Lizandra Perini de Souza

Caxias do Sul

2007

Bárbara Lizandra Perini de Souza

**FUSÃO DE PROTOPLASTOS ENTRE *Penicillium echinulatum* E
Trichoderma harzianum PARA OBTENÇÃO DE VARIABILIDADE
VISANDO A PRODUÇÃO DE CELULASES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia da Universidade de
Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de
Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon

Caxias do Sul

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

S729f Souza, Bárbara Lizandra Perini de, 1982-
Fusão de protoplastos entre *Penicillium echinulatum* e *Trichoderma harzianum* para obtenção de variabilidade visando a produção de celulases. - 2007.

100 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon.

1. Fungos - Protoplastos. 2. Celulase. 3. Trichoderma. 4. Penicillium.
I. Título.

CDU 2.ed.: 582.28

Índice para o catálogo sistemático:

1. Fungos - Protoplastos	582.28
2. Celulase	576.3
3. Trichoderma	582.282.16
4. Penicillium	582.282.123.2

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Nicole Tirello Acquolini – CRB 10/2297

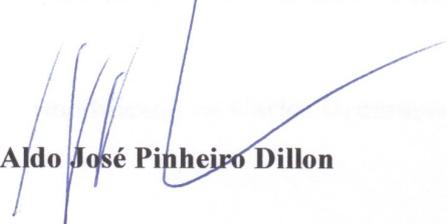
BÁRBARA LIZANDRA PERINI DE SOUZA

FUSÃO DE PROTOPLASTOS ENTRE *Penicillium echinulatum* E *Trichoderma harzianum* PARA OBTENÇÃO DE VARIABILIDADE VISANDO A PRODUÇÃO DE CELULASES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27 DE NOVEMBRO DE 2007.



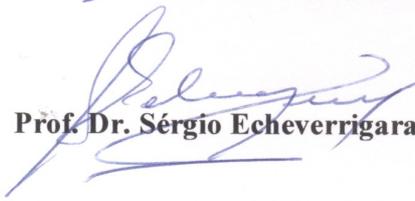
Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon



Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner



Prof. Dr. Adriano Brandelli



Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray Laguna

Recomeço

**Não importa onde você parou!
Em que momento da vida você cansou.
O que importa é que sempre é possível e necessário "recomeçar".
Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo.
É renovar as esperanças da vida e, o mais importante...
Acreditar em você de novo.
Sofreu muito neste período?
Foi aprendido...
Chorou muito?
Foi limpeza da alma...
Ficou com raiva das pessoas?
Foi para perdoá-las um dia...
Sentiu-se só por diversas vezes?
É porque fechaste a porta até para os anjos...
Acreditou em tudo que estava perdido?
Era o início de tua melhora...
Onde você quer chegar?
Ir alto?
Sonhe alto!!!
Queira o melhor do melhor!
Se pensamos pequeno,
Coisas pequenas teremos,
Mas se desejarmos fortemente o melhor e, principalmente
Lutarmos pelo melhor;
O melhor vai se instalar em nossa vida.
"Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da minha altura."**

(modificado de Carlos Drummond de Andrade)

*Dedico à minha família
e ao Aldo, que despertou
em mim o amor pela pesquisa.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, a força geradora do Universo, que torna as coisas realmente importantes possíveis, como este trabalho. Na seqüência, quero agradecer a todos, que me apoiaram e fizeram parte deste trabalho, em especial:

- ao Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon, pela orientação não só no trabalho mas na vida, pelos conselhos, exemplo, sabedoria, confiança e estímulo e, principalmente, pela amizade e por mostrar-me a verdadeira essência do ser humano;

- aos meus pais Nelito e Lídia, por acreditarem nos meus sonhos e no meu potencial, em todos os momentos, não me deixando fraquejar. E a minha mana Vanessa, pela amizade e pelas longas conversas;

- aos verdadeiros irmãos que encontrei nesse caminho em busca do conhecimento, Viviane Carniel e Tiago Romio, pela luz que são na minha vida;

- aos colegas e amigos do Laboratório de Enzimas e Biomassa, que estiveram presentes em algum momento deste trabalho: Raks (em especial), Fer Bettin, Dú Basso, Fer Jade, Rô, Marli, Carla, Lê, Luci Anja, Line, Maurício, Manu, Tanarinha, Ni, Bitten, Fer Munari, Pati, Fer Confortin... pelo incentivo, carinho;

- aos queridos ex-estagiários e atuais: Lú, Gabi, Tati, Pri, Bruninho e Fátima, pela dedicação e participação ativa na execução de alguma etapa desse trabalho; ao Tiaguinho e Diogo pelo esforço incansável nas tardes de leitura no espectrofotômetro;

- a todos os amigos (seria impossível citar todos eles) pelas horas de descontração, festas, aulas de dança e ensaios, horas na musculação, caminhadas do final da tarde, almoços e jantas descontraídos, enfim por me proporcionarem momentos de descontração, em meio a tanto estresse;

- ao Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray e ao mestrando Jucemar Zacaria do Instituto de Biotecnologia da UCS, pela atenção e ajuda na caracterização molecular das linhagens;

- aos colegas e amigos da minha turma de mestrado e aos demais colegas, professores e funcionários do curso de pós-graduação em Biotecnologia e do Instituto de Biotecnologia da UCS, pelo companheirismo e simpatia;

- aos Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira e Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray, pelo acompanhamento do meu trabalho e especialmente pelas críticas, sempre construtivas;

- aos amigos Tiago Romio e Lídia Perini de Souza (leitura e correção deste trabalho), Raquel Calloni (tradução do resumo) e Fernanda Bettin (dicas imprescindíveis) pela colaboração e paciência;

- à Universidade de Caxias do Sul que, por meio do Instituto de Biotecnologia, viabilizou a possibilidade de desenvolver este trabalho;

- à CAPES, pela bolsa de estudos, pois sem esta ajuda financeira esse sonho não teria se tornado realidade;

- a todos que colaboraram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho e que não tenham sido listados.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
NOMENCLATURA	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Características e aplicações das celulasas	5
2.2. Melhoramento genético para a produção de celulasas envolvendo poliploidia, mutagênese e seleção	8
2.3. Genes envolvidos na produção de celulasas e aplicações da biologia molecular na manipulação genética de microrganismos celulolíticos	10
2.4. Fusão de protoplastos como método gerador do ciclo parassexual em microrganismos	12
2.5. A fusão de protoplastos aplicada a microrganismos celulolíticos	16
2.6. Fusão de protoplastos: uso da técnica do “doador morto”	19
2.7. Caracterização molecular de produtos de fusão de protoplastos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Linhagens	25
3.2. Meios e Soluções	26

3.2.1. Solução concentrada dez vezes de nutrientes (MTV)	26
3.2.2. Suspensão 2,5% de celulose intumescida	26
3.2.3. Meio sólido para crescimento e manutenção das linhagens (MSC)	26
3.2.4. Meio líquido de crescimento para obtenção de micélio para protoplastos (MLC)	27
3.2.5. Meio líquido de crescimento para produção de solução lítica (SL) usada na liberação de protoplastos (MLSL)	27
3.2.6. Meio de crescimento para a observação de hidrólise da celulose (MGS)	27
3.2.7. Meio de crescimento para a observação de hidrólise com benomil (MBGS)	27
3.2.8. Meios líquidos para produção de celulases (MLP1 e MLP2)	28
3.2.9. Meio sólido para produção de celulases (MSP)	28
3.2.10. Soluções enzimáticas para obtenção de protoplastos	28
3.2.11. Solução fusionante	29
3.2.12. Meio líquido de regeneração	29
3.3. Procedimento Experimental	30
3.3.1. Crescimento e manutenção de linhagens	30
3.3.2. Produção de solução lítica usada na liberação de protoplastos (SL)	30
3.3.3. Obtenção de protoplastos	31
3.3.4. Fusão de protoplastos utilizando a técnica do doador morto	31
3.3.5. Caracterização, seleção e estabilização de possíveis heterocários	32
3.3.6. Teste de variabilidade para resistência ao benomil	33
3.3.7. Caracterização molecular	33

3.3.8. Cultivo Submerso para Produção de Celulases (CS)	37
3.3.9. Cultivo em Estado Sólido para Produção de Celulases (CES)	37
3.4. Métodos Analíticos	38
3.4.1. Determinações de atividades enzimáticas	38
3.5. Métodos Estatísticos	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Definição da técnica de obtenção de protoplastos	41
4.2. Fusão de protoplastos utilizando a técnica do Doador Morto	45
4.3. Seleção, caracterização e estabilização de possíveis heterocários	45
4.4. Resistência ao Benomil em produtos de fusão	51
4.5. Caracterização Molecular	54
4.6. Cultivo Submerso para Produção de Celulases (CS)	60
4.6.1. Produção Enzimática dos Parentais em Cultivo Submerso	60
4.6.2. Produção Enzimática dos Produtos de Fusão em Cultivo Submerso	64
4.7. Cultivo em Estado Sólido para Produção de Celulases (CES)	75
4.7.1. Produção Enzimática dos Parentais em Cultivo em Estado Sólido	75
4.7.2. Produção Enzimática dos Produtos de Fusão em Cultivo em Estado Sólido	77
5. CONCLUSÕES	87
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura da celulose e ação das endoglicanases, exoglinanases e β -glicosidases na degradação da celulose 6
- Figura 2.** Número de protoplastos $\times 10^7$. mL⁻¹ obtidos nas linhagens 9A02S1B9 (*P. echinulatum*) e AS5CH3 (*T. harzianum*) nos tratamento enzimáticos contendo 2,5 mL da solução lítica e 2,5 mL de KCl 0,6 M e Glucanex® 0,01 g/mL 42
- Figura 3.** Micélios de *P. echinulatum* (a) e *T. harzianum* (b) crescidos por 20 horas em meio líquido (x 400). Digestão parcial dos micélios de *P. echinulatum* (c) e *T. harzianum* (d) e obtenção de protoplastos após 3 h e 1h de ação enzimática, respectivamente (x 400). Aglomerados de protoplastos (e - x 400, f - x 1000) e protoplastos em processo de fusão, após tratamento com PEG (g - x 1000). Protoplastos proveniente de fusão (h - x 1000). Formação de massa amorfa e hifas, após 70 h de regeneração dos protoplastos (i - x 400). 44
- Figura 4.** Produtos de fusão obtidos no processo de seleção, estabilização e caracterização de fusionates de *Penicillium echinulatum* e *Trichoderma harzianum* 46-7
- Figura 5.** Suspensões de conídios para verificação de halo de hidrólise de celulose em placas de Petri em análise qualitativa dos parentais *P. echinulatum* e *T. harzianum* e seus produtos de fusão 49
- Figura 6.** Repiques de micélio de produtos de fusão com morfologia semelhante ao parental *Penicillium echinulatum* (a), semelhante ao parental *Trichoderma harzianum* (b) e forma alterada (c), mostrando característica de ambos os parentais 50
- Figura 7.** Repiques comparativos para verificação de relação halo/colônia em placas de Petri, em análise qualitativa de produção de celulases dos parentais *P. echinulatum* (B) e *T. harzianum* (A) e seus produtos de fusão (a - PFSA 15, 25 e 26) 51

- Figura 8.** Crescimento radial (cm) dos produtos de fusão entre *P. echinulatum* e *T. harzianum* em diferentes concentrações de benomil no 4º dia 53
- Figura 9.** Morfologia dos produtos de fusão entre *P. echinulatum* e *T. harzianum* em diferentes concentrações de benomil no 4º dia (**a, b, c, d, e**) e 8º dia (**f, g, h, i, j**) 53
- Figura 10.** Perfil e análise de bandas de DNAs, obtidos por RAPD amplificados com a combinação dos primers OPXL e OPX7, dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 (**1**) e *T. harzianum* AS5CH3 (**2**) e seus produtos de fusão (**3-8**). 56
- Figura 11.** Perfil e análise de bandas de DNAs, obtidos por RAPD amplificados com o primer OPB10, dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 (**1**) e *T. harzianum* AS5CH3 (**2**) e seus produtos de fusão (**3-8**). 57
- Figura 12.** Perfil e análise de bandas de DNAs, obtidos por RAPD amplificados com o primer OPX12, dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 (**1**) e *T. harzianum* AS5CH3 (**2**) e seus produtos de fusão (**3-8**). 58
- Figura 13.** Atividades enzimáticas do 1º Cultivo submerso dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3 62
- Figura 14.** Atividades enzimáticas do 2º Cultivo submerso dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3 63
- Figura 15.** Valores de pH obtidos nos 1º (**a**) e 2º (**b**) cultivos submersos dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3 e seus produtos de fusão 64
- Figura 16.** Comparação das atividades sobre Papel Filtro ($\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$) com as atividades específicas ($\text{UI FPA}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$) obtidas para as os dias de pico 67

enzimático, no 1° (a) e 2° (b) experimento de triagem em Cultivo submerso dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3 e seus produtos de fusão

Figura 17. Atividades enzimáticas do 3° experimento de triagem em cultivo submerso dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3 e seus produtos de fusão 73

Figura 18. Comparação das atividades sobre Papel Filtro (UI.mL^{-1}) com as atividades específicas ($\text{UI FPA.mg proteína}^{-1}$) obtidas para as os dias de pico enzimático, no 3° experimento de triagem em cultivo submerso dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3 e seus produtos de fusão. 74

Figura 19. Atividades enzimáticas do Cultivo em estado sólido dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3 76

Figura 20. Atividades enzimáticas do 1° experimento de triagem em cultivo em estado sólido dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3 e seus produtos de fusão 79

Figura 21. Atividades enzimáticas do 2° experimento de triagem em cultivo em estado sólido dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3 e seus produtos de fusão 80

Figura 22. Atividades enzimáticas do 3° experimento de triagem em cultivo em estado sólido dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3 e seus produtos de fusão 83

Figura 23. Valores de pH obtidos nos 1° (a), 2° (b) e 3° (c) experimentos de triagem de atividades de celulases, em cultivo em estado sólido, dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3 e seus produtos de fusão 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo para amplificação de DNA	35
Tabela 2. Atividade sobre Papel Filtro (UI.mL ⁻¹) no 1° (A) e 2° (B) experimentos de triagem da produção de celulasas, em cultivo submerso, dos parentais <i>P. echinulatum</i> 9A02S1B9 e <i>T. harzianum</i> AS5CH3 e seus produtos de fusão	66
Tabela 3. Atividade de β-glicosidase (UI.mL ⁻¹) no 1° (A) e 2° (B) experimentos de triagem da produção de celulasas, em cultivo submerso, dos parentais <i>P. echinulatum</i> 9A02S1B9 e <i>T. harzianum</i> AS5CH3 e seus produtos de fusão	69
Tabela 4. Atividade de endoglicanase (UI.mL ⁻¹) no 1° (A) e 2° (B) experimentos de triagem da produção de celulasas, em cultivo submerso, dos parentais <i>P. echinulatum</i> 9A02S1B9 e <i>T. harzianum</i> AS5CH3 e seus produtos de fusão	70

NOMENCLATURA

AS5 – linhagem parental de *T. harzianum* (AS5CH3)

CS – Cultivo Submerso para produção de celulases

CES – Cultivo em Estado Sólido para produção de celulases

DNS – ácido-2,3-dinitrosalicílico

FPAases – Atividade sobre papel filtro

MBGS – Meio de crescimento para a observação de hidrólise com benomil

MGS – Meio de crescimento para a observação de hidrólise da celulose

MLC – Meio líquido de crescimento para obtenção de micélio para protoplastos

MLP – Meio líquido para produção de celulases

MLSL – Meio líquido de crescimento para produção de solução lítica

MSC – Meio sólido para crescimento e manutenção das linhagens

MSP – Meio sólido para produção de celulases

MTV – solução de nutrientes

PFSA – produtos de fusão entre as linhagens S1B9 de *P. echinulatum* e AS5 de *T. harzianum*

S1B9 – linhagem parental de *P. echinulatum* (9A02S1B9)

SL – solução lítica para liberação de protoplastos

RESUMO

O estudo de fungos celulolíticos tem-se mostrado relevante, tendo em vista o interesse econômico do complexo celulases, especialmente na indústria têxtil e, mais recentemente, para propósitos energéticos. No presente trabalho, a fusão de protoplastos foi utilizada para combinar genótipos de mutantes parcialmente desreprimidos para produção de celulases de *Penicillium echinulatum* (9A02**S1B9**) e *Trichoderma harzianum* (**AS5CH3**), utilizando a técnica do doador morto, buscando-se obter recombinantes com maior produção de celulases. Nesta estratégia, ambas as linhagens tiveram seu micélio tratado com Glucanex® 0,01 g/mL, para quebra da parede celular. Os protoplastos resultantes da linhagem portadora de marca de resistência ao benomil (9A02**S1B9**) foram inativados por calor (técnica do doador morto) de 60°C antes da etapa de fusão, a qual após foi induzida por PEG4000 e Ca²⁺, com protoplastos da linhagem sensível ao benomil (**AS5CH3**). A partir de um produto de fusão, foram selecionados 24 sub- clones, após estratégias de estabilização e seleção para precocidade e eficiência na formação de halo de hidrólise de celulose em placas de Petri. Os produtos de fusão apresentaram morfologia e esporulação semelhantes a um dos parentais, sendo treze semelhantes à *Penicillium*, nove semelhantes à *Trichoderma* e dois mostrando formas alteradas. Os produtos de fusão que segregaram para morfologia de *T. harzianum* apresentaram a característica de resistência ao benomil, sendo capazes de crescer e esporular em meios contendo até 100 µg/mL deste inibidor. A morfologia, o perfil de bandas, obtidos por RAPD, e o padrão de secreção de celulases dos produtos de fusão foram sempre mais semelhantes a um dos parentais. Os clones apresentaram variação quanto ao halo de hidrólise de celulose em placas de Petri e na atividade sobre papel filtro FPAases, β-glicosidase ou endoglicanase, quando crescidas em cultivo submerso ou em estado sólido. Desta variabilidade, verificaram-se aumentos significativos para algumas das linhagens em relação aos parentais. A aplicação da metodologia de fusão de protoplastos para obter recombinantes entre *P. echinulatum* e *T. harzianum*, empregando a técnica do doador morto, mostrou-se adequada na geração de variabilidade para produção de celulases.

ABSTRACT

The study of cellulolytic fungi has proved to be important, considering economic interest of the cellulase complex, especially in the textile industry and, more recently, for energy purposes. In this work, the protoplast fusion was used to combine genotypes of mutants partially non repressed for cellulases production of *Penicillium echinulatum* (9A02S1B9) and *Trichoderma harzianum* (AS5CH3) using the technique dead donor, intending to obtain recombinants with higher cellulases production. In this strategy, both strains had their mycelium treated with Glucanex ® 0,01 g/mL, to lyse the cell wall. The protoplast obtained from the benomyl-resistant (9A02S1B9) were heat-inactivated (technique of dead donor) at 60°C, before the step of fusion, induced by PEG4000 and Ca²⁺, with protoplast of the sensitive-benomyl strain (AS5CH3). Twenty four sub-clones were selected from one fusion product, after stabilization and selection strategies for precocity and efficiency in the formation clearing zones of by cellulose hydrolysis in Petri plates. The fusion products showed similar morphology and sporulation to one of parents, thirteen similar to *Penicillium*, nine similar to *Trichoderma* and two showed altered forms. The fusion products which segregate to the morphology of *T. harzianum* resistance to benomyl, being able to grow and sporulate in media containing up to 100 µg/mL of this inhibitor. The morphology, the profile of bands, obtained by RAPD, and the pattern of cellulase secretion by fusion products were ever more similar to one of parents. The fusants presented variation in the halo of cellulose hydrolysis in Petri plates, and in the activity on filter paper (FPAases), β- glucosidase or endoglicanase, when grown submerged cultivation or solid state. From this variability, significant improvement was verified for some of the parental strains. The application of the protoplast fusion methodology to obtain recombinant between *P. echinulatum* and *T. harzianum*, using the technique of dead donor, has proved to be adequate to generate variability in the production of cellulases.

Palavras-Chaves

Celulases, fusão de protoplastos, *Trichoderma* e *Penicillium*.

1. INTRODUÇÃO

O estudo de fungos celulolíticos é relevante em vista do interesse econômico do complexo celulases que inclui, principalmente, a indústria têxtil, com finalidade de produzir o aspecto usado e macio em tecidos e roupas de algodão tingidas com índigo, também, como componentes de detergentes domésticos e industriais a base de enzimas. Outros usos das celulases são: 1) a extração de essências e óleos vegetais, 2) aumento da digestibilidade de rações animais, 3) em produtos estimuladores de silagens, 4) como adjuvante para o malte da cerveja, 5) componente farmacológico, entre outros.

No Brasil, a disponibilidade de uma tecnologia para o aproveitamento de lignocelulósicos para a produção de álcool seria muito importante, devido à possibilidade de resolver dois problemas: um ecológico e outro energético, através da diminuição da concentração de resíduos que, muitas vezes, são queimados a céu aberto e a resposta para uma alta demanda de etanol no mercado nacional e internacional.

O interesse em estudar celulases, nos seus aspectos bioquímicos, genéticos e de cultivo de microrganismos, iniciou-se com a possibilidade de sua aplicação para a hidrólise da celulose, que está disponível em grandes quantidades nos resíduos lignocelulósicos da agricultura e nos lixos, tanto urbanos quanto industriais. Os hidrolisados de celulose, resultando em xaropes de glicose, poderiam ser finalmente utilizados para diferentes fins biotecnológicos, principalmente na produção de etanol.

Os fungos, naturalmente, possuem um alto nível de secreção de celulases, mesmo estando sob efeito de um sistema de controle de expressão gênica, desencadeado pelos níveis endógenos do produto final da hidrólise da celulose, a glicose. Esforços têm sido dispendidos, buscando melhoramento genético por transformação gênica, mutagênese e seleção, para a obtenção de variantes genéticas desreprimidos. Um recurso ainda pouco

empregado é a geração de variabilidade genética por processos recombinantes decorrentes de fusão de protoplastos, sendo esta variabilidade genética posteriormente utilizada para processos de seleção específicos.

No contexto que envolve o estudo e produção das celulases, uma linhagem de *Penicillium echinulatum*, denominada 2HH, foi isolada em 1979 do trato intestinal do coleóptero *Anobium punctatum* e uma linhagem de *Trichoderma harzianum*, denominada 5A, foi isolada em 1981 do trato intestinal do coleóptero *Passalus binominatus erosus*, ambas no Instituto de Biotecnologia (IB) da Universidade de Caxias do Sul (UCS). A linhagem 2HH de *P. echinulatum* tem capacidade hidrolítica equivalente aos melhores mutantes de *T. reesei* disponíveis no mercado, como a linhagem RUT C30, com a vantagem de apresentar maior atividade de β -glicosidase. A linhagem 5A de *T. harzianum* apresenta secreção mais rápida das celulases, sendo uma característica de extrema importância para microrganismos de interesse industrial. As linhagens 2HH e 5A foram melhoradas por mutagênese e seleção.

A liberação do complexo celulolítico, tal como para outros sistemas enzimáticos exportados pelas células, está na dependência não só de um conjunto de genes estruturais e de controle, diretamente relacionados às celulases, mas também de outros genes não diretamente relacionados, como os envolvidos em atividades de glicosilação, de reconhecimento de membranas e de exocitose, tudo contribuindo para a máxima ou mínima secreção de celulases.

O envolvimento de múltiplos genes convergindo para a secreção das celulases permite propor uma hipótese lógica, de que havendo a possibilidade de recombinar conjuntos gênicos filogeneticamente diferentes ou mesmo distantes, como os pertencentes às linhagens de *P. echinulatum* e *T. harzianum*, poderiam ser geradas novas combinações gênicas, para a secreção de celulases. Visto que existem mutantes parcialmente

desreprimidos para a secreção de celulases em *P. echinulatum* é de grande importância o desenvolvimento de novas linhagens para a produção de celulases, obtidas como resultado da combinação intergenérica entre *P. echinulatum* e *T. harzianum*. Para tanto, neste trabalho foram realizados experimentos em que a fusão de protoplastos foi desenvolvida com o uso da técnica do doador morto como estratégia para seleção de heterocários. Protoplastos da linhagem de *P. echinulatum* 9A02S1B9, mutante portador de resistência ao fungicida benomil, foram inativados por calor e logo após, fusionados com protoplastos de *T. harzianum* da linhagem AS5CH3, sensíveis ao benomil, sendo os fusionantes recuperados em meio contendo inibidor, seguidas de processos seletivos para a secreção de celulases. As novas linhagens, obtidas após processos de seleção em placas, tiveram seu potencial celulolítico avaliado pela secreção de celulases, FPAases, β -glicosidase e endoglucanase em cultivos submerso (CS) e cultivo em estado sólido (CES).

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi obter linhagens recombinantes com maior produção de celulases por meio de fusão de protoplastos entre *Penicillium echinulatum* e *Trichoderma harzianum*, tendo como objetivos específicos:

- obter recombinantes provenientes de fusão de protoplastos entre as linhagens 9A02S1B9 de *P. echinulatum* e AS5CH3 de *T. harzianum*, utilizando como marca de seleção a resistência ao inibidor benomil;
- obter fusionantes estáveis por pressão de seleção;
- estudar a sensibilidade ao benomil, em meios de cultivo contendo diferentes concentrações do inibidor, nas linhagens parentais 9A02S1B9 de *P. echinulatum* e AS5CH3 de *T. harzianum* e seus produtos de fusão;

- verificar em cultivo submerso (CS) e cultivo em estado sólido (CES) o potencial celulolítico das linhagens parentais **9A02S1B9** de *P. echinulatum* e **AS5CH3** de *T. harzianum* e das novas linhagens obtidas como produtos de fusão;
- avaliar os recombinantes utilizando a técnica de RAPD, para detectar possíveis eventos moleculares desencadeados após a fusão de protoplastos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características e aplicações das celulases

O complexo enzimático celulases constitui-se de um conjunto de hidrolases glicosídicas, secretadas por microrganismos, plantas e alguns animais. Estas enzimas são glicoproteínas, de peso molecular entre 50 e 90 KDa, capazes de romper as ligações glicosídicas do tipo β -1,4 pertencentes as microfibrilas da celulose, principal polímero presente nas paredes de células vegetais, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose (Mandels, 1982).

Entre os complexos celulolíticos provenientes de bactérias e fungos estudados, o de *Trichoderma reesei* é o mais conhecido. Métodos de separação de moléculas e estudos sobre a ação dos componentes das celulases têm mostrado que este complexo enzimático é constituído por um conjunto de três tipos de enzimas hidrolíticas: as endo-1,4- β -glicanases (EC 3.2.1.4), que hidrolisam as ligações glicosídicas ao acaso nas fibras de celulose; exo-1,4- β -glicanases [Celobiohidrolase, (EC 3.2.1.91)], que agem nas extremidades reductoras e não reductoras de polímeros gerados pela ação das endoglicanases, liberando celobiose; e as β -1,4-glicosidases (EC 3.2.1.21), que hidrolisam oligossacarídeos e celobiose à glicose (Bisaria & Ghose, 1981). Estes três componentes atuam de forma sinérgica na hidrólise da celulose, como podemos observar na Figura 1 (Dillon, 2004).

Como observa-se na Figura 1, as regiões de menor organização das microfibrilas de celulose, conhecidas como amorfas, são os locais de ação de endoglicanases. A ação resulta na diminuição do grau de polimerização das microfibrilas, disponibilizando assim maior quantidade de substratos para a ação de exoglicanases, as quais liberam celobiose das

extremidades. Finalmente as β -glicosidases hidrolisam o dímero de glicose e pequenos oligossacarídeos (Bisaria & Ghose, 1981).

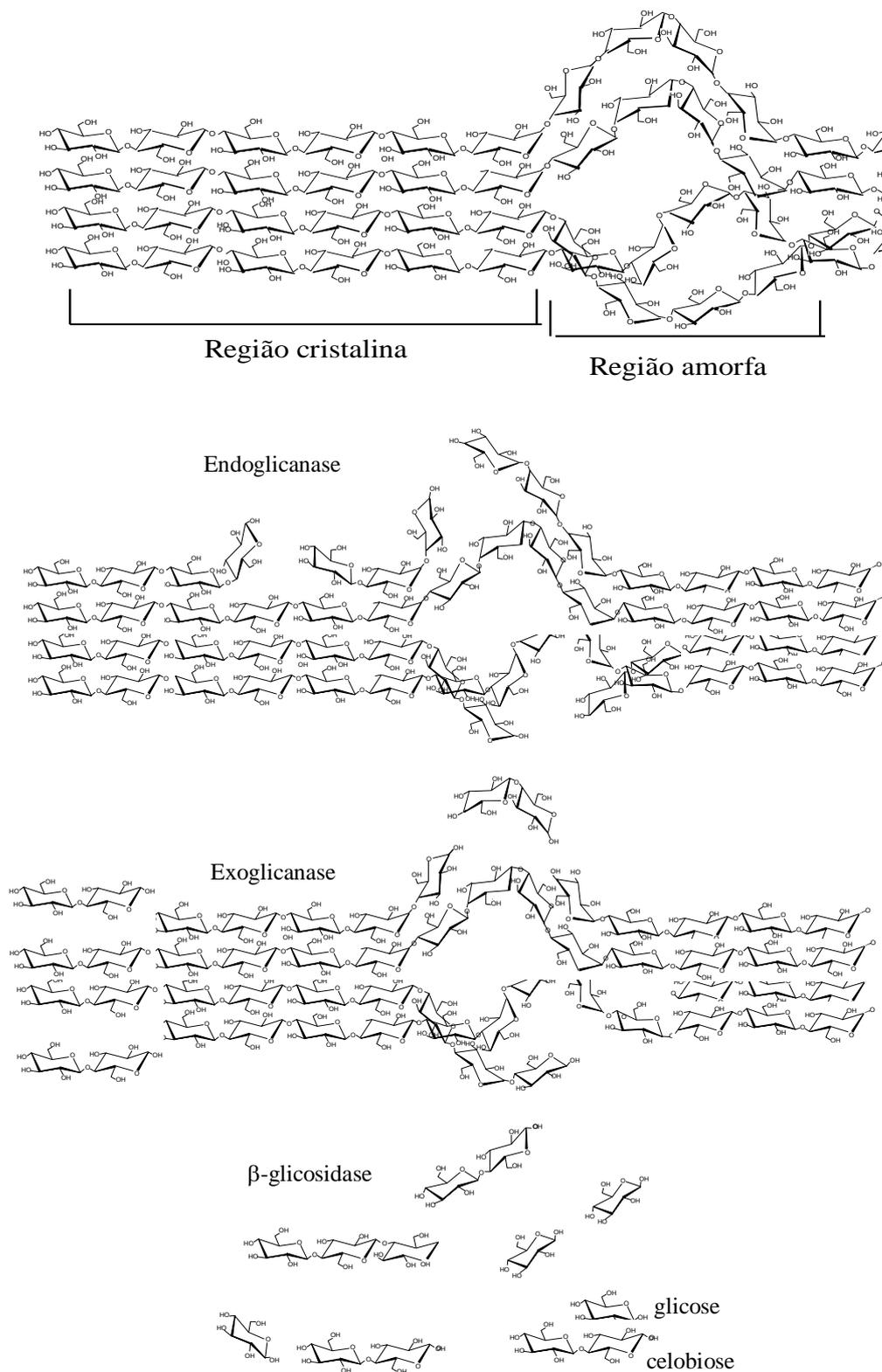


Figura 1. Estrutura da celulose e ação das endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidases na degradação da celulose (Dillon, 2004)

As celulases destinam-se principalmente às áreas têxtil e de detergentes. Na área têxtil, as celulases são utilizadas para desenvolver o aspecto de usado e desbotado (bioestonagem) em tecidos de algodão tingidos com índigo, como é o caso do jeans, e também para a retirada das regiões de desorganização de microfibrilas de celulose (“*pillling*”) e amaciamento dos tecidos. Como componente de detergentes, as celulases são utilizadas para remover extremidades de microfibrilas que são retiradas do tecido juntamente com a sujeira. As celulases também vêm sendo usadas como aditivos na preparação do malte de cerveja, em processos de extração de sucos, óleos vegetais, pigmentos, alcalóides e amido. Na área de alimentação animal, as celulases são comercializadas como componentes de indutores de silagens e em rações para aves e suínos, com a finalidade de aumentar a digestibilidade de alimentos ricos em fibras de celulose. Na área energética, essas enzimas vêm sendo empregadas em plantas-piloto para a obtenção de hidrolisados de celulose, os quais são utilizados para fermentação visando produtos de interesse como o álcool (Dillon, 2004).

Várias tecnologias que utilizam celulases entraram em uso nos últimos 20 anos, sendo que outras aguardam aperfeiçoamentos:

- no reprocessamento (reciclagem e reaproveitamento) do papel em substituição ao NaOH, na remoção de cor, no tratamento de tecidos de algodão, com a possibilidade de aumentar o brilho dos tecidos pela retirada de microfibrilas desorganizadas (Park, 2001);

- como proteínas separadoras de grupos quirais, quando dispostas em coluna de cromatografia, apresentam a capacidade de discriminar entre pares de esteroisômeros de usos farmacológicos (Henriksson, 2000);

- para a síntese de oligômeros, usada pela engenharia de proteínas para a construção de proteínas de grande interesse, denominadas “glicosintetases”, que apresentam alteração

funcional no seu sítio catalítico, aumentando a capacidade de síntese de oligômeros ou polímeros de alta pureza (Heighman, 1999);

- para liberação de aromas, especialmente as β -glicosidases na indústria enológica, pela hidrólise de glicosídeos monoterpênicos presentes no mosto, liberando compostos terpênicos, responsáveis por grande parte dos aromas do vinho (Spagna, 1998);

- para a hidrólise de biomassa vegetal, presente em resíduos lignocelulósicos da agricultura, com a finalidade de obter xaropes de açúcares fermentescíveis, porém o processo ainda não é econômico, sendo necessário aumentar a sua economicidade e eficiência, visando tornar viável a produção de etanol a partir de lignocelulósicos (Dillon, 2004).

2.2. Melhoramento genético para a produção de celulases envolvendo poliploidia, mutagênese e seleção

Levando em consideração o rigoroso controle metabólico existente na produção e na atividade de enzimas celulolíticas, segundo Montenecourt e Eveleigh (1979), várias técnicas de seleção de mutantes regulatórios de maior produção são utilizadas, principalmente em *Trichoderma reesei*. O procedimento de seleção destes mutantes geralmente utiliza redutores de colônias, como o Triton X100, em meios com celulose como única fonte de carbono. O critério de seleção baseia-se no tamanho de zonas claras de degradação de celulose (halo), comparado ao da linhagem selvagem (Macris, 1984).

Montenecourt & Eveleigh (1977a) isolaram os mutantes M7 e NG 14 a partir da linhagem de *T. reesei* QM9414, o primeiro com o uso de radiação ultravioleta e o segundo com nitrosoguanidina (Montenecourt & Eveleigh, 1977b). Posteriormente, estes autores isolaram a cepa RUT-C30 que, juntamente com NG 14, pode chegar a liberar cerca de 20mg/mL de proteínas extracelulares com atividade de FPA de 15 UI/mL (Bisaria e

Ghose,1981). Outros pesquisadores também obtiveram aumento na produção de celulases em *Trichoderma* spp. (Bailey & Nevalainen,1981; Shoemaker *et al.*, 1981; Figueiredo *et al.*, 1985; Durand *et al.*, 1988;).

A maior secreção em mutantes de *Trichoderma* foi obtida pelo grupo da Universidade de Toulouse, na França (Durand *et al.*, 1988) chegando a títulos de 30 UI/mL de FPA com secreção de 40 mg/mL de proteína no caldo de fermentação.

No Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, com o uso de metodologias baseadas em Montenecourt & Eveleigh (1977a), obteve-se mutantes parcialmente desreprimidos em uma linhagem de *T. harzianum* denominada 5A (Dillon *et al.*, 1985; Dillon *et al.*, 1987; Carrau *et al.*, 1988; Toss *e cols.*, 1995(a e b); Dillon, 2000).

Devido à composição mais equilibrada de β -glicosidase no complexo celulolítico, característica natural de *Penicillium funiculosum* e outros *Penicillium* sp. quando comparado ao complexo de *Trichoderma reesei*, estas linhagens vêm despertando interesse como produtoras de celulases, sendo utilizadas para obtenção de mutantes (Joglekar & Kararanth, 1984; Brown *et al.*, 1986; Lachke *et al.*, 1986; Anwar *et al.*, 1996). Outro bom produtor natural de β -glicosidases é o *Penicillium pinophilum*, do qual também isolou-se mutantes. No Instituto de Biotecnologia-UCS uma linhagem de *Penicillium echinulatum* denominada 2HH, isolada do trato intestinal do coleóptero *Anobium punctatum* (Carrau *et al.*, 1981), está sendo utilizada para a obtenção de mutantes desreprimidos (Dillon *et al.*, 1992; Dillon *et al.*, 2006), chegando a valores de 1,3 FPU/mL, em fermentações em batelada com apenas 1% de substrato indutor.

Programas de mutagênese e seleção também foram aplicados em outros microrganismos como no actinomiceto *Thermonospora curvata* (Fennigton *et al.*, 1982), nos fungos *Talaromyces emersonii* (Moloney *et al.*, 1983) e *Humicola grisea* (Hayashiba, 1986).

Além de mutagênicos eficientes, uma boa metodologia para a produção de celulases é indispensável para o isolamento de hiperprodutores de celulases. A técnica de seleção de Montenecourt & Eveleigh (1977a) constituiu uma excelente contribuição para o melhoramento genético de microrganismos celulolíticos. A seleção de mutantes desreprimidos, realizada com utilização de 5% de glicerol em meio sólido para a inibição de halos, foi aperfeiçoada com o desenvolvimento de uma técnica de enriquecimento proposta por Farkas (1981). Esta prática baseia-se no cultivo submerso de conídios mutagenizados em 2% de celobiose ou carboximetilcelulose, na presença de 0,5% de 2-deoxyglicose como repressor catabólico. Os conídios resistentes ao repressor catabólico podem produzir enzimas necessárias para a hidrólise do substrato utilizado, sendo capazes de crescer nessas condições.

A alternativa de melhoramento de produção vegetal por meio de indução de autopoliplóides também mostrou-se adequada para microrganismos celulolíticos. Toyama & Toyama (1990, 1991, 1995) obtiveram aumentos da atividade celulolítica de 2,2 vezes para avicelase, 1,7 vezes na degradação de pó de celulose, 26,4 vezes para CMCases e 4,8 vezes de salicinasases, em poliplóides de linhagem QM6a de *T. reesei*. Os poliplóides foram obtidos por tratamento de conídios intumescidos em 0,1% de colchicina e os setores de clones poliplóides foram estabilizados por tratamento com benomil.

2.3. Genes envolvidos na produção de celulases e aplicações da biologia molecular na manipulação genética de microrganismos celulolíticos

Vários genes para celulases em diferentes microrganismos já foram clonados, sendo que os primeiros a serem estudados os de *T. reesei*, como genes de celobiohidrolases *cbh1* (Shoemaker *et al.*, 1983; Teeri *et al.*, 1983; Penttilä *et al.*, 1988) e *cbh2* (Penttilä, 1988); das endoglicanases *egl1* e *egl2* (Penttilä *et al.*, 1987; Arsdell *et al.*, 1987; Penttilä, 1988), da

endoglicanase *egl3* (Saloheimo *et al.*, 1988; Ward, 1993) e para *egl5* (Saloheimo *et al.*, 1994). O gene *bgl1* para a β -glicosidase de *T. reesei* foi primeiramente clonado pelo grupo da Genecor International, USA (Barnett *et al.*, 1991).

Obteve-se aumento na secreção de endoglicanase em *T. reesei* transformado com um plasmídeo, contendo uma construção onde cDNA de EGI foi ligado em seqüência ao promotor do gene *cbh1* e uma marca de seleção (*amdS*), gene para crescimento em acetamida como única fonte de carbono (Harkki *et al.*, 1990; Nevalainen *et al.*, 1990). Barnett *et al.* (1991) ao obter recombinantes com maior produção de β -glicosidases, aumentaram a capacidade hidrolítica de complexos enzimático de *T. reesei*.

Miettinen-Oinonen *et al.* (1997) introduziram o gene da fosfatase ácida de *Aspergillus* em *T. reesei* sobre controle do promotor de *cbh1*. Os melhores transformantes produziram cerca de 240 vezes mais fosfatases ácidas quando comparados com a linhagem de *Aspergillus* do qual o gene foi isolado.

Yoo & Pack (1992) obtiveram expressão de genes para endoglucanase e β -glicosidase em *Escherichia coli* após transformação de células com um vetor de dois cistrons. As células transformadas com este sistema produziram 12,4 U/mg de proteína de endoglicanase e 327 U/mg de proteína de β -glicosidase, após 3 horas de indução com isopropyl- β -D-thio-galactopyranoside (IPTG).

Miettinen-Oinonen & Suominen (2002) construíram linhagens de *T. reesei* por transformação gênica utilizando plasmídeo de *E. coli* como vetor para produção de quantidades elevadas de endoglicanase II (EGII) com ou sem o celobiohidrolase I (CBHI). Correlacionando a atividade da endoglicanase produzida pelos transformantes de EGII com o número da cópia de expressão *egl2*, foi observado que uma cópia de *egl2* sob efeito do promotor *cbh1* aumentou a produção de endoglicanase em 2,3 vezes, e que duas cópias

aumentaram a produção em aproximadamente 3 vezes, comparando com as linhagens parentais.

2.4. Fusão de protoplastos como método gerador do ciclo parassexual em microrganismos

Protoplastos são células sem parede celular, usualmente removida com enzimas, que podem ser utilizados para fusão de células ou transformação. Muitos trabalhos de isolamento de protoplastos de leveduras, fungos filamentosos e plantas já foram publicados. O sucesso do isolamento dos protoplastos de células microbianas envolve a digestão da parede celular por enzimas, permanecendo nas células componentes da membrana plasmática que são necessários para a manutenção em meio osmótico estável, para a sobrevivência dos protoplastos. A regeneração de protoplastos de fungos é importante para a formação da parede celular na morfogênese (Kim *et al.*, 2000).

Protoplastos de fungos são estruturas extremamente interessantes para estudos genéticos, pois podem ser fusionados e seus produtos de fusão podem ser novamente revertidos a células osmoticamente estáveis. Fusões intraespecíficas de protoplastos provindas de eficientes métodos de indução de ciclo parassexual mostram, em análises genéticas, que é viável obter boas linhagens por recombinação mitótica de diferentes gêneros e espécies. Fusões interespecíficas de protoplastos permitem a geração de diferentes tipos de híbridos, dependendo da compatibilidade somática e/ou nuclear. Cruzamentos entre espécies resultam na formação de estados haplóides recombinantes como consequência de processos genéticos similares aos ocorridos em ciclo parassexual intraespecíficos (Anne, 1983).

Em fungos filamentosos deuteromicetos, como *P. echinulatum* e *T. harzianum*, na falta da meiose, devido à inexistência de ciclo sexual, ou na fusão entre diferentes gêneros

ou espécies, a fusão de protoplastos é uma alternativa para gerar recombinantes genéticos. O processo inicia-se após indução da fusão de protoplastos (estruturas provenientes de hifas, as quais passaram pela remoção de suas paredes celulares após tratamento com enzimas hidrolíticas) com a formação de heterocários (estruturas unicelulares ou filamentosas constituídas de núcleos distintos). No heterocáριο, a disposição de núcleos distintos em um mesmo citoplasma pode desencadear efeitos como diploidização transitória, recombinação mitótica e haploidização, mas sem a existência de meiose.

Atualmente, já é bem estabelecido que a meiose, ciclo parassexual ou a fusão de protoplastos não são estratégias recomendadas quando o interesse é a simples transferência de genes específicos, visto que não se trata de uma metodologia onde a transferência gênica pode ser dirigida. Nesta situação, é indicada a utilização das técnicas de transformação gênica, que são eficientes para clonagem e expressão de diferentes genes. Entretanto, a meiose, ciclo parassexual ou a fusão de protoplastos podem ser alternativas metodológicas quando o interesse é transferir ou mesmo recombinar características poligênicas ou múltiplas características, que resultam quase sempre na formação de grande variação entre os genótipos (Dillon, 2000).

Zhang *et al.* (2002) demonstraram que a junção das técnicas de melhoramento genético por mutagênese seguida por fusão de protoplastos recursivas, é muito eficiente e mostra resultados mais rápidos do que as técnicas convencionais de mutagênese e seleção. Neste trabalho conseguiu-se um melhoramento rápido na produção de tilosina, um antibiótico contra bactérias gram-positivas, por meio do “shuffle”, embaralhamento do DNA inteiro através de mutagênese e sucessivos cruzamentos multiparentais por fusão de protoplastos de *Streptomyces fradiae*. Comparou-se então, esta nova técnica com o método convencional e observou-se que, em 1 ano, o embaralhamento genômico conseguiu 2

linhagens (GS1 e GS2) com produção de tilosina semelhante à da linhagem SF21, obtida por melhoramento clássico durante mais de duas décadas.

O isolamento e a regeneração de protoplastos de fungos é um passo fundamental para o estabelecimento de sistemas de transformação, análise de cariótipo molecular e fusão entre linhagens, que são técnicas de ampla aplicação em programas de melhoramento em fungos filamentosos.

Araújo *et al.* (1997) definiram condições ideais para produção e regeneração de protoplastos de *P. expansum* e *P. griseoroseum*, conseguindo aproximadamente 50% de regeneração. Varavallo *et al.* (2004) estudaram a técnica de isolamento e regeneração de protoplastos como forma de obter um protocolo para posterior fusão entre linhagens de *P. brevicompactum*, excelente produtor de pectinases. Um trabalho semelhante foi realizado por Song *et al.* (2004) com linhagens de *P. digitatum*, em que estudou-se os efeitos de alguns fatores importantes para obtenção e regeneração de protoplastos, como o controlador osmótico e sua concentração, a enzima lítica, sua concentração e tempo de ação. Marchi *et al.* (2006) realizam estudo semelhante com o fungo ascomiceto *Botryosphaeria* spp. causador de cancro em *Eucalyptus* spp., avaliando a enzima, sua concentração, o estabilizador osmótico e o tempo de protoplastização.

Lakshmi & Chandra, em 1993, compararam a obtenção de protoplastos de *Eremothecium ashbyii*, *T. reesei* e *P. chrysogenum*, utilizando as preparações comerciais Novozyme 234 e Funclase, e testaram diferentes estabilizadores osmóticos como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl, NaCl, MgCl_2 e sacarose, em diferentes osmolaridades, tanto na obtenção quanto na regeneração dos protoplastos. A protoplastização em *T. reesei* e *P. chrysogenum* mostrou-se mais eficiente com a enzima Novozyme 234, sendo que para o primeiro, houve maior liberação e regeneração usando como estabilizador o KCl 0,7M (frequência de

regeneração de 38,11%), já para o segundo o mesmo ocorreu com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,7M (frequência de regeneração de 21,44%).

Solís *et al.* (1997) obtiveram quatro híbridos prototróficos interespecíficos entre mutantes auxotróficos de *Aspergillus* sp. e *A. flavipes* para melhorar a produção de pectinases. A maior produção foi observada no híbrido HJ com atividades máximas maiores que os parentais, 150% para endo-pectinase e 160% para pectina-liase.

Martins *et al.* (1998) conseguiram linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com duas importantes características para a indústria vinícola, floculação e ausência de H_2S , por meio de fusão de protoplastos.

Khattab & Bazaraa (2005) realizaram um estudo completo desde o “screening”, mutagênese e fusão de protoplastos de diferentes linhagens de *A. niger* para melhorar a produção enzimática extracelular de glicose oxidase, obtendo através dos três cruzamentos realizados 36 fusionantes, com melhoramento na produção de mais de três vezes, comparando com o tipo selvagem.

A técnica de fusão de protoplastos entre linhagens mutantes morfológicos e auxotróficos complementares, *P. griseoroseum* e *P. expansum* com a indução por PEG e Ca^{2+} (Varavallo, 2007) foi utilizada para melhorar a produção de pectinases. O fusionante prototrófico não apresentou aumento na produção destas enzimas, entretanto, entre os 29 recombinantes analisados, quatro mostraram maiores atividades enzimáticas, destacando-se o recombinante RGE27, semelhante ao parental *P. griseiroseum*, que teve um aumento de 3 vezes na produção de poligalacturonases e 1,2 vezes na produção de pectina-liase.

A fusão de protoplastos também pode ser empregada para melhorar as características de controle biológico de determinados fungos, também denominados antagonistas, devido ao incremento na produção enzimática. Ogawa *et al.* (2000) fusionaram

linhagens de *T. harzianum*, uma delas resistente a benomil, para melhorar o crescimento e esporulação desta linhagem e avaliaram a manutenção da sua atividade de controle biológico. Ensaio feitos contra os fitopatógenos *Fusarium oxisporum* e *Pyricuraria orizae*, em cultivos de rabanete amarelo, demonstraram que conseguiram obter um diplóide com as características desejadas. Prabavathy *et al.* (2006) aplicaram a técnica de “self-fusion”, fusão sobre si mesmo, na linhagem PTh18 de *T. harzianum* para aumentar a produção de quitinases e assim a atividade de controle biológico, e obtiveram 15 fusionantes, sendo que destes destacou-se o SFTh8, com o dobro de atividade de quitinase e inibição total do crescimento do fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Hanson & Howell (2002) também utilizaram a fusão de protoplastos, entre *T. koningii* e *T. virens*, para obter melhoria na eficácia da característica de controle biológico de *R. solani* em culturas de algodão.

Outra técnica que possibilita a obtenção de recombinantes somáticos é a anastomose de hifas. Barcellos & Pizzirani-Kleiber (2003) estudaram esses processos de recombinação em *T. pseudokoningii*, com o objetivo de aperfeiçoar métodos de cruzamento inter e intra-linhagens, utilizados em programas de melhoramento genético.

2.5. A fusão de protoplastos aplicada a microrganismos celulolíticos

A técnica de fusão de protoplastos utilizando microrganismos celulolíticos teve início com Manczinger em 1981 e Manczinger & Ferenczy em 1984 (Manczinger & Ferenczy, 1985), quando obtiveram heterocários, através de fusão de protoplastos, resultantes do tratamento enzimático de micélios de linhagens de *T. reesei*.

Uma nova metodologia para fusão de protoplastos envolvendo microrganismos celulolíticos foi introduzida por Toyama *et al.* (1983 e 1984) na qual esferoplastos foram obtidos diretamente de conídios imaturos. Neste trabalho, obteve-se resultados interessantes,

como a constatação de setores negativos para a produção de celulases provenientes de parentais celulases positivos e também segregantes com duas vezes a atividade de celulases de um dos parentais auxotróficos, sendo que um dos parentais era celulase negativo.

Um método elegante para seleção de produtos de fusão na linhagem mutante para a produção de celulases QM9414 de *T. reesei* foi utilizado por Manczinger & Ferenczy (1985). Este método consistiu em enriquecer heterocários que contivessem núcleos resultantes de cariogamia (sincários) utilizando sistemas de filtração que retinham hifas.

Ogawa *et al.* (1987) utilizaram, para obter produtos de fusão entre linhagens de *Trichoderma reesei*, mutantes com conídios de cor branca e marrom, cujas frequências de reversão eram menores que 1×10^{-6} . Ogawa *et al.* (1989) realizaram hibridização através de fusão de protoplasto entre uma linhagem de *T. reesei* QM9414, deficiente para metionina, e uma linhagem deficiente para lisina de *T. reesei* QM 9136, com baixa produção do complexo celulase, obtendo frequências de fusão de $3,33 \times 10^{-2}$. Ambas as técnicas utilizadas para selecionar recombinantes, seja por cor de conídios ou deficiência nutricional, mostraram-se eficientes na seleção de heterocários e fusionantes.

Kolar *et al.* (1985) obtiveram protoplastos da linhagem QM 9414 de *T. reesei*, utilizando a enzima comercial Novozym 234 e estabilizador osmótico 0,9M de KCl. Mais de 95% dos protoplastos foram viáveis e mostraram-se metabolicamente intactos e foram induzidos com sofrorose para a produção de carboximetilcelulase e β -glicosidase. Pode-se observar pelo menos sete picos de atividades enzimáticas para ambas as enzimas que foram detectados para estas enzimas por cromatografia em diferentes pHs.

Hoh *et al.* (1992) fusionaram mutantes autotróficos de *A. niger* produtores de β -glicosidase e após a indução de haploidização por benomil de um diplóide, vários segregantes mostraram combinações das marcas genéticas dos parentais. Entre os

segregantes haplóides, quatro apresentaram atividade de β -glicosidase superior aos parentais, tendo o melhor um aumento de 2,5 vezes na atividade enzimática com relação ao parental com maior produção.

Kumari & Panda (1994) realizaram hibridização intergenérica entre *T. reesei* QM 9414, hiperprodutor de celulasas, e *S. cerevisiae* NCIM 3288, importante produtor de etanol a partir de sacarose, tendo como objetivo gerar um fusionante para produção de etanol diretamente de material celulósico. A frequência de fusão foi de 0,6% e foram obtidos ao todo 201 fusionantes com variação morfológica, sendo 170 relativamente estáveis. Dois fusionantes (M14 e M62) mostraram produção de etanol a partir de papel filtro 0,0149 e 0,0191 g/L, respectivamente, e produção de CMCase semelhante ao parental *T. reesei*.

Dillon (2000) buscou obter recombinantes por fusão de protoplastos, de maior produção de celulasas, entre linhagens mutantes de *P. echinulatum* e *T. harzianum*. Estudos de secreção de celulasas mostraram variação na produção de FPAases e β -glicosidase em cinco clones obtidos de heterocários, todos com morfologia semelhante a do parental *P. echinulatum*. Destacou-se o clone BP2 com níveis de FPAases significativamente mais elevados, em cultivo submerso e de β -glicosidase, em cultivo semi-sólido.

Prabavathy *et al.* (2006) utilizaram a fusão de protoplastos, com polietilenoglicol (PEG), entre linhagens de *T. reesei* para melhorar a atividade de carboximetilcelulose, usando meio de seleção ágar CMC. Avaliaram, inicialmente, os halos de hidrólise produzidos pelos fusionantes e, após, por análise quantitativa, estimaram um incremento de cerca de 80% na atividade de CMCase, em duas linhagens fusionantes, comparando com os parentais.

2.6. Fusão de protoplastos: uso da técnica do “doador morto”

Geralmente, para a aplicação da estratégia de fusão de protoplastos torna-se necessária a utilização de mutantes auxotróficos ou de linhagens mutantes resistentes a fungicidas, para seleção dos produtos de fusão (Peberdy, 1989). Em ambos os casos, as linhagens parentais têm de ser mutadas para obter estes marcadores apropriados, mas diminuições da produção de compostos de interesse são frequentemente observadas.

Uma técnica que tem sido utilizada, também como forma de seleção, é a do “doador morto”, na qual uma das linhagens, com características específicas a ser utilizada na seleção, é inativada por luz ultravioleta, por choque de temperatura ou por substâncias tóxicas e seus protoplastos são fundidos com outros, de linhagem auxotrófica ou sensível a um inibidor. A seleção é feita em meio mínimo ou contendo o inibidor, nos quais a auxotrófica ou a sensível não podem crescer e a prototrófica ou resistente, estando inativada (sem conseguir regenerar sua parede celular), também não crescem, resultando apenas no crescimento dos produtos de fusão. Esta técnica tem sido aplicada com mais sucesso em bactérias do que em fungos filamentosos (Azevedo, 1998).

A fusão de protoplastos inativados por calor tem sido utilizada por vários autores, principalmente em bactérias, como *Bacillus megaterium*, *Streptomyces parvulus*, *Streptomyces fradiae* (Fodor *et al.*, 1978; Ochi, 1982; Baltz, 1978, respectivamente).

Meza *et al.* 1995, foi o primeiro a utilizar a técnica do doador morto tendo a marca de resistência a benomil como estratégia de seleção em microorganismos produtores de celulases. Neste trabalho, buscaram obter recombinantes por fusão de protoplastos, utilizando uma linhagem de *T. reesei* portadora de marca de resistência para benomil que teve seus protoplastos inativados com calor, à temperatura de 60°C, por 8 minutos, e, após, fusionados com protoplastos viáveis e osmossensíveis de outra linhagem sensível ao inibidor benomil. Foram selecionados fusionantes resistentes a concentrações de até 250 µg/mL de

benomil, de bom crescimento e esporulação normal, sendo que 20 fusionantes apresentaram índices de halo de hidrólise de celulose em placas de Petri maiores ($p < 0,05\%$) em comparação as linhagens parentais, mostrando ser possível utilizar a inativação por calor em protoplastos e transferir a marca de resistência ao benomil por esta técnica, juntamente com a fusão de protoplastos, podendo ainda gerar variabilidade na produção de enzimas, como as celulasas.

2.7. Caracterização molecular de produtos de fusão de protoplastos

A caracterização molecular de indivíduos, populações ou linhagens obtidas por fusão de protoplastos, por meio de marcadores de DNA ou através de eletroforese de cromossomas, trata-se de um estudo relevante, pois permite detectar divergências genéticas e a ocorrência de eventos de recombinação, para confirmar a variação gênica.

A técnica de PCR e seu variante AP-PCR ou RAPD mostrou-se adequada para diferenciar linhagens de uma mesma espécie, como observado por Kwan *et al.* (1992), em *Lentinula edodes*, conhecido como “Shiitake”.

Eventos de recombinação foram detectados com uma sonda correspondendo ao gene LEU2, que hibridizou com fragmentos obtidos por tratamento com a enzima de restrição Hind III, extraídos de fusionantes entre *Kluyveromyces fragilis* e *Saccharomyces cerevisiae*. As hibridizações com a sonda mostraram três locus no genoma fusionante, sugerindo que este era portador do genoma de ambos os parentais (Farahnak *et al.*, 1986).

Martins *et al.* (1999) caracterizaram geneticamente as linhagens parentais de *Saccharomyces cerevisiae*, importantes industrialmente, seus produtos de fusão de protoplastos e seus segregantes utilizando a cariotipagem eletroforética, pelo método CHEF,

separando bandas cromossômicas, e a técnica RAPD com o uso de dois “primers”, obtendo um padrão de fragmentos da amplificação do DNA.

A técnica de amplificação de DNA através de “primers” não específicos (RAPD) foi aplicada com sucesso para estudar eventos de recombinação ocorridos no ciclo parassexual em *Penicillium roqueforti* (Durand *et al.*, 1993). Os protoplastos fusionados através de PEG foram obtidos de linhagens transformadas com gene para resistência à higromicina B e para o gene da bleomicina. Os heterocários foram selecionados em meio contendo ambos os antibióticos. Os “primers” geraram grupos de produtos entre 0,5 e 3 Kb. As linhagens parentais geraram idênticos locus amplificados que também foram vistos nos produtos de fusão. Entretanto, estes amplificaram múltiplos locus polimórficos diferenciados entre as linhagens recombinantes. Um fragmento de 2,6 Kb gerado por um dos “primers” (P1) esteve presente em uma linhagem com dupla resistência e em um duplo sensível, mas não foi encontrado nas linhagens parentais. Um outro primer (P3), mostrou a formação de fragmentos de 2,18 Kb encontrados em todas as linhagens, mas ausente em uma das resistentes à bleomicina. Um outro fragmento de 0,7 Kb, presente nas linhagens parentais, não foi detectado em dois dos segregantes analisados. Neste trabalho, os autores sugerem o surgimento ou o desaparecimento de novos sítios de anelamentos de primers, como decorrência de processos recombinantes durante o ciclo parassexual.

Kishida *et al.* (1996) aplicaram as técnicas de eletroforese em campo pulsado para separação de cromossomos em híbridos obtidos por fusão de protoplastos entre *Saccharomyces fibuligena* e *S. diastaticus*, e, adicionalmente, associaram a hibridização com sondas para genes de α -amilase e glucoamilase. Verificaram a existência de cromossomos quiméricos como resultado de rearranjos ou recombinação, observados devido a pequenas diferenças de deslocamento nos cromossomos dos híbridos nas eletroforeses, e nas hibridizações a existência de deleções ou duplicações nos genes estudados.

A eletroforese em campo pulsado também permitiu mostrar, no trabalho de Vazquez *et al.* (1997), a existência de cromossomos não parentais, de tamanho semelhantes aos de *Pichia stipitis*, em híbridos obtidos da fusão de protoplastos desta levedura com núcleos de *T. reesei* ou de *Fusarium moniliforme*. Neste trabalho, não foram detectados nos híbridos cromossomos intactos de fungos.

Em outros trabalhos, a técnica de RAPD foi utilizada para diferenciar variedades de cogumelo *Volvariella* (Chiu *et al.*, 1995), para caracterização de híbridos obtidos por fusão de protoplastos entre cogumelos *V. volvacea* e *V. bombycina* (Zhao e Chang, 1997) e para caracterizar geneticamente recombinantes em *T. pseudokoningii* (Silva, 1996).

Dillon (2000) observou que o perfil de bandas de eletroforese de segmentos de DNA, amplificados com primers arbitrários, podem detectar alterações no DNA de fusionantes entre *P. echinulatum* e *T. harzianum*, inclusive detectando eventos de recombinação de segmentos de DNA. Produtos de fusão entre estes dois gêneros apresentaram, com alguns primers, perfis de bandas semelhantes ao apresentado pelo parental *P. echinulatum*, dados que corroboram os observados na análise morfológica.

Hanson & Howell (2002) conseguiram diferenciar as linhagens parentais de *T. koningii* e *T. virens*, usadas em biocontrole de fitopatógenos, de seus produtos de fusão utilizando a técnica de RAPD, e observaram que o padrão de bandas dos fusionantes obtidos entre estas duas espécies, foi similar ao seu comportamento morfológico.

Góes *et al.* (2002) verificaram a variabilidade genética de isolados de *Trichoderma*, utilizando a técnica RAPD e avaliaram seu potencial antagônico contra *Rhizoctonia solani*, investigando a possível relação entre os perfis de bandeamento por RAPD e o padrão de capacidade antagonista destes isolados. Chen *et al* (1999) usaram RAPD para estimar a variação genética de isolados de *Trichoderma* associados com *Agaricus bisporus*. Sariah *et al* (2005) caracterizaram através da técnica RAPD quatro espécies de *Trichoderma* spp. de

diferentes ecossistemas, utilizadas como controle biológico de *Ganoderma boninense* crescidos em palmeiras.

Três técnicas foram empregadas por Mostafa *et al.* (2002) para diferenciar isolados de *F. oxysporum* em altamente virulento (HV) e fracamente virulento (WV): amplificação de DNA genômico por primers randômicos (RAPD), atividade enzimática e determinação do tamanho das colônias. Análise de cluster dos dados de RAPD permitiram discriminar os tipos HV e WV, resultados corroborados pela velocidade de crescimento e produção de enzimas.

Taski-Adjukovic *et al.* (2006) confirmaram a formação de híbrido somáticos regenerados, após fusão de protoplastos, de *Helianthus annuus* e *Helianthus maximiliani* (resistente ao fungo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotium*) por meio de análise de RAPD.

Marcadores moleculares foram utilizados por Pereira *et al.* (2002) para analisar a divergência genética entre as dez espécies de *Penicillium* através de duas análises moleculares, provando-se que a técnica RAPD é mais eficiente em comparação ao RFLP.

Cardoso *et al.* (2007) caracterizaram morfologicamente e molecularmente as espécies de *P. expansum* e *P. griseoroseum*. Variações na morfologia e coloração de conídios foram observadas entre os isolados. A caracterização molecular foi baseada em marcadores RAPD, sequenciamento da região do espaçador interno transcrito do DNA ribossomal e “fingerprining” telomérico. Dos 78 primers utilizados, 8 apresentaram 54% de fragmentos de DNA polimórficos. Observou-se, também, a ocorrência de polimorfismos na organização da região subtelomérica no genoma destes fungos e estimou-se um número mínimo de três cromossomos para estas espécies.

A análise de RAPD, juntamente com o desenvolvimento de técnicas de isoenzimas de celulasas, carboximetilcelulase e β -glicosidase, foi descrita por Ai *et al.* (1998), como

eficientes para caracterizar três recombinantes estáveis obtidos por fusão de protoplastos e seus parentais *A. niger* e *T. reesei*.

A partir destes trabalhos, pode-se constatar que a fusão de protoplastos não é um mecanismo dirigido que permita criar conjuntos gênicos específicos. Entretanto, é uma alternativa de indução de processos recombinantes, pois ao formar diplóides transitórios, pode ser desencadeadora de eventos que resultem em combinações gênicas favoráveis por recombinação mitóticas, seguidas de haploidização aleatória de cromossomos. Assim, para que a fusão de protoplasto tenha o êxito esperado, precisa-se desenvolver sistema de seleção eficientes para que sejam obtidos genótipos particulares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens

Foram utilizadas duas linhagens obtidas por sucessivos tratamentos mutagênicos com UV 425nm e H₂O₂, a partir das linhagens 2HH de *Penicillium echinulatum*, isolada em 1979 do trato intestinal do coleóptero *Anobium punctatum*, e 5A de *Trichoderma harzianum*, isolada em 1981 do trato intestinal do coleóptero *Passalus binominatus erosus*, no Instituto de Biotecnologia (IB) da Universidade de Caxias do Sul (UCS). A linhagem mutante parcialmente desreprimida para produção de celulases de *P. echinulatum* empregada neste trabalho foi a 9A02**S1B9**, a ser chamada S1B9, portadora de resistência ao fungicida benomil, derivada da linhagem mutante 9A02**S1**, DSM 18942 (Dillon *et al*, 2006), que tem capacidade hidrolítica equivalente aos melhores mutantes de *T. reesei*, com a vantagem de ter maior atividade de β-glicosidase (Dillon, 2000; Dillon *et al*, 2006). A fusão de protoplastos foi realizada com uma linhagem mutante de *T. harzianum* **AS5CH3**, a ser chamada AS5, caracterizada como sensível ao fungicida benomil (Dillon, 2000), e por apresentar rápido crescimento. Ambas pertencentes à coleção de microrganismos celulolíticos do Laboratório de Enzimas e Biomassa do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

3.2. Meios e Soluções

3.2.1. Solução concentrada dez vezes de nutrientes e micronutrientes (MTV)

A solução de nutrientes (MTV) utilizada como fonte de sais minerais em meios de cultivo foi baseada na formulação de Mandels & Reese (1957): KH_2PO_4 (20 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (14 g/L), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (3 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3 g/L), CaCl_2 (3 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05 g/L), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,0156 g/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,014 g/L) e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0020 g/L).

3.2.2. Suspensão 2,5% de celulose intumescida

Para preparação da suspensão de celulose intumescida utilizada como fonte de carbono nos meios de crescimento em placas de Petri, foram utilizados 5g de celulose (Celufloc 200, Celulose e Amido Ltda.), 60 mL de água destilada e 20 esferas de vidro de 3 mm de diâmetro, dispostos em um Erlenmeyer de 500 mL. Este foi agitado a 180 rpm durante 48 horas, para o intumescimento das fibras de celulose, e após adicionados 140 mL de água destilada e mantido a 4°C.

3.2.3. Meio sólido para crescimento e manutenção das linhagens (MSC)

O meio sólido utilizado para o crescimento e manutenção das linhagens foi constituído da suspensão 2,5% de celulose intumescida (500 mL/L), MTV (100 mL/L) e ágar (20 g/L).

3.2.4. Meio líquido de crescimento para obtenção de micélio para protoplastos (MLC)

O meio líquido utilizado para a obtenção de micélio fúngico para posterior liberação de protoplastos foi constituído de MTV (100 mL/L), glicose (10 g/L), peptona (2 g), gentamicina (0,0044 mg/L).

3.2.5. Meio líquido de crescimento para produção de solução lítica (SL) usada na liberação de protoplastos (MLSL)

O meio líquido utilizado para produção de solução lítica (SL) por *T. harzianum*, usada na liberação de protoplastos, foi constituído de micélio seco de *Agaricus blazei* (3 g/L), micélio seco de *P. echinulatum* (3 g/L), micélio seco de *A. niger* (3 g/L), quitina SIGMA C7170 (1 g/L) e MTV (100 mL/L).

3.2.6. Meio de crescimento para a observação de hidrólise da celulose (MGS)

O meio de crescimento utilizado para a observação de halo de hidrólise da celulose em placas de Petri, sem o inibidor benomil, foi constituído da suspensão 2,5% de celulose intumescida (670 mL/L), MTV (90 mL/L), peptona (1 g/L), extrato de levedura (1 g/L), ágar (20 g/L), gentamicina (0,0044 mg/L). Este meio também pode ser composto por TritonX100 (1,5 mL/L) e glicose (3 g/L), quando necessário.

3.2.7. Meio de crescimento para a observação de hidrólise com benomil (MBGS)

O meio de crescimento utilizado para a observação de halo de hidrólise da celulose em placas de Petri, com o inibidor benomil ((methyl 1-(butylcarbomoil)-2-(benzimidazole-carbamate) correspondente ao fungicida Benlate da DuPont) para seleção e estabilização dos

produtos de fusão, foi constituído da suspensão 2,5% de celulose intumescida (670 mL/L), MTV (90 mL/L), peptona (1 g/L), extrato de levedura (1 g/L), ágar (20 g/L), gentamicina (0,0044 mg/L) e benomil (12 µg/mL). Este meio também pode ser composto por TritonX100 (1,5 mL/L) e glicose (3 g/L), quando necessário.

3.2.8. Meios líquidos para produção de celulasas (MLP1 e MLP2)

O meio líquido MLP1 utilizado para avaliar a produção de celulasas em cultivo submerso (CS), (Dillon *et al.*, 2006), foi constituído de MTV (100 mL/L), Tween 80 (1 mL/L), peptona (1g/L) e celulose microcristalina celulofloc 200 (Celulose e Amido Ltda.) (10 g/L). Em alguns experimentos este meio foi alterado para MLP2, composto por MTV (200 mL/L), água destilada (800 mL/L), Tween 80 (1 mL/L), farelo de soja (2 g/L), farelo de trigo (5 g/L) e celulose microcristalina celulofloc 200 (Celulose e Amido Ltda.) (10 g/L).

3.2.9. Meio sólido para produção de celulasas (MSP)

O meio sólido utilizado para avaliar a produção de celulasas em cultivo em estado sólido (CES) foi constituído de farelo de trigo (1 g) e MTV (1 mL).

3.2.10. Soluções enzimáticas para obtenção de protoplastos

Nos experimentos de fusão realizados entre a linhagem de *P. echinulatum* S1B9 e a linhagem de *T. harzianum* AS5, foram utilizados diferentes tratamentos com enzimas hidrolíticas para quebra da parede celular dos fungos, com o objetivo de observar as condições que resultam em maior liberação de protoplastos e em menor tempo, o que facilita a regeneração dos mesmos.

Usou-se o complexo enzimático Glucanex® (Novo Nordisk, Dinamarca), contendo enzimas hidrolíticas β -glicanase, celulase, protease e quitinase de *T. harzianum*, usado na indústria de vinho para degradação de glucanos de *Botrytis cinerea*, sendo possível degradar quitina e glucanos presentes na parede celular do fungo, numa concentração de 0,01 g/mL diluída em KCl 0,6M, em tampão citrato 0,05M pH 4,8 adicionando-se gentamicina numa concentração final de 0,0044%.

Com a finalidade de obter uma opção ao tratamento dos protoplastos com produto comercial, experimentou-se produzir um filtrado enzimático, obtido pelo crescimento da linhagem 5A de *T. harzianum* em meio MLSL, contendo como fonte de carboidratos e proteínas o micélio seco de diferentes fungos para induzir a produção de enzimas capazes de degradar a parede celular de outros fungos. Diferentes volumes desta solução lítica (SL) foram testados para verificar a melhor liberação de protoplastos, sendo sempre diluída em KCl 0,6M, em tampão citrato 0,05M pH 4,8, chegando-se a um volume final de 5 mL, em todos os tratamentos.

3.2.11. Solução fusionante

A solução fusionante utilizada para induzir a fusão entre os protoplastos foi preparada pela dissolução de 8,57 g de PEG 4000 em 10 mL de solução de CaCl_2 0,1M e pela adição de 10 mL de solução de glicina 0,5M.

3.2.12. Meio líquido de regeneração

O meio líquido utilizado para a regeneração dos protoplastos de *P. echinulatum* foi constituído de solução KCl 0,6M em tampão citrato 0,05M pH4,8, descrita por Manczinger & Ferenczy (1985). Para os protoplastos de *T. harzianum* o meio líquido empregado para

regeneração da parede celular foi constituído de MTV (100 mL/L), glicose (10 g/L), peptona (1 g/L) e extrato de levedura (1 g/L), utilizando como estabilizador osmótico solução KCl 0,6M em tampão citrato 0,05M pH4,8.

3.3. Procedimento Experimental

3.3.1. Crescimento e manutenção de linhagens

As culturas foram desenvolvidas em tubos de ensaio contendo o meio sólido MSC inclinado, incubadas por 7 dias a 28°C até a formação de conídios. Os tubos foram estocados a 4°C ou diretamente usados para a preparação de suspensões de conídios para crescimento de micélio utilizado na obtenção de protoplastos.

3.3.2. Produção de solução lítica usada na liberação de protoplastos (SL)

A solução lítica (SL), para a obtenção de protoplastos de micélio fúngico, foi obtida após o crescimento fúngico em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 ml do meio MLSL. Os frascos foram inoculados com suspensão de 1×10^7 conídios da linhagem 5A de *T. harzianum* sendo mantidos a 28°C e agitados a 180 rpm, até 5º dia. Ao término deste período, o conteúdo dos frascos foi filtrado em papel de filtro Whatman nº1 e, após, centrifugado a 3000 rpm, ficando-se com o sobrenadante para ser testado como solução lítica na liberação de protoplastos.

3.3.3. Obtenção de protoplastos

Micélios úmidos das linhagens S1B9 de *P. echinulatum* e AS5 de *T. harzianum* foram obtidos pelo crescimento em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de MLC. A suspensão de conídios para o inóculo foi obtida pela disposição de 2 mL de salina esterilizada em tubos inclinados de meio sólido contendo as respectivas linhagens. Após agitação em Vortex o volume líquido foi transferido para os frascos com meio MLC. Estes permaneceram a 28°C, em agitação de 180 rpm, por 20 horas. O micélio resultante foi filtrado em papel de filtro Whatman n°1, com o auxílio da bomba de vácuo e lavado duas vezes com solução salina. De cada linhagem foi retirado 0,2g de micélio úmido que foi transferido para frascos de vidro esterilizados distintos. O tratamento enzimático foi desenvolvido pela adição de 5 mL de solução enzimática (Glucanex ® ou SL, diluídas em KCl 0,6M) aos frascos contendo o micélio úmido. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 130 rpm, a 34°C por 3 a 5 horas. Os protoplastos liberados foram filtrados com tecido duplo de poliéster, de poros menores que 10 µm e lavados uma vez com KCl 0,6 M, por centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos. O precipitado (protoplastos) foi ressuspensão em 5 mL de KCl 0,6M para cada uma das linhagens.

3.3.4. Fusão de protoplastos utilizando a técnica do doador morto

Os protoplastos do parental *P. echinulatum* S1B9, resistente ao benomil, foram inativados com calor (60°C), em banho-maria, por 20 minutos, condição que leva a incapacidade de formação de colônias em meio sólido. Após o tratamento térmico, 3 mL da suspensão de protoplastos de S1B9 foram adicionados ao tubo contendo 3 mL da suspensão de AS5, parental *T. harzianum* sensível ao benomil. Os 2 mL restantes das suspensões de S1B9 e AS5 foram colocados em estufa a 28°C por 24 horas, para controle. A mistura das suspensões de protoplastos foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. Ao precipitado, após

o descarte do sobrenadante, foram acrescentados 2 mL da solução fusionante, permanecendo na estufa por 10 minutos a 28°C. O tubo foi completado com 4 mL de KCl 0,6 M e a solução fusionante foi separada por centrifugação (3000 rpm por 10min). O precipitado foi ressuspensão em 2 mL do meio de regeneração e foi adicionado 0,1 mL de uma solução de gentamicina 0,44%. O tubo foi mantido em estufa a 28°C por 24 horas, para haver a regeneração da parede celular dos protoplastos. Estas suspensões foram plaqueadas em meio MBGS (com inibidor benomil), para a seleção dos recombinantes. As suspensões controle de protoplastos de S1B9 foram plaqueadas em MGS para confirmar a inativação; já as suspensões controle de protoplastos de AS5 foram plaqueadas em MBGS para confirmar a inexistência de mutação espontânea para resistência ao benomil.

3.3.5. Caracterização, seleção e estabilização de possíveis heterocários

Verificou-se a existência de heterocários ou de monocários em algumas colônias obtidas de experimentos de fusão de protoplastos, entre as linhagens de *P. echinulatum* (S1B9) e *T. harzianum* (AS5), crescidas em meio com inibidor benomil MBGS. A partir dos micélios foram feitas suspensões de conídios que foram espalhadas sem diluição e com diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000 em placas de Petri, contendo o meio MBGS, sendo em seguida, as colônias repicadas em MBGS (subclones), os quais passaram por repiques sucessivos em meio MGS (sem inibidor) para selecionar os clones que preservaram a característica de continuarem a crescer e esporular bem, em meio com o inibidor benomil MBGS, e, principalmente, para estabilizar geneticamente os clones.

Durante a caracterização das colônias foram observadas a morfologia, a formação de setores, a esporulação, a velocidade de crescimento e principalmente a formação de halo de hidrólise de celulose, sendo selecionadas as colônias com maior relação halo/colônia. As colônias selecionadas passaram por sucessivos repiques a partir de suspensões de esporos, e

plaqueadas em meio com e sem benomil, para estabilização. Quando as mesmas não apresentaram mais setores, condição que sugeria estabilidade, foram submetidas à avaliação da produção de celulasas qualitativamente, em placas de Petri, com medidas de crescimento e formação de halo de hidrólise de celulose, e quantitativamente em cultivo submerso e cultivo em estado sólido, para avaliação e comparação da dosagem enzimática de celulasas dos produtos de fusão entre si e entre os parentais.

3.3.6. Teste de variabilidade para resistência ao benomil

Para testar a variabilidade em relação à resistência e à sensibilidade ao inibidor benomil foram selecionadas algumas linhagens representantes dos prováveis heterocários, com morfologia semelhante ao parental *T. harzianum*, sensível ao inibidor, em baixas concentrações, inferiores a 12 µg/mL. Realizaram-se repiques em placas de Petri contendo meio sem benomil (MGS) e com diferentes concentrações de benomil (25, 50, 75 e 100 µg/mL). A avaliação foi realizada com base no crescimento radial das colônias (cm), na sua morfologia e esporulação, observando-os diariamente, até o 8º dia.

3.3.7. Caracterização molecular

A caracterização por marcadores moleculares de DNA foi realizada pela técnica de RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), utilizando o protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia (1996), com algumas modificações. Com a aplicação desta metodologia espera-se ter indicações da ocorrência de eventos recombinantes durante a formação dos clones obtidos por fusão de protoplastos.

Extração do DNA: Após o cultivo do micélio fúngico, a suspensão foi filtrada em papel filtro Whatman nº1, com o auxílio da bomba de vácuo, e lavada uma vez com solução salina. Após, o micélio foi transferido para um almofariz ao qual foi adicionado nitrogênio líquido, sendo macerado com um pistilo, até a formação de um pó fino. Em seguida, 100 mg de micélio macerado foi disposto em um eppendorf de 1,5 mL e homogenizando com 400 µl de solução tampão de extração (Tris-HCL 200 mM, pH 7,5; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,1% e H₂O) permanecendo por 15 minutos em banho-maria a 65°C, com agitação manual periódica. Posteriormente, a este volume foi acrescentado 500 µl da solução de clorofane (fenol tamponado, clorofórmio, álcool isoamílico; 25 : 24 : 1), sendo a mistura homogeneizada e centrifugada por 10 minutos a 14000xg. Desta solução, a fase superior foi coletada e transferida para um novo eppendorf, acrescentando-se o mesmo volume da solução de clorofil (clorofórmio e álcool isoamílico, 24 : 1), sendo novamente centrifugada por 10 minutos a 14000xg. Após retirar o sobrenadante e transferi-lo para um novo eppendorf, foram adicionados 3 µl de RNAases (20 UI/ml), permanecendo em banho-maria por 40 minutos a 37°C. Na seqüência, foram acrescentados dois volumes de etanol absoluto a 0°C e NaCl 5M para uma concentração final de 0,3M, esta mistura foi mantida a -20°C overnight (aproximadamente 12 horas). A seguir, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 14000 xg, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70%, invertendo-se os tubos para secagem. Após a secagem, de aproximadamente 1 hora, foi adicionado ao pellet 100µL tampão Tris-HCl-EDTA pH 8 e a mistura foi conservada a -20°C.

Visualização do DNA extraído: Após realizar a extração de DNA do micélio fúngico, foi realizada uma aplicação de 5µL da amostra, 5µL de água MilliQ esterilizada, juntamente com

5 μ L de azul de bromofenol, em um gel de agarose 0,8%, contendo brometo de etídio, com a finalidade de verificar se a extração de DNA está com boa qualidade.

Quantificação das amostras de DNA: A quantificação das amostras de DNA foi obtida utilizando-se a fórmula padrão: leitura obtida no espectrofotômetro (nm) x 5000 = concentração de DNA (ng). Para a leitura das amostras foram utilizados 5 μ L de DNA total da amostra diluídos em 495 μ L de água esterilizada.

Amplificação das amostras de DNA: Para obter a amplificação de segmentos de DNA das linhagens foram utilizados os “primers” da OPERON Tech: OPXL- CTGGGCACGA; OPX7- GAGCGAGGCT-; OPX12- TCGCCAGCCA; OPX14- ACAGGTGCTG; OPB10- CTGCTGGGAC, selecionados previamente (Dillon, 2000), e combinações entre estes. A amplificação do DNA foi realizada pela técnica de RAPD utilizando-se o seguinte protocolo para amplificação, com total de duração de 3h40min:

Tabela 1. Protocolo para amplificação de DNA

Mistura de reação	Volume para cada reação (25 μ l)	Concentração estoque	Concentração final
H ₂ O	9,2		
Tampão	2,5	10x	1x
MgCl ₂	1,5*	50 mM	3 mM*
dNTPs	2	12,5 mM	2,5 mM
Primer	4	10 mM	0,4 mM
Taq polimerase	0,3	5 U/ μ l	1,5 U/reação
DNA	4	10 ng/ μ L	40 ng

*foram testadas diferentes concentrações finais de MgCl₂ para cada primer, variando assim o volume usado e a quantidade de água.

<u>Temperatura</u>	<u>Tempo</u>
1) 94°C	4 minutos
2) 94°C	45 segundos
3) 40°C	1 minuto e 30 segundos
4) 72°C	2 minutos
5) 72°C	5 minutos

Os passos 2 - 4 foram repetidos por 40 ciclos.

Separação e visualização dos fragmentos amplificados: Para corrida eletroforética do DNA amplificado foram utilizados os 10µL da amostra de DNA e 5µL de uma solução de azul de bromofenol. Além das amostras dos parentais e produtos de fusão, também utilizou-se na corrida eletroforética o marcador de peso molecular (12000 a 100 pb) DNA Ladder (Invitrogen). Em seguida, a mistura foi migrada em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio (5 µg/ul), por eletroforese a 80V, por aproximadamente 2 horas.

A visualização dos fragmentos de DNA amplificados foi realizada em um transluminador de radiação ultra-violeta, a fim de identificar eventos de recombinação em produtos de fusão. A análise do perfil de bandas da corrida eletroforética e o cálculo do peso molecular de cada banda, comparando com o marcador, foram realizados com o auxílio do programa computacional LabImage versão 2.7.0.

3.3.8. Cultivo Submerso para Produção de Celulases (CS)

Frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio MLP foram inoculados com suspensões contendo 1×10^7 conídios, de cada linhagem, selecionada entre os produtos de fusão e seus parentais S1B9 e AS5, sendo mantidos a 28°C e agitados a 180 rpm até sétimo dia, sendo colhidas amostras para dosagem enzimática no 2º, 3º, 4º, 5º, 6º e 7º dia de cultivo. Em todas as amostras foram adicionados 10 µL de azida sódica 5%, devido ao seu efeito inibidor de proteases, com o intuito de conservar as enzimas pelo período de 24 horas, a 4°C, até que as análises fossem concluídas.

3.3.9. Cultivo em Estado Sólido para Produção de Celulases (CES)

Os cultivos foram realizados em frascos de vidro com volume de 100 mL, contendo o meio MSP, autoclavado por 15 minutos a 1 atm. O inóculo foi constituído de um mL de uma suspensão 1×10^6 /mL de conídios. Os frascos foram incubados em estufa com umidade acima de 95%, a 28°C até o 4º dia. Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo coletado três frascos de cada linhagem em 36h, 48h, 72h e 96h de cultivo.

Para coleta das amostras, foram adicionados 10 mL de água destilada nos frascos e após maceração manual com bastão de vidro foi medido o pH da suspensão. Em seguida foi acrescentado aos frascos 17 mL de tampão citrato 0,05 M pH 4,8, permanecendo em agitação orbital de 150 rpm por 20 minutos. Na seqüência, a suspensão foi filtrada em papel filtro Whatman nº1 e aproximadamente 5 mL do filtrado foi armazenado para as determinações enzimáticas. Em todas as amostras foram adicionados 10 µL de azida sódica 5%, devido ao seu efeito inibidor de proteases, com o intuito de conservar as enzimas pelo período de 24 horas, a 4°C, até que as análises fossem concluídas.

3.4. Métodos Analíticos

3.4.1. Determinações de atividades enzimáticas

A determinação das atividades enzimáticas contida nas amostras foi realizada de acordo com Ghose (1987).

Atividade sobre Papel Filtro (FPAases): Para a dosagem de celulases foi utilizada a análise da atividade enzimática sobre papel filtro (FPA), conforme Mandels (1976). Em um tubo de ensaio, foram adicionados 0,5 mL da amostra ou de diluições apropriadas e 1 mL de tampão citrato 0,05 M pH 4,8. Os tubos foram colocados em banho-maria a 50°C, durante 5 minutos, com a finalidade de elevar a temperatura do meio contendo a enzima e o tampão citrato até a temperatura ideal de hidrólise dessa enzima. Foram adicionados a cada tubo 50 mg de papel filtro (Whatman nº1) em tiras de 1 cm x 6 cm, mantendo-os por 60 minutos em banho-maria a 50°C. Em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 3 mL da solução do reagente DNS e os tubos voltaram ao banho-maria a 100°C, por 5 minutos. Após resfriamento em temperatura ambiente, foram acrescentados 8 mL de água destilada e a absorbância das preparações foi medida em espectrofotômetro a 545 nm. Foram realizadas duas diluições de cada amostra. As concentrações de FPA presentes nas amostras foram determinadas por meio de curva de calibração construída com soluções de glicose em concentrações de 0, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50 e 2.00 mg/mL, por meio de regressão linear, utilizando o programa Microcal Origin 6.0. Os açúcares redutores liberados foram dosados com o uso do reagente DNS de acordo com Miller (1959).

Endoglicanase: A determinação da atividade de endoglicanase foi realizada conforme Ghose (1987), empregando-se 0,5 mL de solução de carboximetilcelulose 2% em tampão citrato

0,05 M pH 4,8, em um tubo de ensaio, ao qual foi acrescentado 0,5 mL da solução enzimática ou diluição apropriada. Os tubos contendo essas soluções foram colocados em banho-maria a 50°C, por 30 minutos. Após, a reação foi interrompida com a adição de 3 mL da solução do reagente DNS aos tubos e colocados em banho-maria a 100°C, por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram diluídas e mensuradas como para FPA e os açúcares redutores liberados, dosados com o uso do reagente DNS de acordo com Miller (1959).

β-glicosidase: Para a determinação da atividade de β-glicosidases empregou-se a metodologia descrita em Chahal (1985). De acordo com essa técnica, foram adicionados 0,5 mL de solução de salicina 1% em tampão citrato 0,05 M pH 4,8, em um tubo de ensaio, ao qual adicionou-se 0,5 mL da solução enzimática ou diluição apropriada. Os tubos contendo essas soluções foram colocados em banho-maria a 50°C, por 30 minutos. Após, a reação foi interrompida com o acréscimo de 3 mL da solução do reagente DNS e os tubos colocados em banho-maria a 100°C, por 5 minutos. Na seqüência, as amostras foram diluídas e mensuradas como para FPA. Os açúcares redutores liberados foram dosados com o uso do reagente DNS de acordo com Miller (1959).

As unidades internacionais de FPAase, endoglicanase e β-glicosidase foram assumidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μM de açúcar redutor por minuto (Ghose, 1987).

Quantificação de proteínas e determinação de atividade específica: Para a determinação quantitativa das proteínas utilizou-se o método de Bradford (1976), parâmetro este, avaliado somente nas amostras obtidas de cultivo submerso (CS). A quantificação das proteínas

presentes nas amostras foram determinadas através de curva de calibração construída utilizando soluções-padrões de albumina bovina (fração V) como padrão. Para a determinação das proteínas das amostras, a reação foi realizada pela mistura de 25 μL da amostra concentrada (filtrado), 975 μL de água destilada estéril e 500 μL do reagente de Bradford. Transcorridos 10 minutos, o complexo foi quantificado em espectrofotômetro a 595 nm. A determinação da atividade específica foi realizada dividindo-se o valor encontrado em UI/mL de atividade sobre papel filtro (FPA) nos dias de pico de produção, pelo valor encontrado na quantificação de proteínas em mg/mL, obtendo-se no resultado o valor de UI de FPA presente por mg de proteína.

3.5. Métodos estatísticos

Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância One-way ANOVA, com o pós-teste de Tukey para um $p < 0,05$, utilizando-se o programa computacional GraphPad Prism.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No item 4.1 são apresentados os resultados de obtenção de protoplastos. Os resultados de obtenção de recombinantes intergenéricos por fusão de protoplastos, usando a técnica do doador morto, entre *P. echinulatum* e *T. harzianum*, são apresentados no item 4.2. Os resultados envolvendo os processos de caracterização, estabilização e seleção de possíveis heterocários são mostrados no item 4.3, seguidos dos dados obtidos no teste empregado para verificar a capacidade de resistência dos produtos de fusão ao fungicida benomil, item 4.4. Os resultados de caracterização molecular, pela técnica de RAPD, estão dispostos no item 4.5. Já nos itens 4.6 e 4.7, pode-se observar os resultados obtidos na avaliação da produção de celulases, tanto em cultivo submerso (CS) quanto em cultivo em estado sólido (CE), respectivamente, comparando os produtos de fusão com as linhagens parentais.

4.1. Definição da técnica de obtenção de protoplastos

Foram realizados experimentos de obtenção de protoplastos de *P. echinulatum* (S1B9) e *T. harzianum* (AS5) em que foram testadas diferentes concentrações da solução lítica (SL) (0,1- 0,5- 1- 2,5 e 5 mL) e Glucanex® na concentração de 0,01 g/mL.

Nos tratamentos com quantidades de solução lítica menores que 2,5 mL (dados não mostrados) o número de protoplastos foi inferior ao obtido com 2,5 mL, sendo este escolhido para ser comparado com o tratamento com o produto comercial Glucanex®. Obteve-se maior número de protoplastos nos tratamentos com 2,5 mL da solução lítica e 2,5 mL de KCl 0,6 M e com a utilização de Glucanex®, como observa-se na Figura 2. Percebeu-se que para a linhagem de *P. echinulatum* S1B9, não houve diferença entre estes tratamentos; já para a

linhagem de *T. harzianum* AS5 obteve-se maior número de protoplastos no tratamento com Glucanex®. Constatou-se que o número de protoplastos obtidos para *Trichoderma*, no melhor tratamento, é muito superior ($7,73 \times 10^7$ protoplastos/mL) ao obtido por *Penicillium* ($1,25 \times 10^7$ protoplastos/mL), também que estes apresentaram menor diâmetro. Provavelmente, este acontecimento deve-se ao fato das hifas de *Trichoderma* apresentarem diâmetros menores e terem sido comparadas para uma mesma massa (0,2 g de micélio). Conseqüentemente, com a maior quantidade de células para a mesma massa, existiu maior liberação de protoplastos na linhagem de *Trichoderma*.

Devido a estas constatações, para o tratamento enzimático empregou-se Glucanex® numa concentração de 0,01 g/mL.

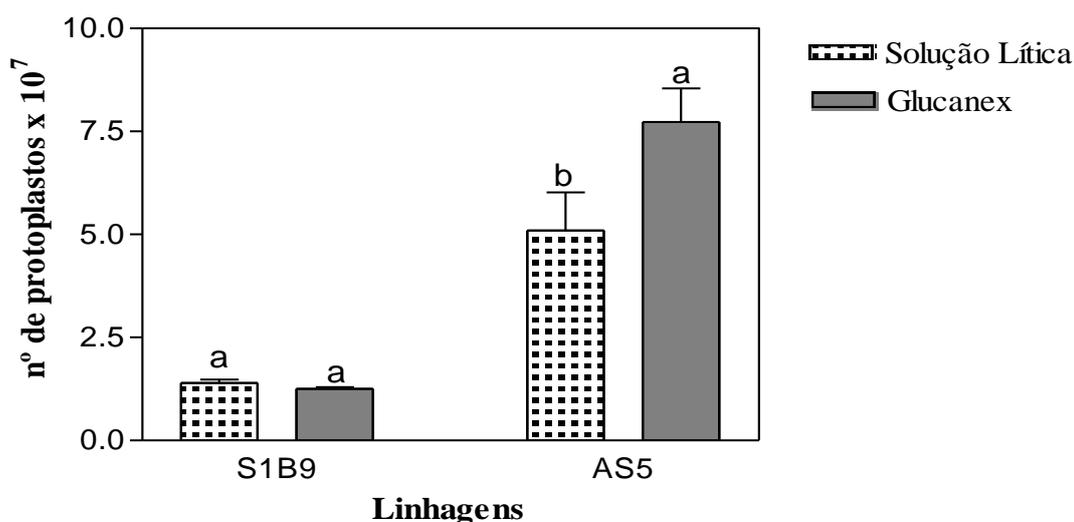


Figura 2. Número de protoplastos $\times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ obtidos nas linhagens 9A02S1B9 (*P. echinulatum*) e AS5CH3 (*T. harzianum*) nos tratamentos enzimáticos contendo 2,5 mL da solução lítica e 2,5 mL de KCl 0,6 M e Glucanex® 0,01 g/mL

As médias das linhagens com as mesmas letras para um mesmo dia não diferem pelo teste de Tukey $p < 0,05$

A observação microscópica dos protoplastos obtidos mostrou que no tratamento com Glucanex® a suspensão de protoplastos apresentava menos restos de parede celular e

fragmentos de hifas, com protoplastos uniformes, enquanto que, quando empregou-se a SL para remover a parede celular fúngica, a suspensão permaneceu com mais restos de hifas e de parede celular, com os protoplastos irregulares, de diferentes tamanhos.

Na Figura 3, pode-se observar fotos em microscópio óptico obtidas nas etapas de obtenção e fusão de protoplastos, entre as linhagens S1B9 de *P. echinulatum* e AS5 de *T. harzianum*. Os micélios de *P. echinulatum* podem ser observados na Figura 3a e os de *T. harzianum*, com clamidósporos, na Figura 3b, ambos crescidos por 20 horas em meio líquido MLC. Na seqüência, observa-se a digestão parcial, após 3 horas, dos micélios de *P. echinulatum* (Figura 3c), sob a ação enzimática do Glucanex® e, após 1 hora, para os de *T. harzianum* (Figura 3d), sendo que o desaparecimento completo das hifas ocorreu nas 4 horas de tratamento enzimático. Aglomerados de protoplastos podem ser observados na Figura 3e–f, após o tratamento com a solução fusionante, e a ocorrência de fusão de protoplastos na Figura 3g. Depois da fusão de protoplastos, antes da regeneração dos mesmos, observou-se protoplastos de maior volume, proveniente de fusões (Figura 3h), possíveis heterocários. Após 70 h de regeneração dos protoplastos, observa-se a formação de massa amorfa e hifas (Figura 3i).

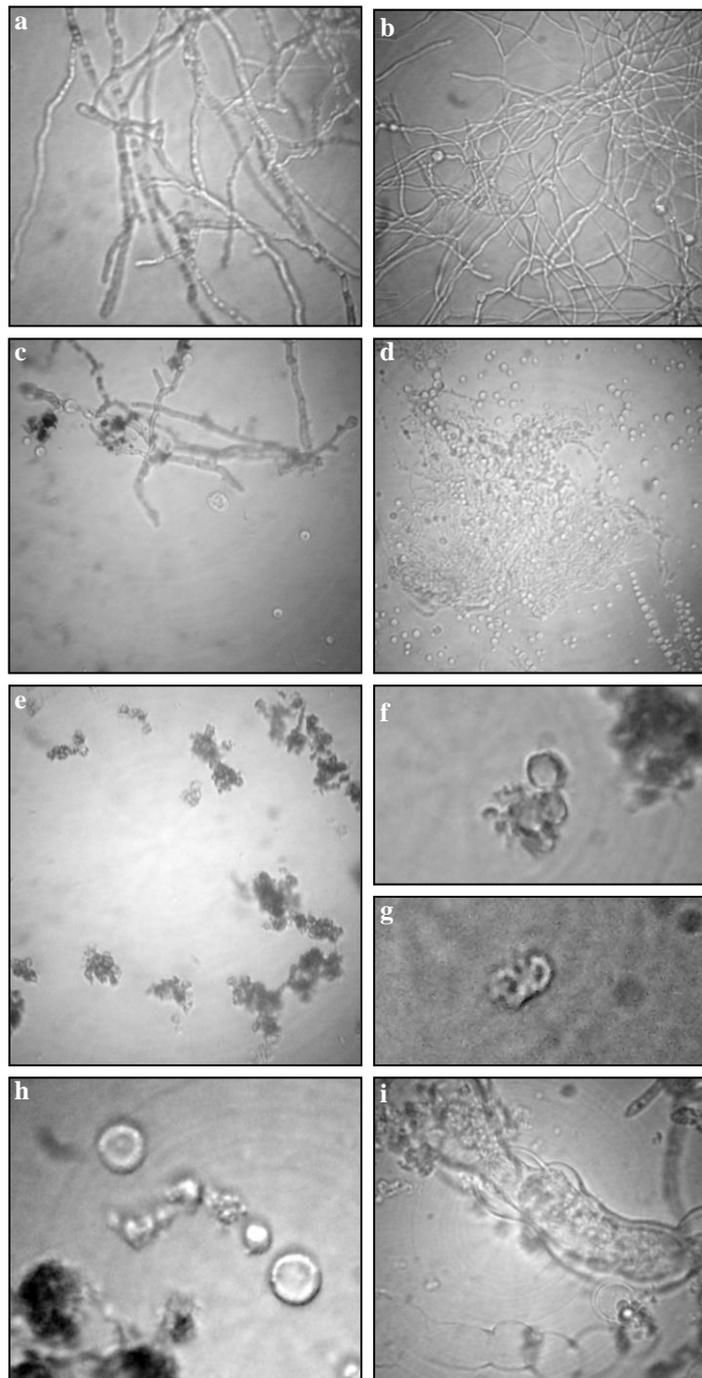


Figura 3. Micélios de *P. echinulatum* (a) e *T. harzianum* (b) crescidos por 20 horas em meio líquido (x 400). Digestão parcial dos micélios de *P. echinulatum* (c) e *T. harzianum* (d) e obtenção de protoplastos após 3 h e 1h de ação enzimática, respectivamente (x 400). Aglomerados de protoplastos (e - x 400, f - x 1000) e protoplastos em processo de fusão, após tratamento com PEG (g - x 1000). Protoplastos proveniente de fusão (h - x 1000). Formação de massa amorfa e hifas, após 70 h de regeneração dos protoplastos (i - x 400).

4.2. Fusão de protoplastos utilizando a técnica do Doador Morto

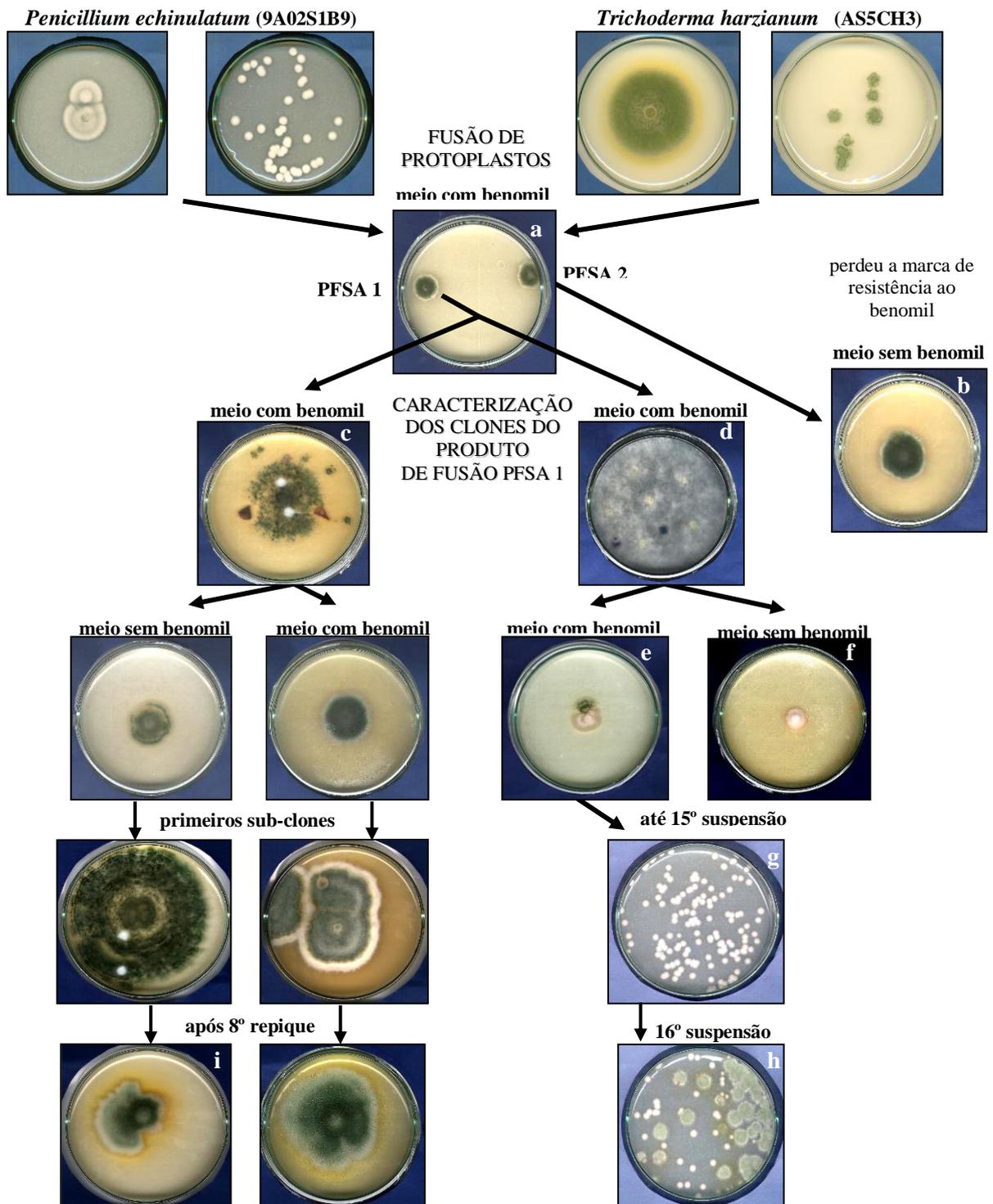
Em um dos dez experimentos de fusão de protoplastos entre as linhagens S1B9 de *P. echinulatum* e AS5 de *T. harzianum*, após 24 h de regeneração dos protoplastos em meio líquido, obtiveram-se duas colônias no meio sólido de seleção que apresentavam morfologia alterada, mostrando características de ambos os parentais. Estas colônias, denominadas inicialmente PFSA 1 e 2, foram consideradas como prováveis produtos de fusão (Figura 4a), pois foram selecionadas em meio com o inibidor benomil (MB), decorrentes de formação de heterocários, pois não observou-se crescimento em nenhum dos controles semeados com protoplastos de S1B9 ou AS5 isoladamente.

A baixa frequência de produtos de fusão pode ter sido consequência da incompatibilidade entre os citoplasmas das duas espécies envolvidas, que pertenciam ainda a gêneros distintos, diferentemente do observado quando as fusões ocorrem entre linhagens da mesma espécie, cujas frequências são mais altas, da ordem de 1×10^5 ou 1×10^6 produtos de fusão/protoplastos.

4.3. Seleção, caracterização e estabilização de possíveis heterocários

Para verificar a existência de heterocários ou de monocários nas duas colônias mostradas na Figura 4a (PFSA 1 e 2), foram retiradas amostras de micélio, com as quais foram feitos repiques e suspensões de conídios que foram espalhadas sem diluição e com diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000 em placas com meio MBGS. Nesta primeira etapa de seleção e caracterização, apenas clones, provenientes de repiques de micélio e conídios, da colônia PFSA1, mostraram capacidade de crescer em meio contendo benomil. Houve crescimento do clone PFSA 2 apenas em meio sem a presença do inibidor benomil (Figura 4b), sugerindo portanto a perda da marca de resistência e uma possível reversão da variabilidade.

Verificada a possibilidade da colônia PFSA1 ser um heterocário, foram feitos estudos de seleção e estabilização, por meio de vários repiques de micélio (sub- clones) em MBGS. (Figura 4c) e colônias com morfologia do parental *P. echinulatum* aparentemente sem esporos (Figura 4d).



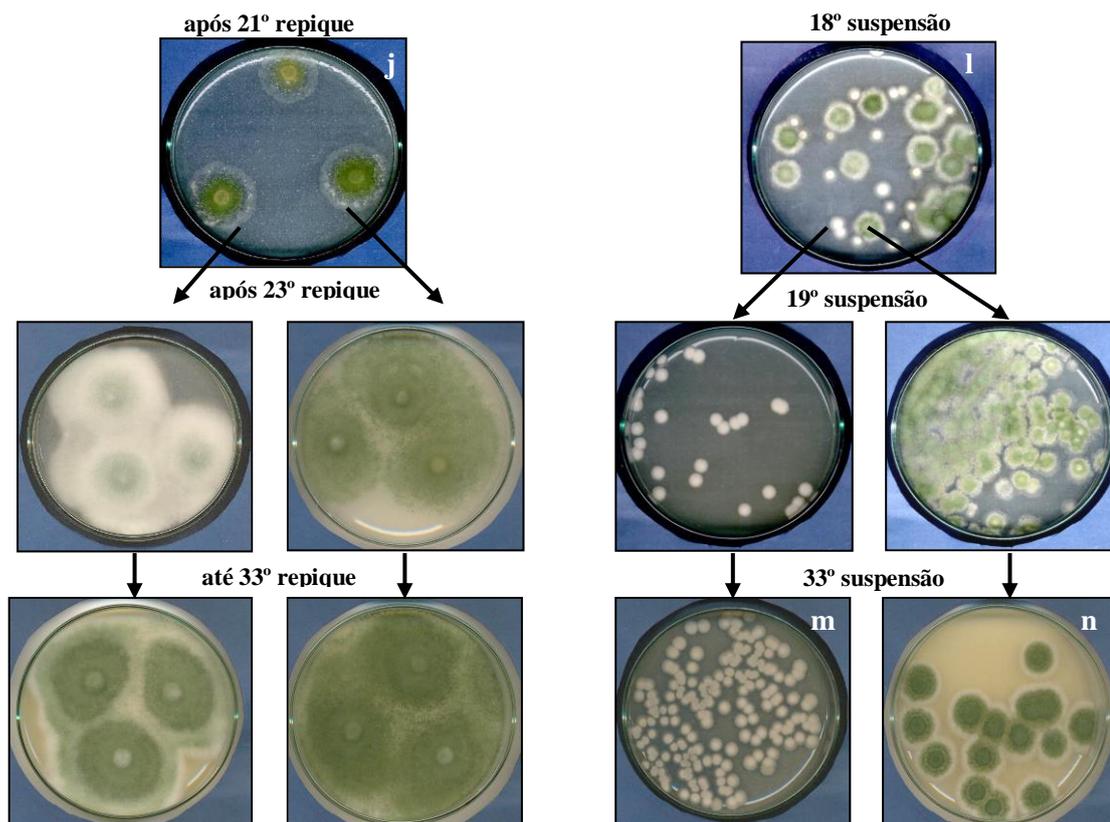


Figura 4. Produtos de fusão obtidos no processo de seleção, estabilização e caracterização de fusionantes de *Penicillium echinulatum* e *Trichoderma harzianum*

Os resultados mostraram a formação de colônias apresentando duas morfologias diferentes, colônias com morfologia de *T. harzianum*, com micélio ralo e esporos verdes (Figura 4c) e colônias com morfologia do parental *P. echinulatum* aparentemente sem esporos (Figura 4d).

A partir de uma colônia com morfologia de *T. harzianum* (Figura 4c) foram feitos repiques em meio com e sem inibidor, com glicose (para ajudar no início do desenvolvimento das colônias) e sem presença de redutor de desenvolvimento colonial, foi observado que as colônias resultantes aparentemente não mostraram alteração na morfologia. Nos primeiros sub-clones obtidos por repiques de micélio, observou-se variação na densidade do micélio, mas todas as colônias apresentavam formação de conídios verdes, com alta instabilidade nos primeiros repiques, sendo que no 8º repique pode-se observar (Figura 4i) formação de setores, que demonstra esta instabilidade. Após o 21º repique foram feitos

três repiques de cada colônia numa mesma placa de Petri para verificar a estabilidade e selecionar as que mostravam melhor crescimento e esporulação (Figura 4j), procedimento repetido até o 33º repique, onde observou-se maior estabilidade das colônias com morfologia semelhante a do parental *T. harzianum*.

A partir da colônia com morfologia de *P. echinulatum* (Figura 4d) também foram feitos repiques em meio com e sem inibidor, onde observou-se uma colônia com a mesma morfologia do parental *P. echinulatum*, mas com um setor característico de morfologia de *T. harzianum* (Figura 4e) na presença de benomil, diferente dos outros clones que permaneceram somente com morfologia de *P. echinulatum* (Figura 4f). A partir da colônia com setores (Figura 4e) até a 15ª repetição dos repiques por suspensão de conídios, para estabilização e seleção, a morfologia de *P. echinulatum* (Figura 4g) predominou. Na seqüência, em uma das placas de suspensões proveniente destas colônias, observou-se a variação de morfologia, alternando entre características do parental *P. echinulatum* e do parental *T. harzianum* (Figura 4h), fato que se repetiu até o 18ª ciclo de repiques (Figura 4i), em meio com benomil, indicando fortemente a existência da fusão de protoplastos. Da 19ª até a 33ª suspensão as colônias mostraram-se mais uniformes, estabilizando a morfologia, sendo semelhante apenas ao parental *P. echinulatum* (Figura 4m) ou ao parental *T. harzianum* (Figura 4n).

Durante o processo de estabilização também foram realizados três repiques sucessivos em meio MGS sem inibidor, para depois retornar ao meio com inibidor e observar se a característica para resistência ao benomil não teria sido perdida. Nos resultados observa-se que os clones cresceram normalmente, sem alteração no número de colônias provenientes de conídios nas duas condições. Nestas colônias não observou-se alterações morfológicas, e não houve perda da característica de resistência ao benomil, indicando que a sua expressão seria decorrente de segmentos de DNA integrados em cromossomos.

Depois do processo de estabilização, os clones passaram por sucessivos repiques em meio sem benomil, com glicose (para ajudar no início do desenvolvimento das colônias) e com presença de redutor de desenvolvimento colonial, utilizando suspensões de conídios, para caracterizar e selecionar colônias quanto a produção de halos de hidrólise de celulose em placas de Petri. Como pode-se perceber na Figura 5, a partir dos produtos de fusão originais foram obtidas colônias com morfologia semelhante a do parental *T. harzianum* (Figura 5 – a e c) e do parental *P. echinulatum* (Figura 5 – b e d). Nas Figuras 5b1 e 2, verificou-se que nos clones semelhantes ao S1B9, no início do processo de seleção qualitativa, houve maior variação com relação a formação de halos pelas colônias e, posteriormente (Figura 5d1 e 2), há maior estabilidade na morfologia e na formação de halo. A análise das colônias com morfologia de *P. echinulatum* mostram halos maiores de hidrólise de celulose, quando comparadas as colônias semelhantes ao *T. harzianum*, que no final do processo já mostravam halos mais nítidos (Figura 5c1 e 2) que no início (Figura 5a1 e 2).

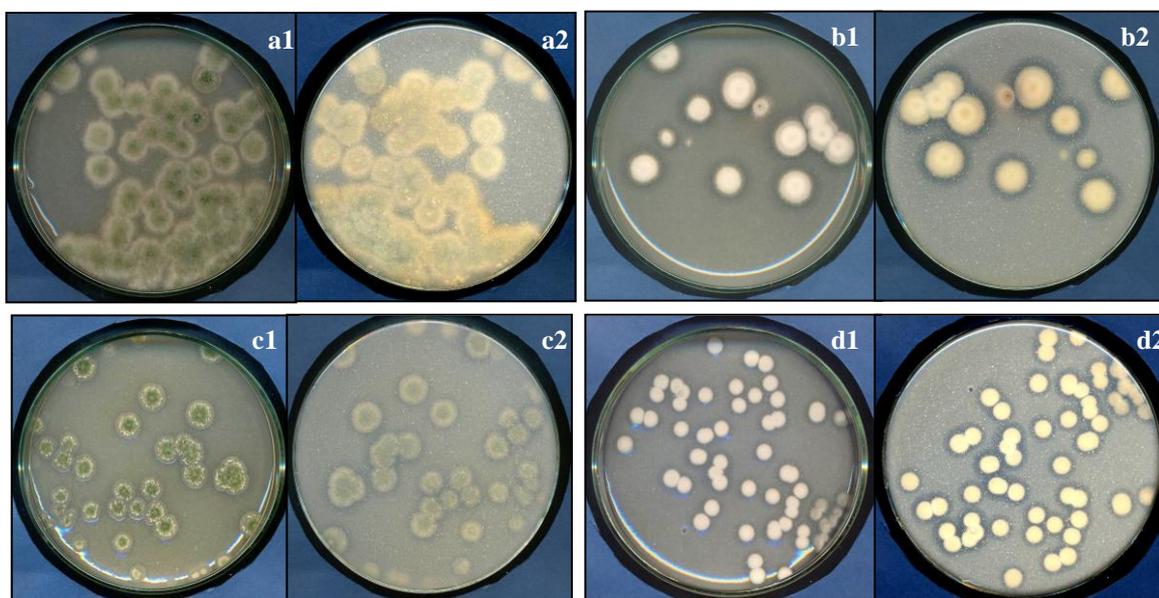


Figura 5. Suspensões de conídios para verificação de halo de hidrólise de celulose em placas de Petri, análise qualitativa dos fusionantes entre *T. harzianum* AS5CH3 e *P. echinulatum* 9A02S1B9 **a** – fusionante semelhante ao AS5CH3 fase inicial; **b** – fusionante semelhante ao 9A02S1B9 fase inicial; **c** – fusionante semelhante ao AS5CH3 fase final; **d** – fusionante semelhante ao 9A02S1B9 fase final. **a1, b1, c1, d1** – placas vistas de cima para observar morfologia; **a2, b2, c2, d2** – placas vistas de baixo para observar halo de hidrólise de celulose

Após o processo de seleção, foram escolhidos 24 subclones analisando-se: morfologia, ausência de setores (indicação de estabilidade), esporulação, velocidade de crescimento e, principalmente, precocidade e eficiência na formação de halo de hidrólise de celulose em placas de Petri. Nesses clones observou-se predominância de 3 diferentes morfologias, como mostra a Figura 6. Treze clones apresentaram morfologia e esporulação semelhante ao parental *P. echinulatum* S1B9 (Figura 6a) – clones PFSA 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 e 14 –, nove clones foram semelhantes ao parental *T. harzianum* AS5 (Figura 6b) – clones PFSA 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 24 –, e dois clones com formas alteradas (Figura 6c) – clones PFSA 25 e 26 – mostrando morfologia de ambos os parentais, como a presença de micélio denso e crescimento mais lento, típico de *P. echinulatum*, e a esporulação verde típica de *T. harzianum*.

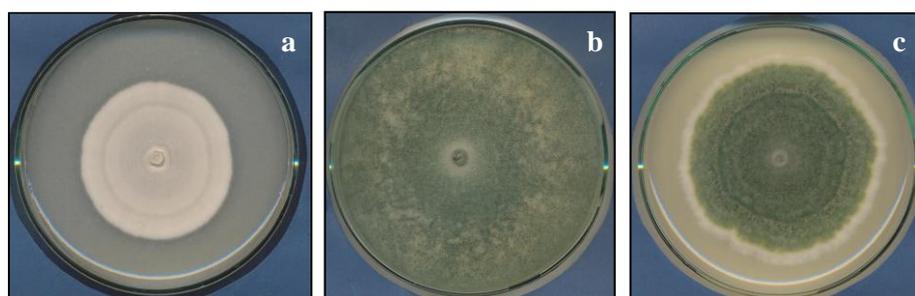


Figura 6. Repiques de micélio de produtos de fusão com morfologia semelhante ao parental *P. echinulatum* (a), semelhante ao parental *T. harzianum* (b) e forma alterada (c), mostrando característica de ambos os parentais

Para comparar a produção de halo de hidrólise de celulose em placas de Petri, dos fusionantes com os parentais, fazendo uma análise qualitativa da produção de celulases, foram feitos repiques, numa mesma placa de meio sem glicose (para induzir a produção de enzima desde o início do crescimento da colônia) e com presença de redutor de desenvolvimento colonial. Formou-se grupos de 5 repiques por placa: os parentais *T. harzianum* (Figura 7 – A) e *P. echinulatum* (Figura 7 – B) e mais 3 produtos de fusão, onde observou-se a precocidade e a eficiência na formação de halo. No exemplo da Figura 7 o

parental *P. echinulatum* novamente apresentou halos mais nítidos que o parental *T. harzianum* e o clone semelhantes a ele (Figura 7 – 15). Os 2 clones de morfologia alterada (Figura 7 – 25 e 26) apresentaram formação de halo intermediária com relação aos parentais, o que reforça os indícios de fusão sugeridos pela morfologia. A sequência de formação de halo foi marcada observando-se diariamente as colônias, de forma comparativa, até o 7º dia. Na Figura 7, podemos perceber que o parental *P. echinulatum* (B) foi o primeiro a mostrar halo de hidrólise de celulose, na sequência os produtos de fusão de forma alterada (25 e 26), em terceiro os produtos de fusão semelhantes ao *T. harzianum* (15) e por último o parental *T. harzianum* (A). Dados que mostram a eficiência da técnica defusão de protoplastos para gerar variabilidade na produção de celulases.

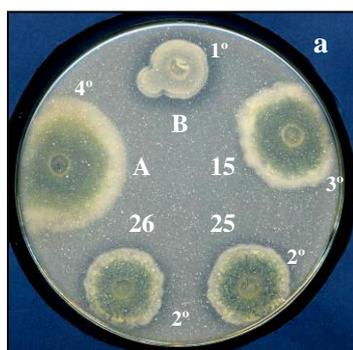


Figura 7. Repique comparativo para verificação de relação halo/colônia em placas de Petri, em análise qualitativa de produção de celulases dos parentais *T. harzianum* (A) e *P. echinulatum* (B) e seus produtos de fusão (PFSA 15, 25 e 26)

4.4. Resistência ao Benomil em produtos de fusão

Testou-se a resistência ao fungicida benomil em seis clones obtidos de produtos de fusão (PFSA 15, 17, 19, 20 e 24), com morfologia semelhante ao parental *T. harzianum*, que foram repicados em placas contendo meio MGS sem benomil e com diferentes concentrações (25, 50, 75 e 100 µg/mL) do fungicida. A avaliação foi feita diariamente observando-se o crescimento radial das colônias (cm), a morfologia e a esporulação até o 8º dia. No 4º dia de crescimento já observa-se que em todos os clones avaliados, não houve

diferença significativa (teste de Tukey $p < 0,05$) no crescimento radial das colônias nas diferentes concentrações de benomil (Figura 8 e 9), havendo pouca diferença na morfologia e esporulação. No 8º dia todas as colônias haviam crescido por todo o diâmetro da placa e esporulado normalmente, independente da concentração do benomil.

Na Figura 9 tem-se o exemplo do fusionante PFSA 15, com seu crescimento e morfologia no 4º e no 8º dia, mostrando que as diferentes concentrações de benomil não interferiram nesses fatores. Sendo importante frisar que o parental *T. harzianum* é sensível ao benomil e já não se desenvolve em meio com a concentração inferior a 12 µg/mL, enquanto que o parental *P. echinulatum*, sendo resistente, cresce em concentrações de mais de 1000 µg/mL do inibidor. Esses resultados demonstram que a técnica do doador morto, utilizando a inativação por calor de um dos parentais que contem a marca de resistência ao benomil, é uma alternativa eficiente para seleção de fusionantes e segregação da resistência permanente ao fungicida.

A técnica de fusão de protoplastos, utilizando como marca de seleção de heterocários a resistência ao fungicida benomil, também foi empregada com sucesso por Ogawa *et al.* (2000), que conseguiram um diplóide resistente de *T. harzianum* utilizado para controle biológico, e por Meza *et al.* (1995), que obtiveram fusionantes de *T. reesei* com capacidade de crescer e esporular em concentrações de até 1000 µg/mL de benomil.

Além da importância industrial do gênero *Trichoderma*, algumas espécies, como *T. harzianum*, também são conhecidas por apresentarem ação antagônica a fungos fitopatogênicos (Papavizas *et al.*, 1982), sendo utilizadas como agentes de controle biológico. Embora existam registros de isolados naturais de *T. viride* e *T. harzianum* resistentes ao benomil esses são raros e apresentam baixos índices de esporulação, o que impossibilita a produção de bioprodutos em larga escala. Conídios e micélio de isolados resistentes podem ser utilizados em formulações de produtos biológicos, para controle de

patógenos de plantas, tanto em tratamentos totalmente orgânicos quanto em conjunto com fungicidas para o tratamento de sementes, pulverizações foliares ou aplicações no solo e raízes (Papavizas *et al.*, 1982; Silva *et al.*, 1999; Khattabi *et al.*, 2001). Em virtude disso, técnicas como fusão de protoplastos (Meza *et al.*, 1995; Hatvani *et al.*, 2006) e mutagênese e seleção (Papavizas *et al.*, 1982) são utilizadas para obter isolados resistentes a fungicidas, com a finalidade de utilizá-los em controle biológico no manejo integrado de pragas (MIP).

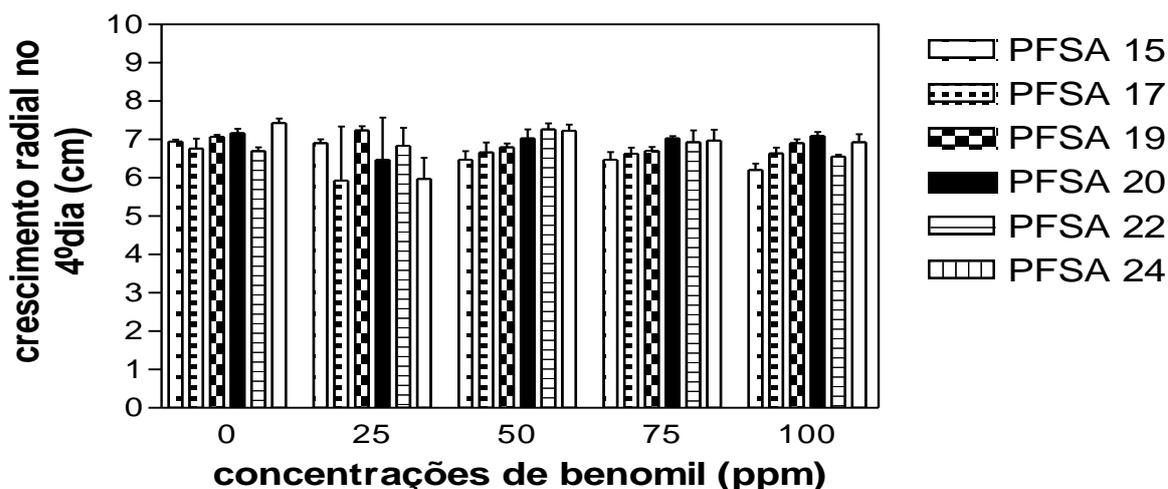


Figura 8. Crescimento radial (cm) dos produtos de fusão entre *P. echinulatum* e *T. harzianum* em diferentes concentrações de benomil no 4º dia.

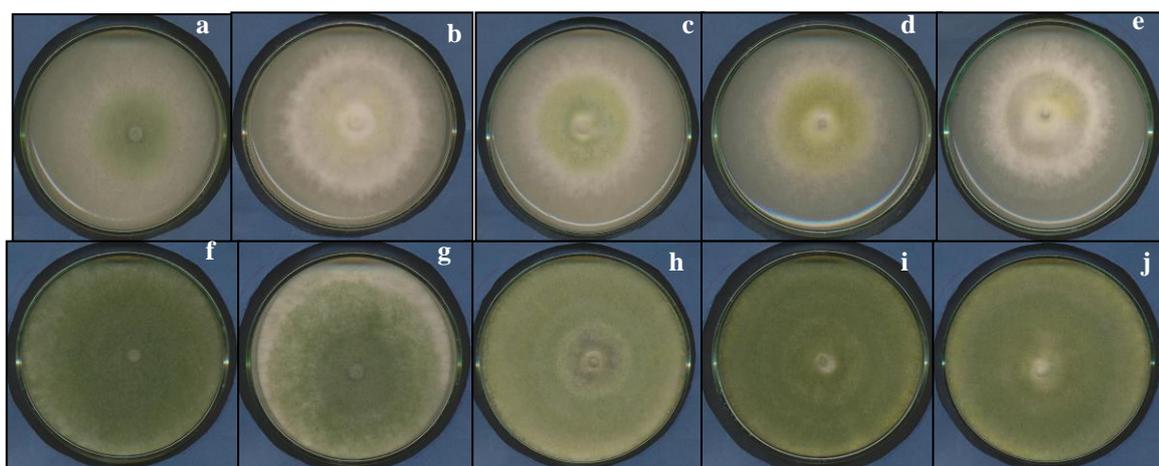


Figura 9. Morfologia dos produtos de fusão entre *P. echinulatum* e *T. harzianum* em diferentes concentrações de benomil no 4º dia (a, b, c, d, e) e 8º dia (f, g, h, i, j). a e f- sem benomil, b e g-25 µg/mL, c e h-50 µg/mL, d e i-75 µg/mL, e e j- 100 µg/mL

4.5. Caracterização Molecular

Para a caracterização molecular das linhagens 9A02S1B9 de *P. echinulatum* e AS5CH3 de *T. harzianum* e seus produtos de fusão, em que se comparou o padrão de bandas dos parentais com os fusionantes, foram analisados cinco *primers* decaméricos arbitrários da Operon Tech, um do kit OPB (10) e quatro do kit OPX (L, 7, 12 e 14), na técnica de RAPD.

Inicialmente, examinaram-se os *primers* com as linhagens parentais para verificar se estes eram capazes de diferenciar os gêneros e se produziam uma quantidade suficiente de bandas, para posteriormente utilizá-los na caracterização dos produtos de fusão em relação aos parentais. Observou-se que houve formação de poucas bandas de DNA com a utilização dos *primers* OPX L, OPX 7 e OPX14 e em virtude disso, testou-se a amplificação com a combinação destes *primers*. Entre as combinações testadas, optou-se pelo uso dos primers OPX L e OPX 7 juntos, OPB 10 e OPX 12, separadamente.

Com o objetivo de melhorar a definição das bandas nos géis de agarose 1,5%, foram testadas diferentes quantidades de DNA (30, 40, 50 e 60 ng) na reação de amplificação, com cada *primer*. Verificou-se que com a maior quantidade de material genético, as bandas mostraram-se mais arrastadas, dificultando a visualização, e que com 30 ng as bandas ficaram muito claras; conseqüentemente optou-se pela quantidade de 40 ng de DNA para os próximos estudos.

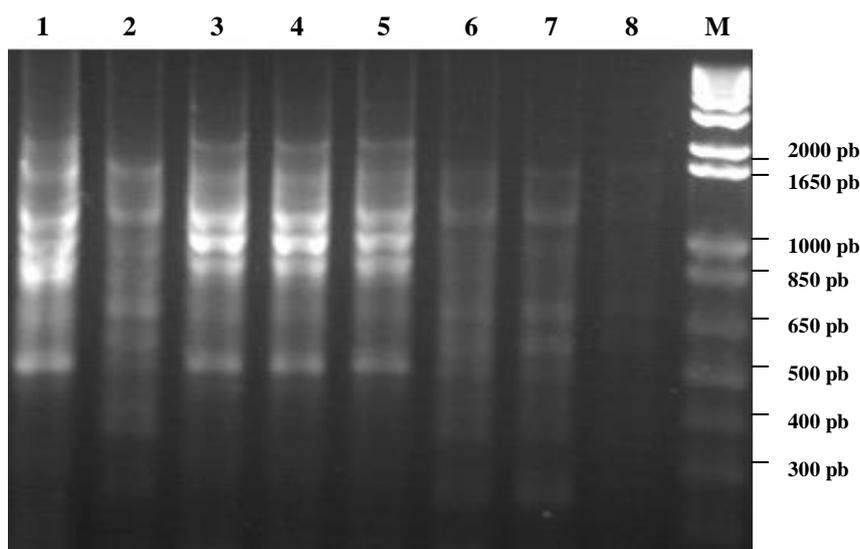
Visando ainda melhorar a qualidade das bandas, estudou-se também diferentes concentrações de Mg (cofator indispensável para a atuação da enzima Taq polimerase) durante a reação de amplificação (2, 3, 4 e 5 mM), para cada *primer*. Foram obtidos resultados diferentes em função do *primer* e da linhagem avaliada. Desta forma, foram escolhidas diferentes concentrações de Mg para cada linhagem, com cada *primer*. Sendo as concentrações ideais para o parental S1B9, de *P. echinulatum* (Figuras 10, 11 e 12 -1), e os produtos de fusão semelhantes morfologicamente a ele (Figura 10, 11 e 12 -3, 4 e 5), para

cada *primer*: 3mM de Mg para OPX L e OPX7 (Figura 10), 4mM de Mg para OPB 10 (Figura 11) e 3mM de Mg para OPX 12 (Figura 12). Os melhores resultados obtidos para o parental AS5, de *T. harzianum* (Figuras 10, 11 e 12 -2), e os produtos de fusão semelhantes a ele (Figura 10, 11 e 12 -7, 8 e 9), para cada *primer*, foram: 2mM de Mg para OPX L e OPX7 (Figura 10), 5mM de Mg para OPB 10 (Figura 11) e 3mM de Mg para OPX 12 (Figura 12).

Em todas as corridas eletroforéticas, nos géis comparativos, utilizou-se o marcador de peso molecular (de 12.000 a 100 pb) da DNS Ladder (Invitrogen), sendo identificado como **M** nas Figuras 10, 11 e 12.

Os produtos de fusão escolhidos para a caracterização molecular foram: 3 – colônia isolada a partir do primeiro produto de fusão PFSA 1, com morfologia mais semelhante ao parental *P. echinulatum* (Figura 4f), antes do processo de estabilização; 4 – colônia idêntica ao *Penicillium*, isolada após variação morfológica mostrada na Figura 4l; 5 – mesma colônia 4, após processo de estabilização (Figura 4m); 6 - colônia idêntica ao *Trichoderma*, isolada após variação morfológica mostrada na Figura 4l; 7 - mesma colônia 6, após processo de estabilização (Figura 4n); 8 – clone 25, também analisado para secreção enzimática de celulases, com morfologia alterada (presença de micélio denso e crescimento mais lento, típico de *P. echinulatum*, e a esporulação verde típica de *T. harzianum* - Figura 6c).

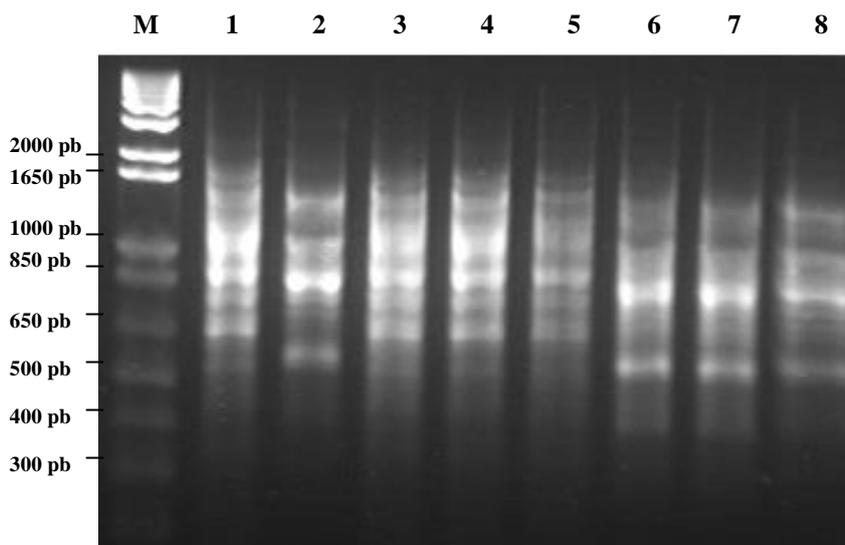
O perfil e análise de bandas de DNAs, obtidos pela amplificação com a combinação dos *primers* OPXL e OPX7, permitiu observar o aparecimento de bandas de peso molecular entre 1958 e 424 pb. Sendo que destas sete bandas foram observadas no parental S1B9 (Figura 10 (1) – a, b, c, d, e, f, h) e nos fusionantes 3,4 e 5, semelhantes morfológicamente a ele; cinco bandas no parental AS5 (Figura 10 (2) – b, c, f, g, i) e nos fusionantes que se assemelham; dentre as quais, três bandas comuns (Figura 10 – b, c, f).



	bandas	parentais e produtos de fusão							
		PM (pb)	1	2	3	4	5	6	7
a	1958	+	-	+	+	+	-	-	-
b	1580	+	+	+	+	+	+	+	+
c	1187	+	+	+	+	+	+	+	+
d	1000	+	-	+	+	+	-	-	-
e	850	+	-	+	+	+	-	-	-
f	673	+	+	+	+	+	+	+	+
g	589	-	+	-	-	-	+	+	+
h	522	+	-	+	+	+	-	-	-
i	424	-	+	-	-	-	+	+	+

Figura 10. Perfil e análise de bandas de DNAs, obtidos por RAPD amplificados com a combinação dos primers OPXL e OPX7, dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 (1) e *T. harzianum* AS5CH3 (2) e seus produtos de fusão (3-8).

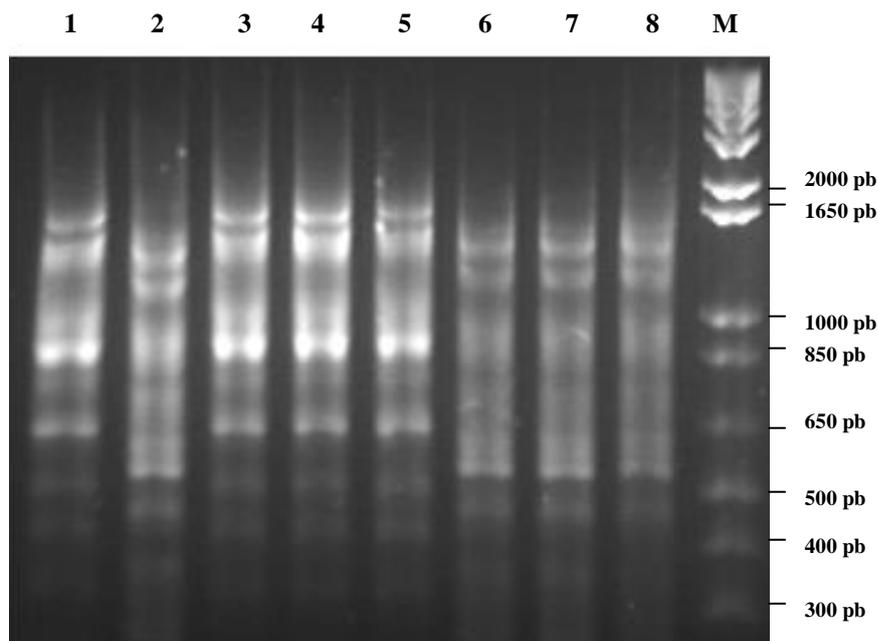
Com a utilização do *primer* OPB 10, as bandas amplificadas tiveram peso molecular de 1581 a 542 pb, mostrando seis bandas para o parental *Penicillium* (Figura 11 (1) – a, b, c, d, f, g), repetindo a similaridade com o parental, os fusionantes 3,4 e 5; e quatro bandas para o parental *Trichoderma* (Figura 11(2) – b, c, e, h), também com a mesma semelhança dos fusionantes 6, 7 e 8.; sendo duas presentes em todos (Figura 11 – b, c). Sendo importante observar a mesma relação entre os padrões de bandas e as morfologias, já vistas na Figura 10, com os primers OPXL e OPX7 juntos.



bandas	parentais e produtos de fusão								
	PM (pb)	1	2	3	4	5	6	7	8
a	1581	+	-	+	+	+	-	-	-
b	1350	+	+	+	+	+	+	+	+
c	1014	+	+	+	+	+	+	+	+
d	850	+	-	+	+	+	-	-	-
e	804	-	+	-	-	-	+	+	+
f	752	+	-	+	+	+	-	-	-
g	628	+	-	+	+	+	-	-	-
h	542	-	+	-	-	-	+	+	+

Figura 11. Perfil e análise de bandas de DNAs, obtidos por RAPD amplificados com o primer OPB10, dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 (1) e *T. harzianum* AS5CH3 (2) e seus produtos de fusão (3-8).

O primer OPX 12, foi o que permitiu amplificar o maior número de bandas, treze no total, principalmente em *Trichoderma*, com peso molecular entre 1630 e 348 pb. Destas, seis estavam presentes em *P. echinulatum* (Figura 12 (1) – a, b, e, g, j, m) e fusionantes 3, 4 e 5; oito em *T. harzianum* (Figura 12 (2) – c, d, e, f, h, i, l, n) e produtos de fusão 6, 7 e 8, tendo apenas uma banda em comum (Figura 12 – e).



bandas	PM (pb)	parentais e produtos de fusão							
		1	2	3	4	5	6	7	8
a	1630	+	-	+	+	+	-	-	-
b	1425	+	-	+	+	+	-	-	-
c	1390	-	+	-	-	-	+	+	+
d	1172	-	+	-	-	-	+	+	+
e	868	+	+	+	+	+	+	+	+
f	718	-	+	-	-	-	+	+	+
g	637	+	-	+	+	+	-	-	-
h	593	-	+	-	-	-	+	+	+
i	547	-	+	-	-	-	+	+	+
j	510	+	-	+	+	+	-	-	-
l	459	-	+	-	-	-	+	+	+
m	422	+	-	+	+	+	-	-	-
n	348	-	+	-	-	-	+	+	+

Figura 12. Perfil e análise de bandas de DNAs, obtidos por RAPD amplificados com o primer OPX12, dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 (1) e *T. harzianum* AS5CH3 (2) e seus produtos de fusão (3-8).

A análise destes resultados mostra claramente que foi possível diferenciar a linhagem parental 9A02S1B9 de *P. echinulatum*, da linhagem AS5CH3 de *T. harzianum*, com a utilização dos três primers escolhidos. Esse resultado já era esperado, em virtude de tratarem-se de gêneros distintos e estarem distanciados geneticamente. Além do fato de

terem sido escolhidos diante dos resultados descritos por Dillon (2000), que também obteve sucesso nessa diferenciação.

Os produtos de fusão avaliados apresentaram perfis de bandas idênticos ao parental ao qual se assemelham morfológicamente (3, 4 e 5 – *P. echinulatum* (1); 5, 6 e 7 – *T. harzianum* (2)), independente do estágio de estabilização que se encontravam ao serem selecionados, até mesmo no perfil mostrado pelo fusionante PFSA 25 (Figuras 10, 11 e 12 – 8), que morfológicamente apresentava características de ambos os parentais, mostrou pelo padrão se bandas ser mais próximo geneticamente do parental AS5CH3. Este resultado, pode estar relacionado ao fato de que na metodologia empregada na extração de DNA, para posterior amplificação de fragmentos, o micélio utilizado foi obtido pelo crescimento de esporos durante dois dias em meio líquido, o que provavelmente favoreceu eventos de segregação nestes produtos de fusão, fazendo com que os mesmos não mostrassem mais bandas do outro parental.

Esses resultados são corroborados por Hanson & Howell (2002) com cruzamentos entre *T. koningii* e *T. virens*, para melhorar suas características de controle biológico; por Martins *et al.* (1999) em que isolados de *Saccharomyces cerevisiae* foram fusionados visando juntar características para a indústria vinícola; e por Silva (1996) que também estudou a caracterização de recombinantes por RAPD em *T. pseudokoningii*. O que estes trabalhos tem em comum com nossos resultados é que todos utilizaram a técnica de RAPD para caracterizar produtos de fusão em comparação com o perfil de bandas de seus parentais e também concluíram que todos os fusionantes se assemelhavam morfológicamente com os parentais aos qual tiveram padrões de bandas similares.

Diferentemente dos resultados que obtivemos, Dillon (2000) conseguiu demonstrar a variabilidade genética provinda de eventos de recombinação, gerados pela fusão de protoplastos entre isolados mutantes de *P. echinulatum* e *T. harzianum*, utilizando a

metodologia de RAPD, pela mistura de bandas dos parentais no perfis dos fusionantes, utilizando estes e outros primers da OPERON TECH.

A técnica de RAPD não foi apropriada para diferenciar os fusionantes de seus parentais morfológicamente semelhantes, não identificando eventos de recombinação, onde os padrões de bandas dos produtos de fusão deveriam se diferenciar dos parentais, apresentando mistura de bandas de ambos, para comprovar a troca de material genético gerando variabilidade. Esses resultados não confirmaram os que já obtivemos nas análises anteriores, pela transmissão de características de resistência ao inibidor benomil, pela variação morfológica e pelos padrões enzimáticos qualitativos, observados em halo de hidrólise de celulose em placas de Petri.

4.6. Cultivo Submerso para Produção de Celulases (CS)

4.6.1. Produção Enzimática dos Parentais em Cultivo Submerso

Com o objetivo de testar a composição do meio de cultivo (MLP1 ou MLP2) mais apropriado a ser utilizado e os tempos de coleta das amostras para análise enzimática, inicialmente foram realizados dois experimentos em cultivo submerso, apenas com as linhagens parentais S1B9 de *P. echinulatum* e AS5 de *T. harzianum*. Foram feitas coletas em triplicata a cada 12 horas até o 8º dia, como mostram as Figura 13 e 14.

No 1º experimento, utilizou-se o meio MLP1 composto por: celulose, MTV, Tween 80 e peptona. Como observa-se na Figura 13, a atividade enzimática mostra valores significativamente maiores para *P. echinulatum*, para todas as enzimas, em todos os tempos. Picos de atividades sobre papel filtro foram verificados entre o 4º e 5º dia com $0,88 \text{ UI.mL}^{-1}$, apresentando leve diminuição até o final do cultivo. Para β -glicosidase o perfil mostra-se

cumulativo, com aumento de atividade a partir do 4º dia, chegando à estabilidade em 156 horas com médias de 0,24 UI.mL⁻¹; a secreção de endoglicanase também mostrou-se crescente, mas demonstrando maior variação, com atividade superior (2,86 UI.mL⁻¹) no 7º dia de cultivo. O parental *T. harzianum* produziu títulos mais baixos de todas as enzimas, sendo semelhante ao *P. echinulatum* até as 24h para FPAases e 60 horas para β-glicosidase, ultrapassando a atividade sobre papel filtro em 2 dias de cultivo com 0,1 UI.mL⁻¹, com pico em 60 horas (0,11 UI.mL⁻¹); para β-glicosidase e para endoglicanase a produção mostra-se praticamente estável, com atividades de 0,072 UI.mL⁻¹ e 0,3 UI.mL⁻¹, respectivamente. Para ambas as linhagens, a produção enzimática foi inferior a esperada, comparando com os dados da literatura (Dillon *et al.*, 1992; Dillon, 2000; Dillon *et al.*, 2006) com o mesmo meio.

O meio MLP2 foi utilizado no 2º experimento de cultivo submerso, e teve a quantidade de MTV dobrada, utilizando 0,5 g/L de farelo de trigo (como indutor de produção enzimática) e a substituição da peptona por 2 g/L de farelo de soja. Observa-se na Figura 14, um aumento na produção enzimática em relação aos dados da Figura 13. Os perfis de pH indicam a ocorrência de maior metabolismo como indicativo de crescimento (Figura 15b). Nestas condições, a produção de *P. echinulatum* para FPAases também apresentou pico em 108 horas de cultivo com atividades de 1,47 UI.mL⁻¹; para β-glicosidase o comportamento foi semelhante ao anterior com atividades de 0,35 UI.mL⁻¹ em 156 horas; a produção de endoglicanase foi antecipada, com atividades superiores a 10 UI.mL⁻¹ já em 60 horas de cultivo. Para o parental *T. harzianum*, a produção de β-glicosidase não foi alterada, entretanto, observou-se aumento na produção de FPAases (0,148 UI.mL⁻¹) e endoglicanases (0,5 UI.mL⁻¹), com picos em 84 e 120 horas, respectivamente. Em virtude destes resultados, optou-se pelo segundo meio de cultivo (MLP2) para os demais experimentos e por realizar coleta de amostras diariamente, do 2º ao 7º dia, para observar o comportamento enzimático e os picos de todas as enzimas.

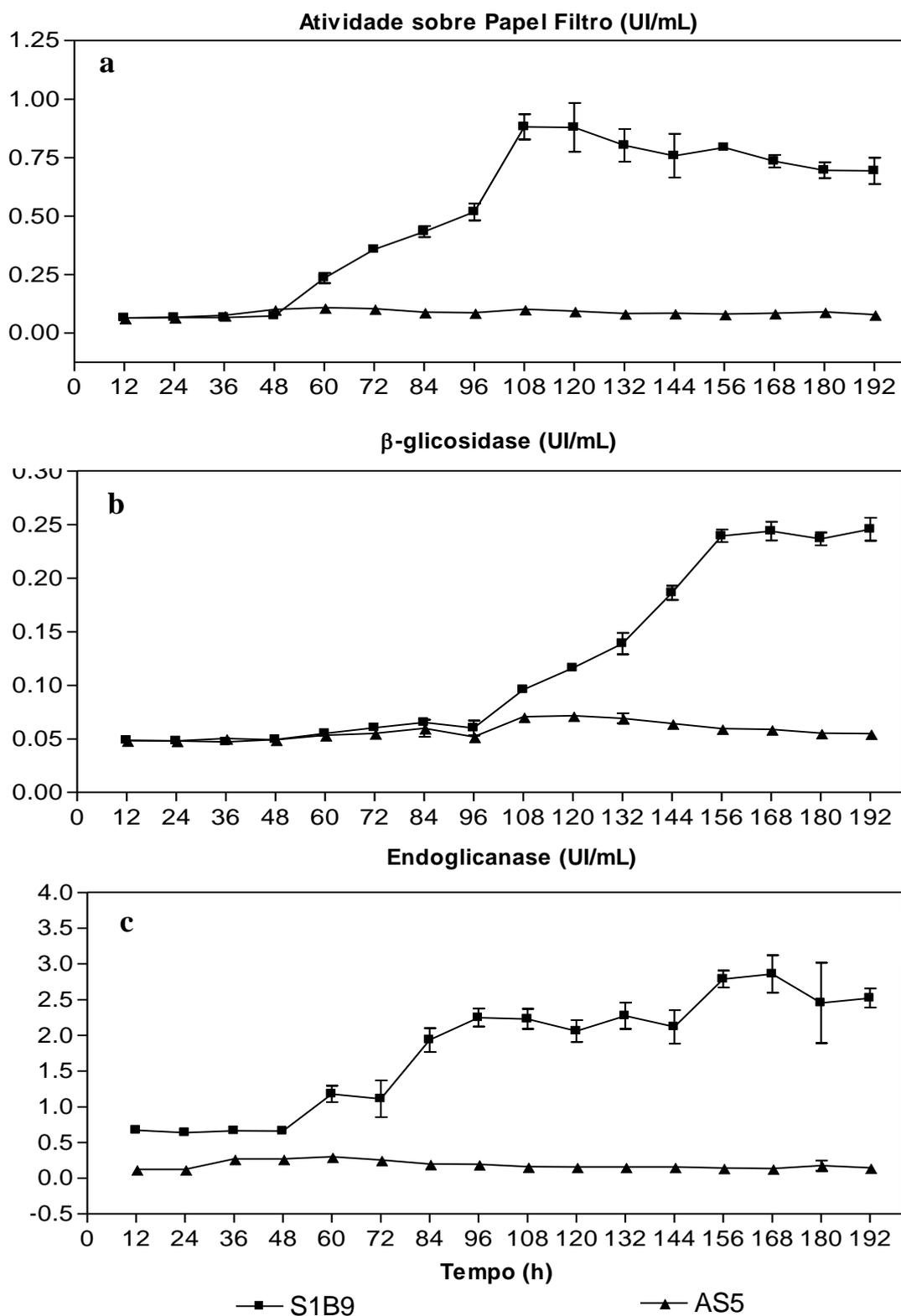


Figura 13. Atividades enzimáticas do 1º cultivo submerso (meio MLP1) dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3
a- Atividade sobre Papel Filtro (UI.mL⁻¹), **b-** β -glicosidase (UI.mL⁻¹), **c-** Endoglucanase (UI.mL⁻¹)

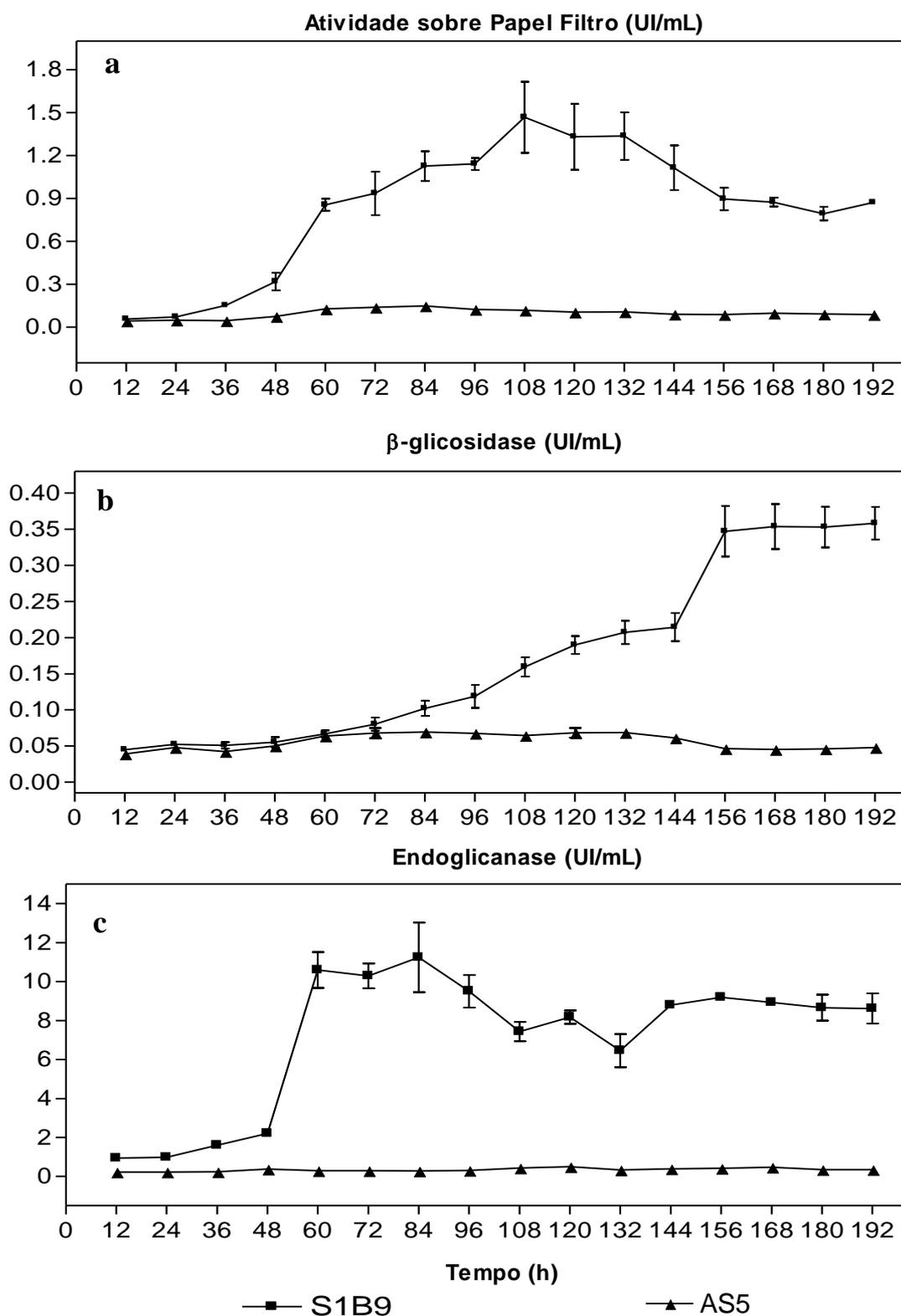


Figura 14. Atividades enzimáticas do 2º cultivo submerso (meio MLP2) dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3
a- Atividade sobre Papel Filtro (UI.mL⁻¹), **b-** β -glicosidase (UI.mL⁻¹), **c-** Endoglicanase (UI.mL⁻¹)

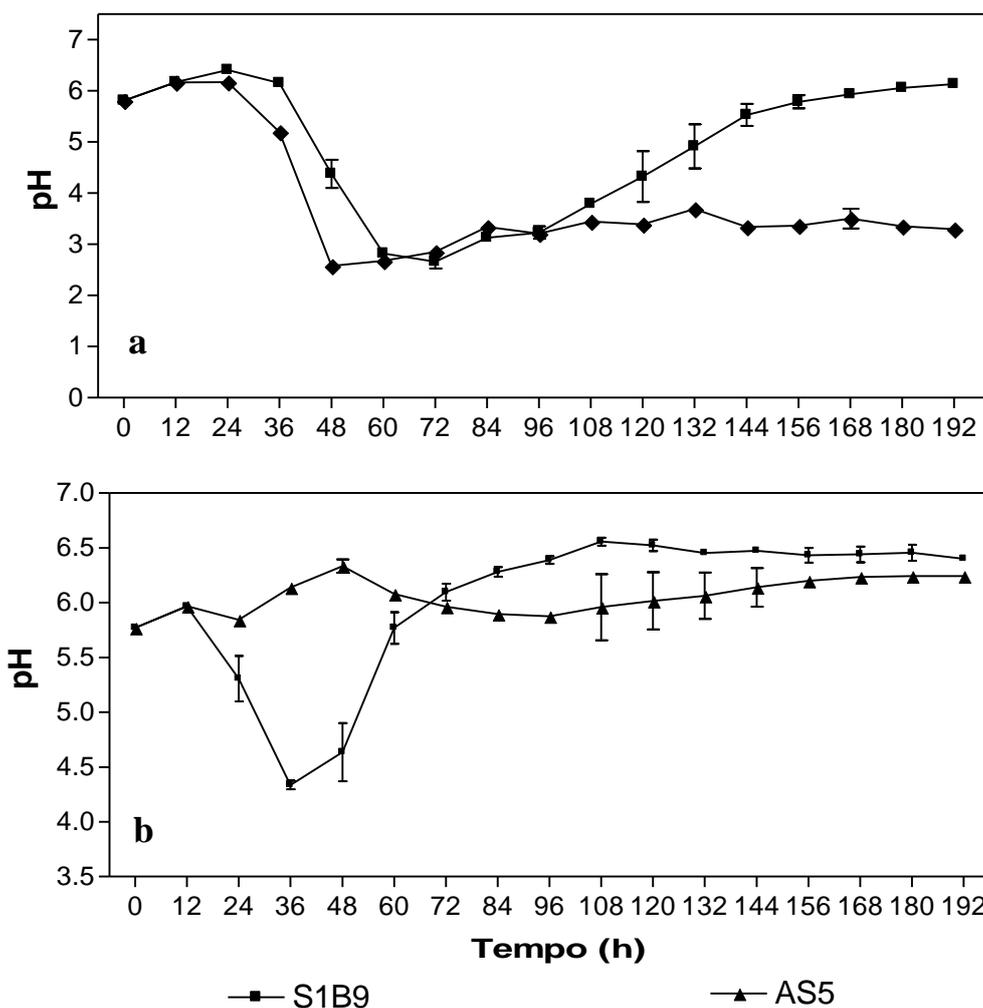


Figura 15. Valores de pH obtidos nos 1º (a) e 2º (b) experimentos em cultivo submerso dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3 e seus produtos de fusão.

4.6.2. Produção Enzimática nos Produtos de Fusão em Cultivo Submerso

A atividade enzimática dos clones obtidos por fusão de protoplastos de *P. echinulatum* com *T. harzianum* foi avaliada em comparação com os parentais em cultivo submerso. Foram realizados dois experimentos para fazer a triagem dos clones quanto a atividades de celulases em cultivo submerso (CS), cada um em duplicata, com coleta de amostras do 2º ao 7º dia de cultivo. Os resultados de média e desvio padrão das atividades

enzimáticas de FPAases, β -glicosidase, endoglicanases e atividade específica de FPAases obtidos nesses experimentos estão apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4 e Figura 16, respectivamente.

Analisando os dados obtidos para atividade sobre papel filtro (Tabela 2) verifica-se diferenças na produção enzimática encontrada nos dois experimentos, mesmo com as mesmas condições de cultivo.

No segundo experimento houve uma antecipação na produção das celulasas, em todas as linhagens, com picos entre o 3º e 4º dia, enquanto que no primeiro experimento, o comportamento foi semelhante aos dos cultivos somente com os parentais (Figura 14), apresentando atividades maiores no 4º dia para os clones semelhantes a *T. harzianum* e no 5º dia para o parental e clones semelhantes a *P. echinulatum*.

Os altos desvios apresentados na maioria das amostras, provavelmente devem-se ao fato da repetição ser apenas de dois frascos. Desse modo, devem ter influenciado nos resultados obtidos pela aplicação do teste *t* para diferenciar as atividades mais altas dos clones em relação aos parentais, o que resultou na ausência de diferença significativa entre estes.

Considerando inicialmente no 1º experimento da triagem (Tabela 2 coluna A), observa-se que para atividade sobre papel filtro, comparando cada clone com o parental a qual se assemelha morfológicamente, já no 3º dia, os clones 7, 11, 6, 5, 9 e 25, apresentaram aumento de 31 a 47%, respectivamente, na produção enzimática; seguidos dos clones 12, 11 e 2 (17 a 29%, respectivamente) no 4º dia; clones 8 e 12 (16%) no 5º dia; clones 11, 7, 14, 2, 9 e 8 (30 a 39%, respectivamente) no 6º dia. No 2º experimento (Tabela 2 coluna B), também para FPAases, no 4º dia destacam-se outros clones, como o 4 e o 5, com incremento de 29 e 45%, respectivamente; em sequência o clone 6 (19%) no 5º dia, e os clones 24, 17, 18 e 15 (24 a 35%, respectivamente) no 6º dia de cultivo. Os dados evidenciam que houve aumentos

mais significativos em linhagens semelhantes ao parental *P. echinulatum*, mas que algumas semelhantes ao *T. harzianum*, também se destacaram.

Tabela 2. Atividade sobre Papel Filtro FPA (UI g⁻¹) nas 1^o e 2^o Triagens de produção de celulases em cultivo submerso, dos parentais *P. echinulatum* S1B9 e *T. harzianum* ASS e seus produtos de fusão.

	3 ^o dia		4 ^o dia		5 ^o dia		6 ^o dia	
	A	B	A	B	A	B	A	B
S1B9	0,68±0,08	1,55±0,09	1,14±0,06	1,37±0,23	1,51±0,05	1,45±0,03	1,13±0,17	1,43±0,11
ASS	0,36±0,00	0,66±0,02	0,31±0,00	0,59±0,04	0,33±0,04	0,60±0,12	0,28±0,01	0,34±0,06
1	0,60±0,07	1,17±0,04	1,07±0,07	1,33±0,12	1,52±0,02	1,27±0,05	1,26±0,11	1,45±0,03
2	0,80±0,14	1,30±0,00	1,47±0,17	1,62±0,00	1,68±0,05	1,63±0,00	1,50±0,00	1,35±0,00
3	0,81±0,04	1,20±0,18	1,28±0,15	1,58±0,14	1,68±0,06	1,40±0,08	1,41±0,01	1,52±0,00
4	0,73±0,14	1,50±0,06	1,21±0,04	1,77±0,05	1,47±0,12	1,50±0,22	1,43±0,04	1,70±0,08
5	0,95±0,06	1,72±0,00	1,31±0,04	1,98±0,25	1,65±0,14	1,66±0,36	1,01±0,01	1,53±0,04
6	0,93±0,11	1,38±0,78	1,18±0,20	1,47±0,33	1,65±0,13	1,73±0,14	1,21±0,00	1,50±0,12
7	0,90±0,08	1,21±0,05	1,15±0,15	1,45±0,34	1,64±0,06	1,33±0,15	1,48±0,07	1,33±0,05
8	0,81±0,02	1,67±0,08	1,13±0,02	1,52±0,27	1,75±0,58	1,55±0,26	1,57±0,05	1,47±0,12
9	0,97±0,09	1,52±0,02	1,19±0,11	1,52±0,10	1,44±0,39	1,16±0,04	1,54±0,09	1,42±0,18
11	0,89±0,12	1,44±0,29	1,35±0,03	1,66±0,25	1,58±0,20	1,21±0,39	1,47±0,08	1,43±0,07
12	0,82±0,22	1,53±0,22	1,33±0,12	1,52±0,19	1,76±0,41	1,46±0,00	1,20±0,07	1,47±0,17
13	0,82±0,07	0,93±0,06	1,17±0,02	1,15±0,08	1,60±0,04	1,27±0,14	1,38±0,11	1,26±0,01
14	0,65±0,01	1,14±0,28	1,13±0,08	1,45±0,18	1,46±0,08	1,34±0,04	1,48±0,05	1,41±0,14
15	0,40±0,03	0,67±0,05	0,35±0,00	0,71±0,04	0,28±0,03	0,63±0,00	0,11±0,02	0,46±0,09
16	0,39±0,00	0,63±0,01	0,36±0,04	0,60±0,10	0,31±0,00	0,52±0,01	0,11±0,00	0,40±0,01
17	0,40±0,07	0,64±0,05	0,39±0,02	0,56±0,13	0,32±0,01	0,60±0,03	0,10±0,00	0,44±0,03
18	0,35±0,04	0,65±0,04	0,35±0,04	0,59±0,12	0,25±0,04	0,60±0,06	0,10±0,00	0,46±0,02
19	0,34±0,06	0,71±0,13	0,39±0,02	0,57±0,01	0,28±0,05	0,53±0,03	0,12±0,00	0,39±0,01
20	0,39±0,01	0,67±0,00	0,32±0,00	0,51±0,08	0,32±0,09	0,54±0,27	0,10±0,00	0,36±0,02
21	0,37±0,00	0,64±0,08	0,34±0,06	0,64±0,00	0,29±0,01	0,28±0,27	0,11±0,01	0,40±0,02
22	0,33±0,05	0,57±0,01	0,30±0,05	0,55±0,02	0,26±0,04	0,44±0,05	0,09±0,00	0,37±0,02
24	0,30±0,05	0,69±0,06	0,31±0,00	0,63±0,06	0,26±0,01	0,60±0,03	0,09±0,00	0,42±0,00
25	0,53±0,10	0,52±0,15	0,36±0,03	0,60±0,20	0,32±0,02	0,31±0,26	0,12±0,00	0,38±0,09
26	0,32±0,01	0,59±0,03	0,31±0,03	0,56±0,08	0,24±0,02	0,57±0,01	0,10±0,00	0,41±0,00

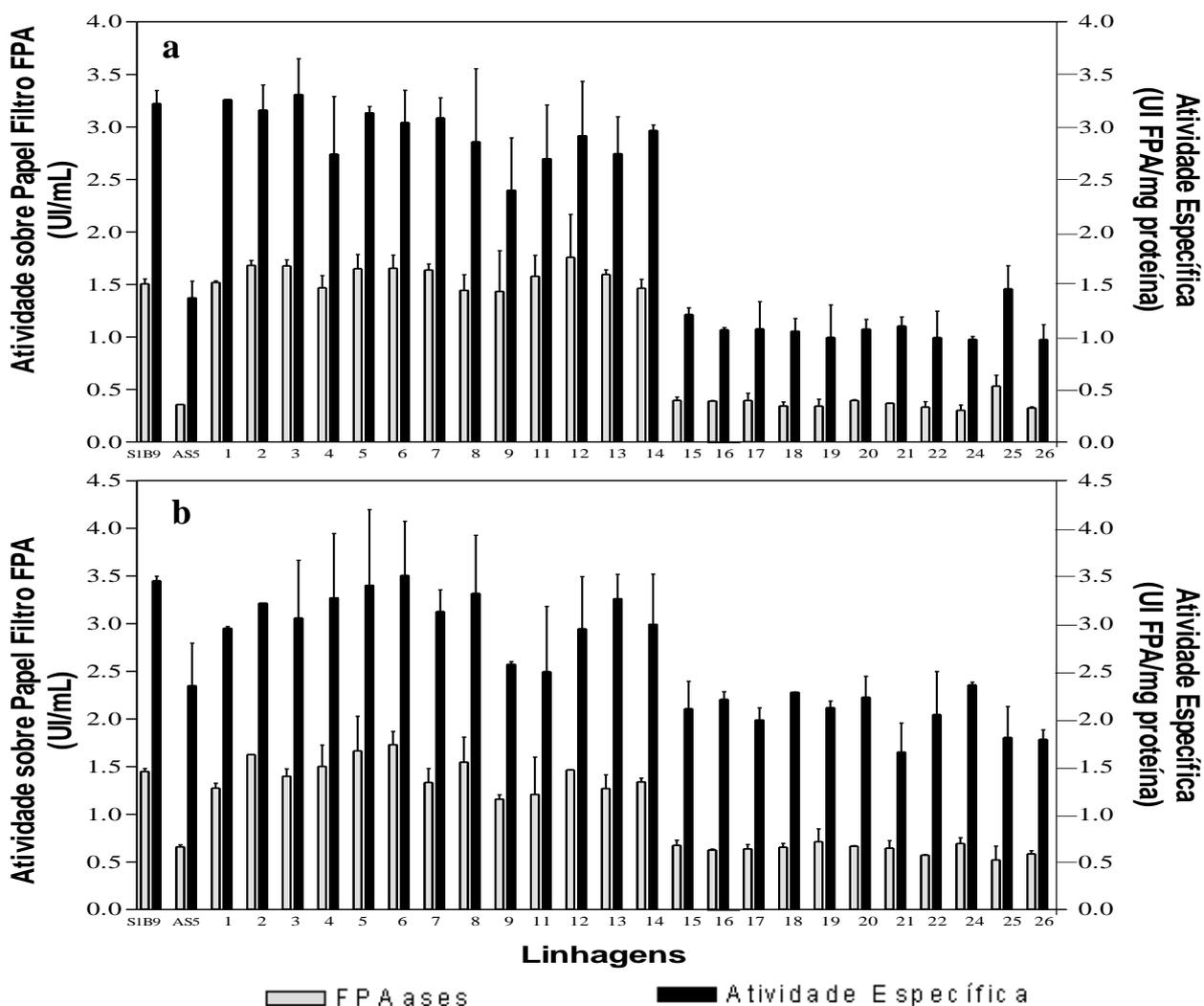


Figura 16. Comparação das atividades sobre Papel Filtro ($\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$) com as atividades específicas ($\text{UI FPA}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$) obtidas para as os dias de pico enzimático, nos 1º (a) e 2º (b) experimentos de triagem em cultivo submerso dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3 e seus produtos de fusão.

Quando foram comparados os resultados de FPAases com a sua atividade específica, como mostra a Figura 16, para ambos os experimentos, utilizou-se os valores obtidos dos picos enzimáticos de cada linhagem, independente do dia em que ocorreu, com o objetivo de verificar a relação entre a produção total de enzimas, com as específicas, num perfil de maiores concentrações. Observou-se uma semelhança entre os valores observados para a linhagem S1B9 e os clones semelhantes a ela. Para a linhagem AS5 e os clones semelhantes a ela, verificam-se valores evidentemente inferiores de ambas as atividades em relação aos

clones similares ao *P. echinulatum*, com a diferença de que sempre a atividade específica com relação à atividade de FPAases foi maior.

Para β -glicosidase (Tabela 3) pode-se observar que resultados apresentados pelos parentais, nos experimentos 1 e 2, foram mais altos, em relação aos observados no experimento inicial, com picos de atividades no 2º dia para a linhagem AS5 (0,1 e 0,07 UI.mL⁻¹ de β -glicosidase, respectivamente) e no 7º dia para a linhagem S1B9 (0,48 e 0,5 UI.mL⁻¹ de β -glicosidase, respectivamente). Comparando os resultados encontrados para *P. echinulatum* com os obtidos para os produtos de fusão de morfologia semelhante a ele, verifica-se que todos apresentaram produção enzimática menor que o parental. Já os clones semelhantes a *T. harzianum* mostraram um perfil praticamente igual ao parental.

Na Tabela 4 verificam-se os resultados obtidos de endoglicanases nos dois experimentos. Em relação ao parental *P. echinulatum* e aos clones semelhantes a este, observam-se maiores atividades no 6º dia de cultivo, com diminuição das atividades no 7º (dados não mostrados). Para o parental *T. harzianum* o pico de atividade enzimática ocorreu no 4º dia, com atividades melhores que no experimento inicial, e seus clones demonstraram maior variação, com picos de endoglicanase no 3º, 4º ou 6º dia. Dentre estes clones destacam-se, principalmente no 2º dia, os produtos de fusão 5 e 12 com acréscimo de 56% na atividade de endoglicanase em relação ao parental, no 1º experimento da triagem (Tabela 3A). Neste mesmo dia, para este mesmo experimento, comparando a linhagem S1B9 com clones de morfologia semelhante e a linhagem AS5 com os clones semelhantes a ela, pode-se ressaltar também os clones 13, 2 e 15 com aumento na atividade de 28, 30 e 53%; seguidos dos clones 18, 25 e 16 (23, 29 e 32%) no 4º dia; clones 16, 22 e 25 (34, 39 e 43%) no 6º de cultivo. No 2º experimento (Tabela 3 B) destacam-se os clones 17, 24, 26, 16, 19 e 8 com incremento de 49, 44, 31, 27 e 26% na atividade de endoglicanase; seguidos dos clones 5, 6 e 4 (28, 25 e 24%) no 3º dia; clones 18, 6 e 5 (27, 19 e 18%) no 6º dia de cultivo.

Com base nesses resultados foram escolhidos os clones com melhor produção, em relação aos parentais, para um novo experimento e também comparar a produção de celulasas com a linhagem comercial RUT C30 de *T. reesei*.

Tabela 3. Atividade de β -glicosidase ($UI\ g^{-1}$) nas 1^o e 2^o Triagens de produção de celulasas em cultivo submerso, dos parentais *P. echinulatus* 9A02S1B9 e *T. reesei* ASSCH3 e seus produtos de fusão.

	2 ^o dia		5 ^o dia		6 ^o dia		7 ^o dia	
	1 ^o Triagem	2 ^o Triagem						
S1B9	0,06± 0,02	0,07± 0,02	0,28± 0,02	0,29± 0,03	0,37± 0,02	0,38± 0,00	0,48± 0,01	0,50± 0,07
AS5	0,10± 0,02	0,07± 0,01	0,07± 0,02	0,05± 0,00	0,04± 0,00	0,03± 0,00	0,03± 0,01	0,03± 0,00
1	0,04± 0,00	0,03± 0,00	0,09± 0,00	0,07± 0,00	0,09± 0,01	0,08± 0,00	0,09± 0,00	0,10± 0,01
2	0,05± 0,00	0,03± 0,00	0,16± 0,02	0,13± 0,00	0,19± 0,01	0,18± 0,00	0,22± 0,03	0,21± 0,00
3	0,04± 0,01	0,02± 0,00	0,23± 0,02	0,11± 0,01	0,30± 0,02	0,17± 0,01	0,36± 0,01	0,21± 0,00
4	0,04± 0,00	0,03± 0,01	0,19± 0,02	0,12± 0,12	0,23± 0,02	0,18± 0,02	0,29± 0,01	0,23± 0,04
5	0,07± 0,01	0,03± 0,00	0,21± 0,03	0,13± 0,00	0,27± 0,05	0,18± 0,00	0,36± 0,05	0,23± 0,01
6	0,06± 0,01	0,03± 0,00	0,19± 0,03	0,10± 0,00	0,24± 0,04	0,14± 0,00	0,30± 0,04	0,18± 0,00
7	0,06± 0,01	0,02± 0,00	0,19± 0,03	0,11± 0,01	0,23± 0,02	0,15± 0,00	0,29± 0,04	0,20± 0,00
8	0,05± 0,01	0,03± 0,00	0,15± 0,01	0,15± 0,00	0,19± 0,02	0,20± 0,00	0,23± 0,02	0,27± 0,02
9	0,06± 0,01	0,03± 0,01	0,17± 0,02	0,15± 0,01	0,22± 0,03	0,20± 0,01	0,26± 0,04	0,26± 0,03
11	0,05± 0,00	0,04± 0,01	0,16± 0,01	0,17± 0,01	0,21± 0,01	0,21± 0,01	0,25± 0,03	0,26± 0,01
12	0,06± 0,00	0,03± 0,01	0,21± 0,01	0,15± 0,02	0,23± 0,09	0,19± 0,01	0,34± 0,01	0,24± 0,01
13	0,05± 0,00	0,02± 0,00	0,16± 0,00	0,08± 0,02	0,19± 0,05	0,13± 0,01	0,26± 0,03	0,17± 0,00
14	0,05± 0,00	0,03± 0,01	0,15± 0,00	0,14± 0,06	0,21± 0,00	0,19± 0,06	0,19± 0,05	0,25± 0,06
15	0,10± 0,01	0,05± 0,01	0,08± 0,00	0,04± 0,00	0,04± 0,00	0,03± 0,00	0,02± 0,00	0,03± 0,01
16	0,09± 0,01	0,06± 0,02	0,04± 0,00	0,05± 0,01	0,03± 0,00	0,02± 0,00	0,03± 0,01	0,02± 0,01
17	0,08± 0,01	0,05± 0,01	0,03± 0,00	0,03± 0,00	0,03± 0,01	0,02± 0,00	0,02± 0,01	0,02± 0,00
18	0,09± 0,01	0,05± 0,01	0,03± 0,01	0,03± 0,00	0,03± 0,00	0,02± 0,00	0,02± 0,00	0,02± 0,00
19	0,09± 0,01	0,07± 0,03	0,02± 0,00	0,04± 0,01	0,03± 0,00	0,02± 0,00	0,03± 0,01	0,02± 0,01
20	0,08± 0,01	0,05± 0,02	0,03± 0,00	0,04± 0,00	0,03± 0,00	0,02± 0,00	0,02± 0,01	0,03± 0,00
21	0,07± 0,01	0,06± 0,01	0,03± 0,00	0,04± 0,00	0,02± 0,00	0,02± 0,00	0,02± 0,00	0,02± 0,00
22	0,08± 0,00	0,06± 0,01	0,04± 0,00	0,04± 0,01	0,03± 0,00	0,02± 0,00	0,03± 0,00	0,02± 0,00
24	0,07± 0,00	0,06± 0,00	0,03± 0,00	0,06± 0,00	0,02± 0,00	0,02± 0,00	0,03± 0,00	0,03± 0,00
25	0,09± 0,01	0,06± 0,03	0,03± 0,01	0,04± 0,01	0,04± 0,01	0,03± 0,00	0,05± 0,04	0,03± 0,01
26	0,09± 0,01	0,07± 0,01	0,03± 0,00	0,04± 0,00	0,04± 0,00	0,03± 0,00	0,02± 0,00	0,03± 0,01

Tabela 4. Atividade de Endoglucanase (UI g⁻¹) nas 1^o e 2^o Triagens de produção de celulasas em cultivo submerso, dos parentais *P. echinulatus* 9A02S1B9 e *T. horreorum* ASSCH3 e seus produtos de fusão.

	2 ^o dia		3 ^o dia		4 ^o dia		6 ^o dia	
	1 ^o Triagem	2 ^o Triagem						
S1B9	2,07 ± 0,90	3,14 ± 0,66	5,28 ± 0,86	4,88 ± 0,98	6,10 ± 0,13	6,43 ± 0,12	7,86 ± 0,60	7,22 ± 0,33
AS5	0,73 ± 0,09	0,96 ± 0,09	0,87 ± 0,08	1,34 ± 0,13	1,17 ± 0,03	1,96 ± 0,29	1,03 ± 0,31	1,24 ± 0,03
1	2,42 ± 0,57	1,74 ± 0,14	5,16 ± 0,39	5,32 ± 1,15	5,74 ± 0,86	6,26 ± 1,04	7,84 ± 0,25	6,99 ± 0,06
2	2,69 ± 0,29	3,22 ± 0,00	5,76 ± 0,31	5,52 ± 0,00	6,42 ± 0,14	6,97 ± 0,00	7,97 ± 0,91	8,30 ± 0,00
3	2,32 ± 0,03	1,94 ± 0,34	5,18 ± 0,14	5,64 ± 0,09	5,88 ± 1,26	5,43 ± 0,98	8,41 ± 0,30	7,86 ± 0,48
4	2,12 ± 0,14	2,85 ± 0,00	4,80 ± 0,74	6,06 ± 0,26	5,50 ± 0,66	5,74 ± 0,67	8,79 ± 0,19	7,84 ± 0,05
5	3,24 ± 0,21	3,71 ± 0,85	4,37 ± 0,59	6,24 ± 1,58	6,86 ± 0,46	6,32 ± 0,95	8,87 ± 0,40	8,54 ± 0,09
6	2,30 ± 1,01	2,73 ± 0,02	4,52 ± 0,49	6,13 ± 0,59	6,84 ± 1,33	5,64 ± 0,30	8,57 ± 1,04	8,60 ± 0,86
7	1,52 ± 0,21	1,47 ± 0,26	4,88 ± 0,28	3,85 ± 0,19	6,10 ± 0,14	3,96 ± 0,80	8,23 ± 0,95	7,33 ± 0,42
8	2,48 ± 0,25	3,93 ± 1,16	4,52 ± 0,28	4,84 ± 0,50	6,51 ± 0,26	5,47 ± 0,48	7,81 ± 0,63	7,87 ± 0,74
9	1,91 ± 0,09	2,65 ± 0,07	5,34 ± 0,21	4,27 ± 0,11	6,10 ± 0,48	5,29 ± 0,10	8,48 ± 1,05	7,65 ± 0,15
11	1,92 ± 0,61	2,33 ± 0,41	4,45 ± 1,03	4,57 ± 0,24	6,11 ± 0,13	4,89 ± 1,13	8,00 ± 0,84	8,06 ± 0,25
12	3,22 ± 0,19	2,39 ± 1,18	5,38 ± 1,01	4,76 ± 0,71	6,55 ± 0,90	6,16 ± 0,23	8,68 ± 0,70	7,97 ± 0,57
13	2,65 ± 0,06	1,10 ± 0,46	4,21 ± 0,25	3,36 ± 0,52	5,83 ± 0,39	1,71 ± 0,29	8,29 ± 0,97	7,53 ± 1,12
14	1,49 ± 0,10	1,39 ± 0,55	5,14 ± 0,65	3,62 ± 0,27	5,24 ± 0,02	2,16 ± 0,62	7,18 ± 0,02	7,20 ± 0,01
15	1,12 ± 0,32	0,93 ± 0,12	0,77 ± 0,05	1,53 ± 0,08	1,33 ± 0,04	1,56 ± 0,16	1,22 ± 0,12	1,39 ± 0,03
16	0,86 ± 0,14	1,22 ± 0,17	0,90 ± 0,09	1,57 ± 0,25	1,55 ± 0,19	1,43 ± 0,34	1,43 ± 0,11	1,32 ± 0,05
17	0,85 ± 0,00	1,43 ± 0,18	0,95 ± 0,15	1,29 ± 0,07	1,34 ± 0,21	1,03 ± 0,69	1,35 ± 0,11	1,37 ± 0,06
18	0,83 ± 0,03	1,08 ± 0,10	0,77 ± 0,05	1,05 ± 0,01	1,44 ± 0,13	1,03 ± 0,08	1,30 ± 0,38	1,57 ± 0,29
19	0,89 ± 0,15	1,21 ± 0,39	0,78 ± 0,10	1,49 ± 0,46	1,41 ± 0,07	1,23 ± 0,50	1,35 ± 0,11	1,14 ± 0,05
20	0,60 ± 0,00	0,97 ± 0,18	0,68 ± 0,03	1,22 ± 0,26	1,24 ± 0,04	1,08 ± 0,02	1,12 ± 0,08	1,16 ± 0,23
21	0,70 ± 0,20	0,96 ± 0,10	0,78 ± 0,01	1,44 ± 0,00	1,36 ± 0,03	1,23 ± 0,20	1,29 ± 0,19	1,17 ± 0,13
22	0,87 ± 0,32	1,05 ± 0,21	0,69 ± 0,14	1,41 ± 0,10	1,00 ± 0,11	1,07 ± 0,32	1,38 ± 0,02	1,30 ± 0,15
24	0,65 ± 0,02	1,38 ± 0,15	0,62 ± 0,03	1,43 ± 0,03	1,14 ± 0,11	1,57 ± 0,02	1,10 ± 0,04	1,29 ± 0,05
25	0,88 ± 0,01	1,02 ± 0,77	0,79 ± 0,18	1,38 ± 0,61	1,51 ± 0,12	0,88 ± 0,31	1,47 ± 0,09	1,11 ± 0,19
26	0,69 ± 0,08	1,26 ± 0,06	0,60 ± 0,14	1,16 ± 0,12	1,12 ± 0,26	1,36 ± 0,09	1,21 ± 0,10	1,29 ± 0,05

Para realizar um 3º experimento em triplicatas, com o objetivo de confirmar os resultados anteriores, foram escolhidos sete clones de produtos de fusão: PFSA 2, 5, 9 e 12 – semelhantes ao *P. echinulatum* – e PFSA 17n, 17i e 25 – semelhantes ao *T. harzianum*. O clone 17i foi obtido por isolamento de esporos presentes no caldo enzimático do clone 17 (agora denominado 17n), no 2º experimento de triagem enzimática em cultivo em estado sólido, por apresentar atividades superiores ao parental *Trichoderma*, para as três enzimas já em 36h. Neste terceiro experimento (Figura 17), os clones foram comparados aos parentais e à linhagem RUT C30 de *T. reesei*.

Analisando-se os resultados obtidos para a linhagem RUT C30, nas três enzimas, observa-se que praticamente não secretou enzimas, nas condições deste experimento. Os picos de atividade enzimática para FPAases e β -glicosidase ocorreram no 3º dia, com 0,081 UI.mL⁻¹, para ambas as enzimas; para endoglicanase, no 5º dia, com 0,52 UI.mL⁻¹. Nos primeiros dias pode-se observar bastante formação de micélio no meio líquido, com esporulação a partir do 5º dia e constatou-se que o pH permaneceu estável durante todo experimento, em torno de 6,0.

Comparando-se as atividades encontradas para o parental *P. echinulatum* e os clones morfológicamente semelhantes a ele, pode-se observar que, mesmo não havendo significância estatística, para atividade sobre papel filtro (Figura 17a) os clones 9 e 12 apresentaram médias muito superiores a do parentais (90 e 96%, respectivamente) já no segundo dias de cultivo; repetindo a superioridade no 3º dia (44 e 48%, respectivamente), mostrando antecipação na secreção das enzimas. A partir do 4º dia, observa-se um comportamento estável na secreção enzimática, destacando-se os clones 5 e 9 com acréscimo de 20% na secreção de FPAases, no 5º dia, com relação ao parental. Para β -glicosidase (Figura 17b), verifica-se, como nos dois experimentos anteriores, que os produtos de fusão apresentaram atividades entre 30-40% menores que o parental, tendo todos comportamento

cumulativo. Na Figura 17c, observam-se picos de produção de endoglicanase entre o 6 e 7º dia, com atividades semelhantes entre o parental e os produtos de fusão; no 2º dia destaca-se o clone 9 com média 36% maior que o parental; e principalmente, ressalta-se o clone 5 com antecipação na produção de endoglicanase, com relação ao parental, demonstrando aumentos de 51 e 44%, no 3º e 4º dia, respectivamente. No 4º dia, os clones 2, 9 e 12 também mostraram acréscimo de 22, 29 e 25%.

Analisando-se os resultados obtidos para o parental *T. harzianum* e os clones semelhantes a ele, de modo geral destacaram-se os clones 17n e 25, sendo o clone 17i o mais similar ao parental. Observou-se, para atividade sobre papel filtro (Figura 17a), no 2º dia, que destacam-se os clones 17n e 25 apresentando aumentos de 47 e 74% em comparação ao AS5, tendo secreção enzimática semelhante ao parental *P. echinulatum*, continuando com produção ainda maior no 3º dia (86 e 88%), seguindo no 4º dia (39 e 73%) e 5º dia (60% para ambos), ressaltando o clone 25 também nos 6º e 7º dia, com 46 e 63% de acréscimo, com relação ao parental *T. harzianum* AS5CH3. Para β -glicosidase, novamente os clones 17n e 25 se sobressaíram, com antecipação na produção desta enzima já no 2º dia, mostrando-se superior ao parental em 59% e no 3º dia em 52 e 28%, respectivamente, comportamento que se repetiu no 6º dia. Com relação à endoglicanase, o incremento demonstrado pelos clones 17n e 25 foi de 35 a 40%, respectivamente, nos 2 e 7º dia; e de 47 e 74 %, apenas pelo clone 25, no 3º e 6º dia. O que se observa no 4º e 5º dia é uma produção enzimática inferior (45 e 23%), do clone 17i com relação ao AS5.

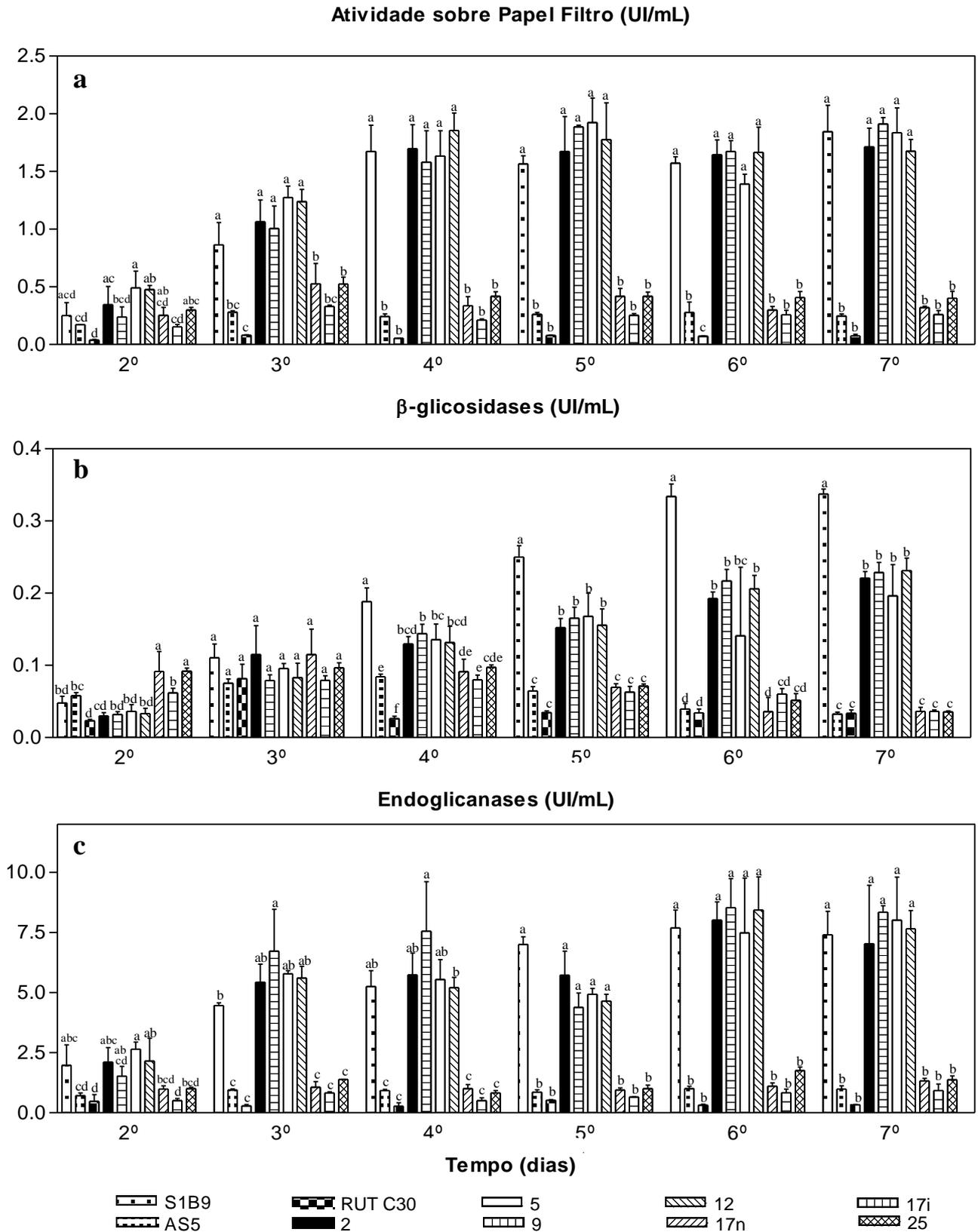


Figura 17. Atividades enzimáticas do 3º experimento de triagem em cultivo submerso dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3 e seus produtos de fusão. **a**– atividade sobre Papel Filtro (UI.mL⁻¹), **b**– β-glicosidase (UI.mL⁻¹), **c**– Endoglicanase (UI.mL⁻¹)

As médias das linhagens com as mesmas letras para um mesmo dia não diferem pelo teste de Tukey $p > 0,05$

Na Figura 18, são apresentados os dados de FPAases e sua atividade específica, onde pode-se observar uma maior equivalência entre as duas atividades em comparação com os dados obtidos para os dois experimentos anteriores de triagem (Figura 16), o que pode estar relacionado com a maior produção de proteínas envolvidas na degradação do papel filtro.

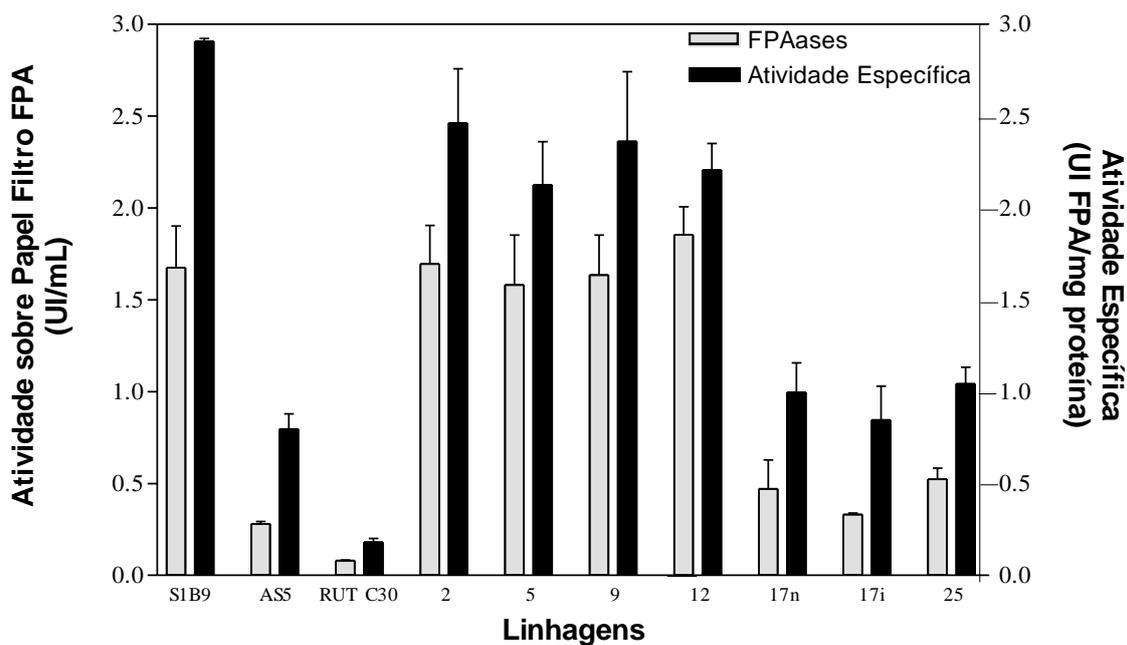


Figura 18. Comparação das atividades sobre Papel Filtro ($\text{UI} \cdot \text{mL}^{-1}$) com as atividades específicas ($\text{UI FPA} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) obtidas para as os dias de pico enzimático, no 3º experimento de triagem em cultivo submerso dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3 e seus produtos de fusão.

4.7. Cultivo em Estado Sólido para Produção de Celulases (CES)

4.7.1. Produção Enzimática dos Parentais em Cultivo em Estado Sólido

Inicialmente, antes de avaliar e comparar os produtos de fusão com os parentais, realizou-se um experimento de cultivo em estado sólido apenas com as linhagens parentais S1B9 de *P. echinulatum* e AS5 de *T. harzianum*, em que foram feitas coletas em triplicata a cada 12 horas até o 5º dia, como mostra a Figura 19.

Verifica-se que o *P. echinulatum* apresenta maior atividade enzimática em comparação ao *T. harzianum*. Para atividade sobre papel filtro e endoglicanase (Figura 19a e c) a linhagem S1B9 apresentou um comportamento semelhante, com pico de produção em 72 e 84 horas (12,43 UI.mL⁻¹ de FPAases e 77,15 UI.mL⁻¹ de endoglicanase) e um perfil cumulativo para β-glicosidase (Figura 19b) com pico no 5º dia (37,53 UI.mL⁻¹), mas com diminuição a partir das 96 horas. Para a linhagem AS5, pode-se observar que para duas das enzimas (Figura 19a e b) o pico de secreção ocorreu em 36 horas de cultivo (6,48 UI.mL⁻¹ de FPAases e 6,88 UI.mL⁻¹ de β-glicosidase) e para endoglicanase (Figura 19c) a atividade máxima foi alcançada em 60 horas (12,31 UI.mL⁻¹ de endoglicanase), destacando-se a produção de FPAases que chegou a ser maior que a do *P. echinulatum* para esse tempo (5,21 UI.mL⁻¹ de FPAases).

Com base nestes resultados, optou-se pelos tempos de 36, 48, 72 e 96 horas para coleta de amostras nos experimentos de triagem dos produtos de fusão em comparação com os parentais.

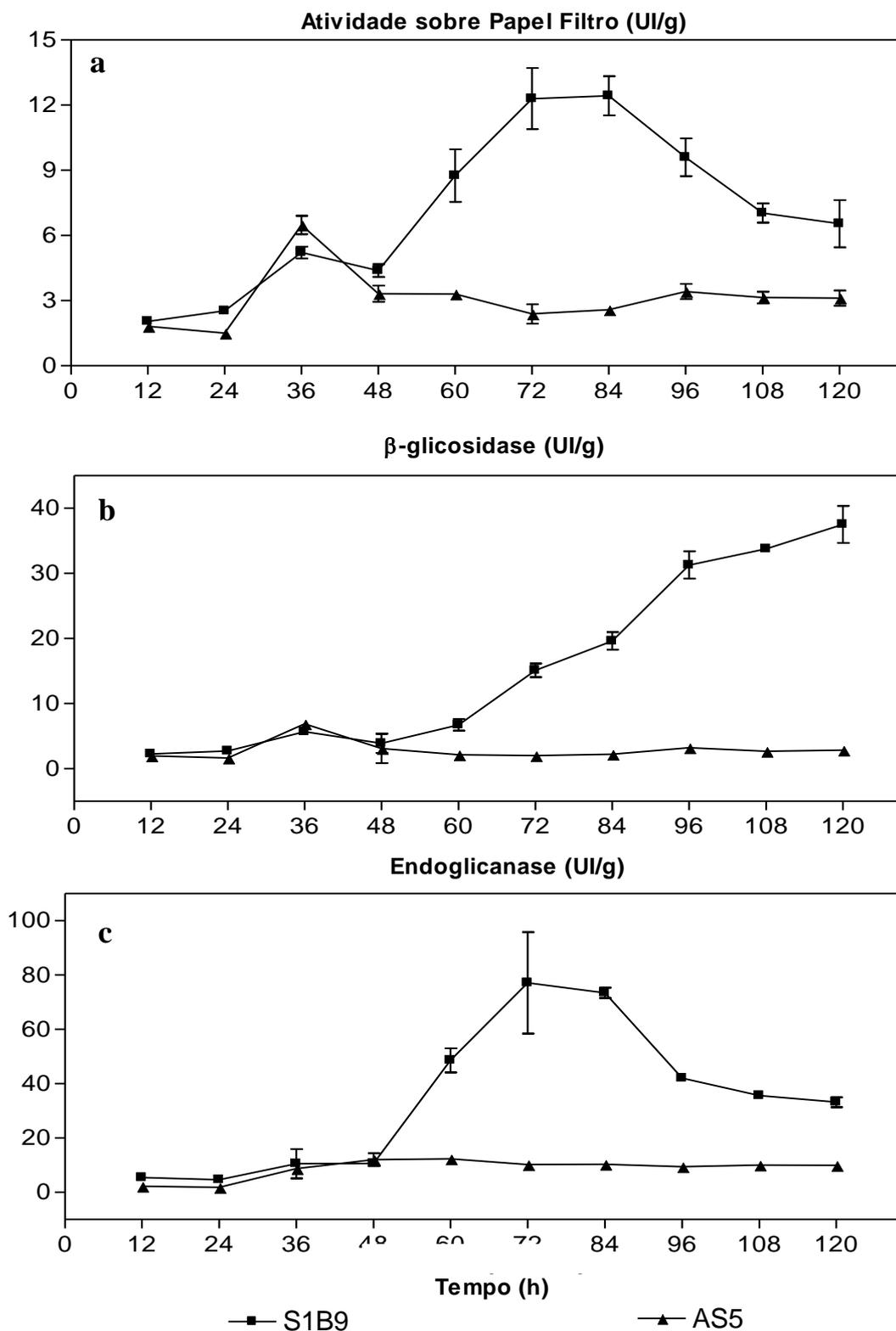


Figura 19. Atividades enzimáticas do cultivo em estado sólido dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3
a – Atividade sobre Papel Filtro (UI.g⁻¹), **b** – β -glicosidase (UI.g⁻¹), **c** – Endoglucanase (UI.g⁻¹)

4.7.2. Produção Enzimática nos Produtos de Fusão em Cultivo em Estado Sólido

Os 24 clones resultantes da fusão de protoplastos de *P. echinulatum* e *T. harzianum*, selecionados pela análise qualitativa (precocidade e eficiência na formação de halo de hidrólise de celulose em placas de Petri) tiveram seu potencial celulolítico avaliado em comparação com os parentais em cultivo em estado sólido.

Foram realizados dois experimentos de cultivo no estado sólido para fazer uma triagem nos clones selecionados, sendo que em cada um estavam presentes os parentais e mais treze clones de produtos de fusão. Os resultados de atividades enzimáticas de FPAases (a), β -glicosidase (b) e endoglicanases (c) estão mostrados nas Figuras 20 (1º experimento de triagem) e 21 (2º experimento de triagem). Os valores de pH de ambos os experimentos podem ser observados na Figura 23, juntamente com os do 3º experimento em que foram selecionados os melhores fusionantes dos experimentos anteriores, para confirmar dados.

Como pode-se observar nas Figuras 20 e 21, o parental AS5 e os clones semelhantes a *T. harzianum* apresentaram picos de atividade enzimática em 36h de cultivo para FPAases (a) e β -glicosidase (b), e entre 48 e 72h para endoglicanases (c). Comparando as atividades enzimáticas do parental com relação a estes clones, ressaltam-se os clones 22 e 25 na produção de FPAases, em 36h (Figura 20a), com aumentos de 29 e 35%, respectivamente, e os clones 25 e 26, em 48h, com acréscimo de 20 e 44%, respectivamente. O clone 17, em 36h, mostrou atividades melhores nas três enzimas avaliadas (Figura 20a, b e c) com adição de 33% para FPAases, 23% para endoglicanases e 28% para β -glicosidase, mostrando ainda atividade de β -glicosidase 36% superior ao parental em 48h. O clone 21, em 36h, mostrou atividades inferiores nas três enzimas avaliadas (Figura 21a, b e c), observando-se um atraso nos picos de atividades para 48h. Os clones 25 e 26 de morfologia intermediária (presença de micélio denso e crescimento mais lento, mais típico de *P.*

echinulatum e a esporulação verde, típica de *T. harzianum*), mostraram um padrão de atividade enzimática semelhante ao parental AS5. Em alguns momentos o clone 26 destaca-se positivamente na produção tanto de β -glicosidase (b) quanto de endoglicanases (c), apresentando produção de 7,6 UI/g de β -glicosidase até 190% maior que o parental, em 48h de cultivo. De modo geral, a produção de enzimas dos produtos de fusão é similar ao parental ao qual se assemelha morfológicamente.

Já o parental S1B9 e os clones semelhantes a *P. echinulatum* mostraram variação com picos de atividade sobre papel filtro (Figuras 20a e 21a) em 72h, β -glicosidase 96h (Figuras 20b e 21b) e endoglicanase (Figuras 20 e 21c) em 72 ou 96h. Fazendo uma análise comparativa da produção enzimática deste parental com os clones de morfologia semelhante, pode-se destacar o clone 3 que atrasou a produção de FPAase (Figura 20a), apresentando pico em 96h com incremento de 92% na produção. Com relação à β -glicosidase houve uma redução de quase metade a partir das 48h de cultivo.

No 2º experimento de triagem, houve uma diferença negativa na maioria dos clones, com relação ao parental, em 36h (Figura 21a, b e c). Em 48h de cultivo, o clone 4 destacou-se nas três enzimas, apresentando diferença com relação ao parental, com aumento de 55% em FPAases e 25% em endoglicanases. Também em 48h, os clones 7 e 14, mostraram-se diferentes pelo teste *t*, apresentando atividades sobre papel filtro superiores a do parental. O mesmo foi observado em 72h, em que os clones 4 e 13 diferiram positivamente do parental pelo teste *t*. Entre os produtos de fusão semelhantes a *P. echinulatum*, houve maior variabilidade, apresentando tanto diferenças positivas (FPAases – Figura 21a) quanto negativas (β -glicosidase – Figura 21b).

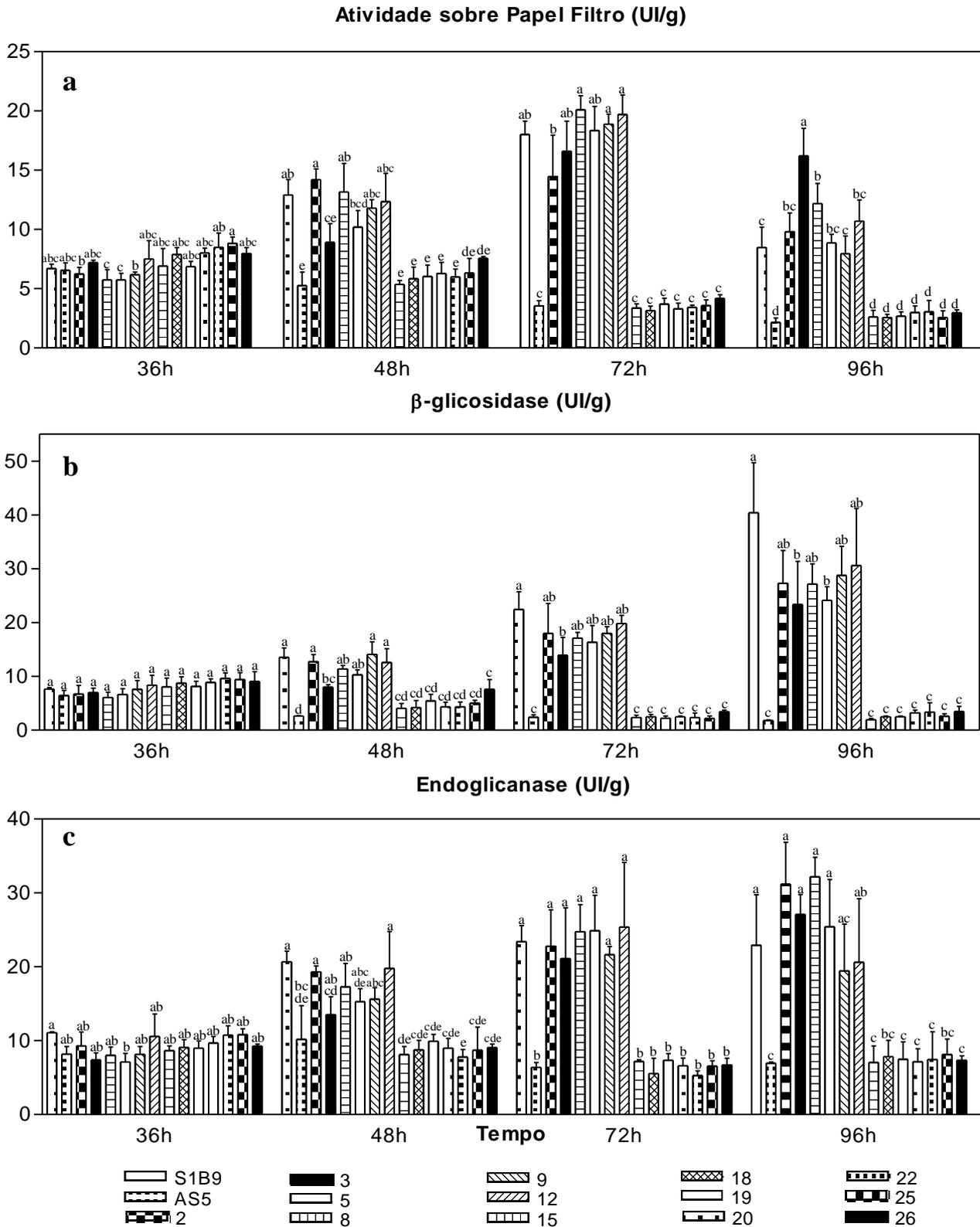


Figura 20. Atividades enzimáticas do 1º experimento de triagem em cultivo em estado sólido dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3 e seus produtos de fusão.
a – Atividade sobre Papel Filtro (UI.g⁻¹), **b** – β-glicosidase (UI.g⁻¹), **c** – Endoglucanase (UI.g⁻¹)

As médias das linhagens com as mesmas letras para um mesmo dia não diferem pelo teste de Tukey $p < 0,05$

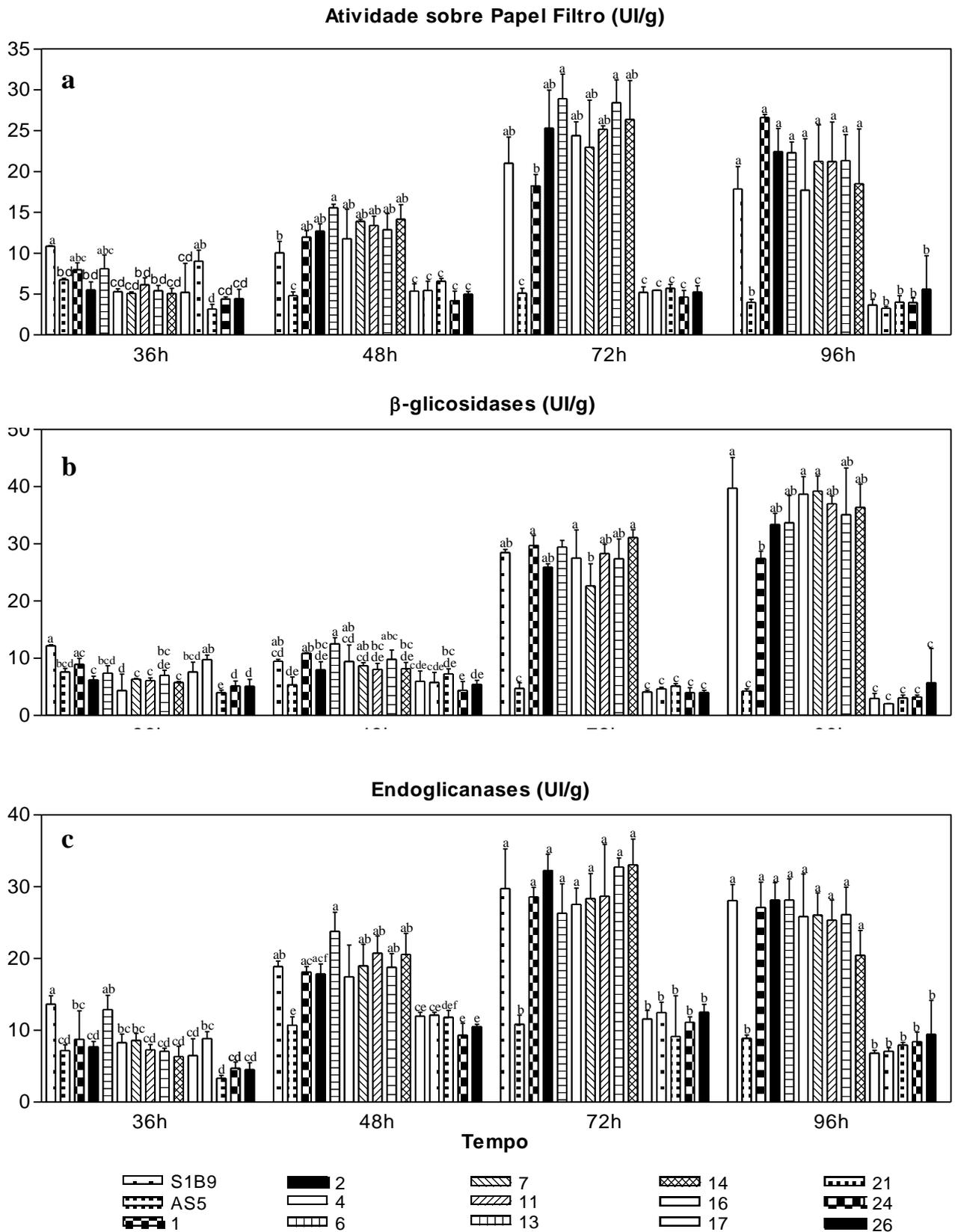


Figura 21. Atividades enzimáticas do 2º experimento de triagem em cultivo em estado sólido dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3 e seus produtos de fusão.
a – Atividade sobre Papel Filtro (UI.g⁻¹), **b** – β -glicosidase (UI.g⁻¹), **c** – Endoglicanase (UI.g⁻¹)

As médias das linhagens com as mesmas letras para um mesmo dia não diferem pelo teste de Tukey $p > 0,05$

Foram escolhidos seis clones de produtos de fusão para um novo experimento, os clones semelhantes a *P. echinulatum* – PFSA 2, 4 e 12 –, os clones semelhantes a *T. harzianum* – PFSA 17n, 17i e 19 –, como foi explicado no item 4.6.2, o clone 17i foi isolado de esporos presentes no caldo enzimático do clone 17 (agora denominado 17n), no 2º experimento de triagem em cultivo em estado sólido, por apresentar atividades superiores ao parental *Trichoderma*, para as três enzimas, em 36h. Neste terceiro experimento (Figura 22) os clones foram comparados aos parentais e à linhagem RUT C30 de *T. reesei*.

Comparando os resultados obtidos para a linhagem comercial RUT C30 com as demais linhagens, verifica-se que para atividade sobre papel filtro (Figura 22a) e β -glicosidase (Figura 22b) apresentaram um padrão de comportamento semelhante, mantendo-se praticamente estável nos quatro tempos avaliados, com atividades médias de 6,3 e 6,2 UI.g⁻¹, respectivamente. Pode-se ressaltar que para FPAases, em 36, 48 e 72h, a atividade enzimática foi similar ao parental *Trichoderma*, mostrando-se superior em 96h (59%) devido à redução apresentada pelo AS5; para β -glicosidase este comportamento repete-se, sendo comparável em 36 e 48h e mostrando atividades maiores, em 72 e 96h. Para endoglicanase, o comportamento é cumulativo, com pico de 16,3 UI.g⁻¹ em 96h, sendo significativamente superior às demais linhagens com morfologia de *Trichoderma* em 72 e 96h, com aumento de 58 e 70%, respectivamente, comparando com o parental.

Analisando-se a produção enzimática obtida pelo parental *P. echinulatum* e os produtos de fusão semelhantes a ele, verifica-se novamente um padrão semelhante para atividade sobre papel filtro e endoglicanase, com picos entre 72 e 96 horas.

Para FPAases (Figura 22a), nos dias de picos de atividades enzimáticas, os três produtos de fusão mostraram médias superiores ao parental, sendo que o clone 4 mostrou aumento significativo (21%) em 72h e o clone 2 (47%), em 96h. Nas atividades de

endoglicanases (Figura 22c), verifica-se que, em 36h, o parental apresenta o dobro da atividade que todas as outras linhagens; em 48h, as atividades já são semelhantes, apesar do clone 4 demonstrar atraso na produção enzimática, tendo títulos enzimáticos 23% menores que o parental; em 72h, este mesmo clone destaca-se sendo significativamente superior ao parental em 20%, semelhante ao clone 12, com 17%; em 96h, os três clones destacam-se com acréscimo de atividade de endoglicanase de aproximadamente 25%. Para β -glicosidase, o perfil é cumulativo, podendo-se observar apenas o clone 12 com 20% de aumento, em 48h; nos tempos de 72 e 96h o parental destaca-se, sendo semelhante somente ao clone 12, mostrando-se superior em média 20% com relação aos clones 2 e 4.

Comparando os dados obtidos pelo parental *Trichoderma* e os produtos de fusão semelhantes a ele, observa-se, de modo geral, que novamente o clone 17n destaca-se na produção de todas as enzimas (Figura 22) ainda em 36h, com atividades superiores ao parental em 51% para FPAases, 41% para β -glicosidases e 56% para endoglicanases. Os clones 17i e 19 também apresentam atividades 20% superiores para FPAases (Figura 22a) em 36h. Analisando-se a secreção de β -glicosidase (Figura 22b), ressalta-se o clone 17i por apresentar um padrão de comportamento mais estável para esta enzima, sendo similar a linhagem comercial RUT C30, enquanto as demais linhagens semelhantes à *Trichoderma* demonstram queda em 72 e 96h, apresentando atividades superiores, comparando com o parental, com aumento de 37%, em 36h; 64%, em 48h (semelhante ao parental S1B9, de *P. echinulatum*); 87%, em 72h e 128%, em 96h. Para endoglicanases (Figura 22c), observa-se um comportamento quase estável em 48 e 72h, com atividades enzimáticas semelhantes entre as linhagens, verificando-se uma diminuição no clone 17i entre 40-50%, com relação ao parental.

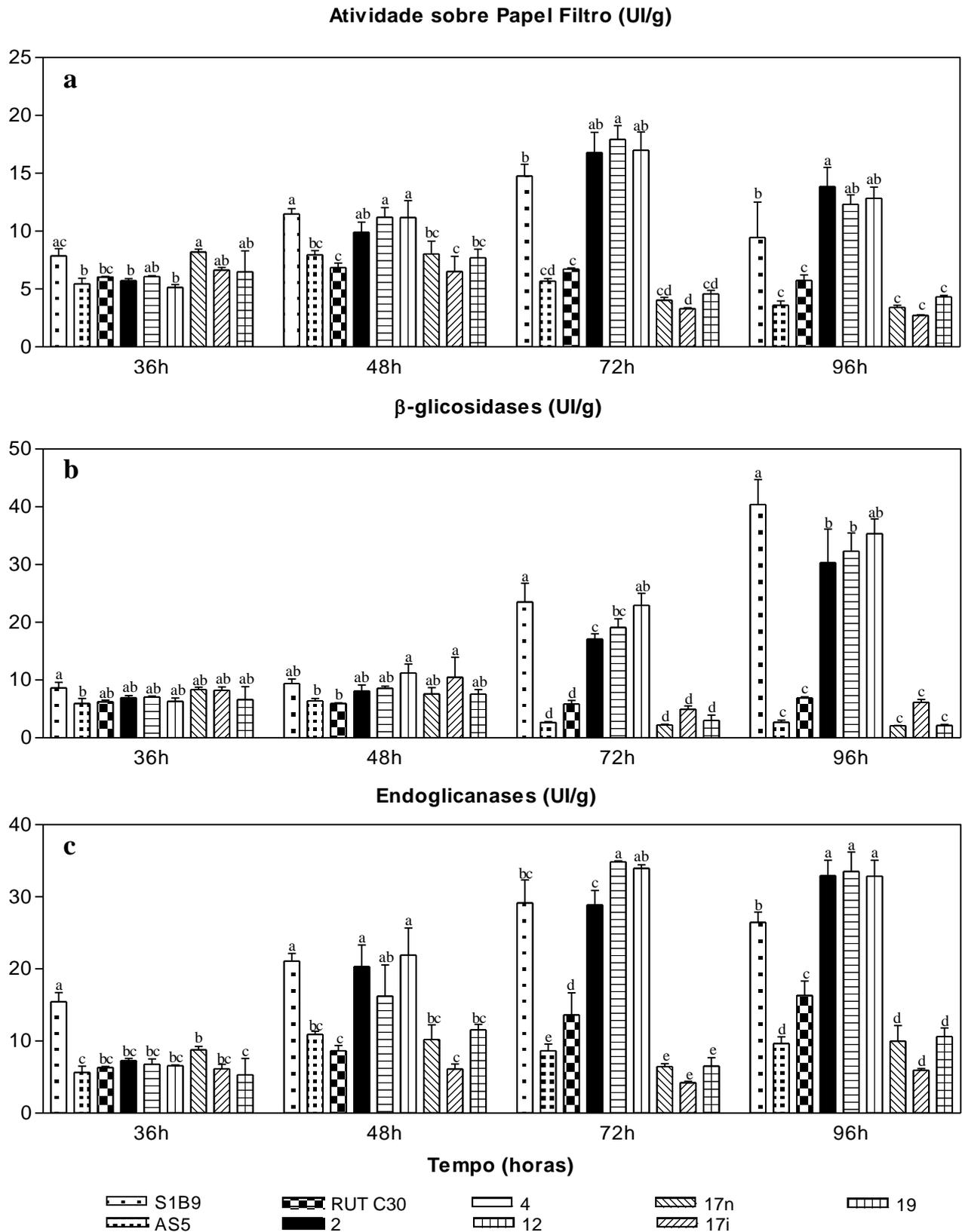


Figura 22. Atividades enzimáticas do 3º experimento de triagem em cultivo em estado sólido dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3 e seus produtos de fusão.

a– Atividade sobre Papel Filtro (UI.g⁻¹), **b**– β-glicosidase (UI.g⁻¹), **c**– Endoglicanase (UI.g⁻¹)

As médias das linhagens com as mesmas letras para um mesmo dia não diferem pelo teste de Tukey $p > 0,05$

Durante os cultivos foi medido o pH de todas as amostras, que podem indicar o crescimento fúngico, sendo os dados apresentados na Figura 23. Nos dados obtidos nos três experimentos de triagem, pode-se observar um padrão de comportamento entre o parental *T. harzianum* (AS5CH3) e os clones semelhantes a ele – 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 24, 25 e 26 – em que o pH cai, em 48h, e após se mantém em valores entre 5,0 e 6,0; e o parental *P. echinulatum* (9A02S1B9) e os clones semelhantes a ele – 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 e 14 – em que o pH cai em 36h de cultivo e depois sobe chegando a valores próximos de 7,0 às 96h.

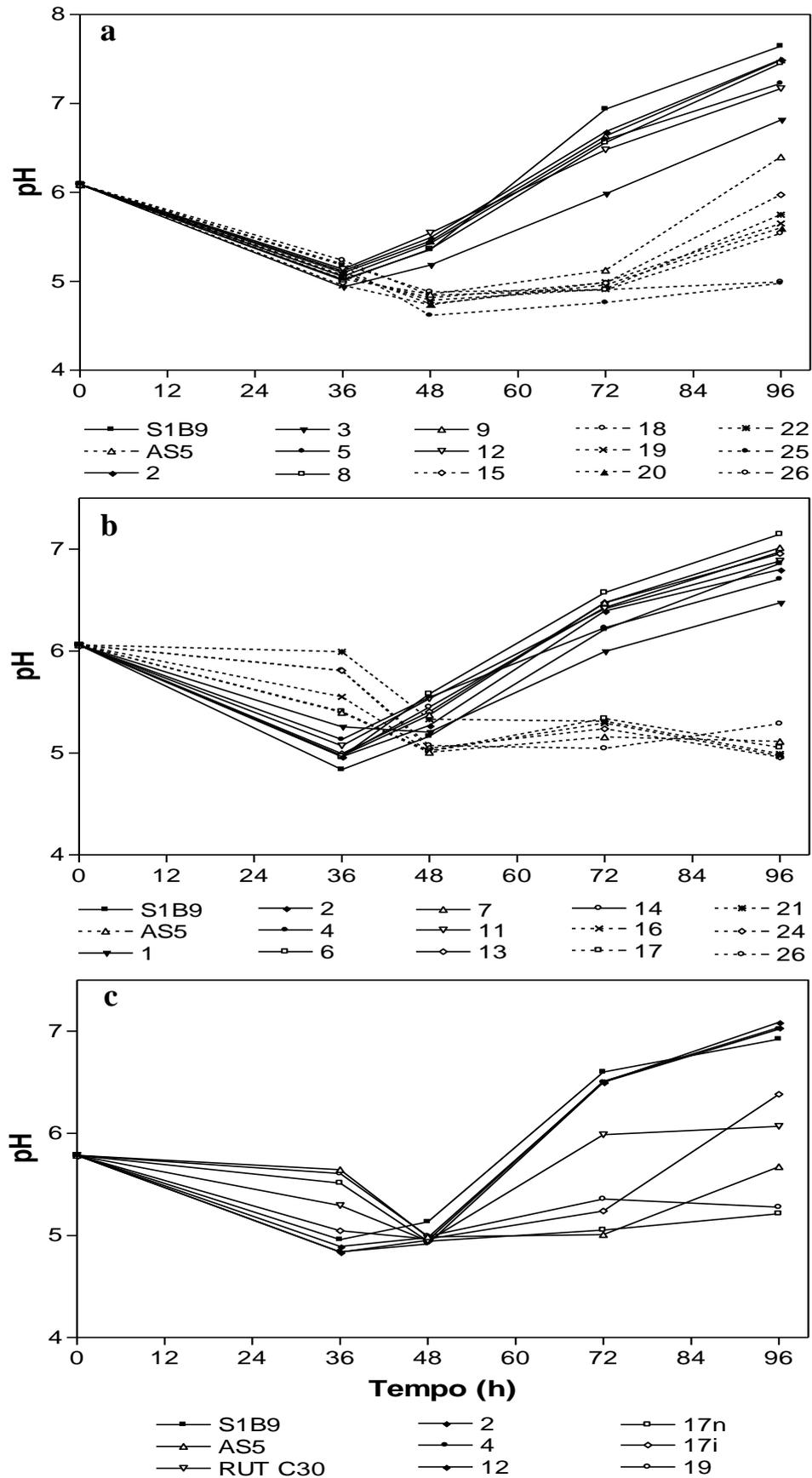


Figura 23. Valores de pH obtidos nos 1º (a), 2º (b) e 3º (c) experimentos de triagem de atividades de celulases, em cultivo em estado sólido, dos parentais *P. echinulatum* 9A02S1B9 e *T. harzianum* AS5CH3 e seus produtos de fusão.

A análise dos resultados obtidos para produção de celulases pelos produtos de fusão entre *P. echinulatum* e *T. harzianum*, obtidos tanto em cultivos submersos como nos cultivos em estado sólido, mostrando variação na secreção de FPAases, B-glicosidases e endoglicanases, e incremento na produção enzimática em alguns dos fusionantes, demonstram que a metodologia de fusão de protoplasto foi capaz de gerar linhagens recombinantes com variabilidade genética perante os parentais.

Tal como observado anteriormente (Toyama *et al.*, 1983; Toyama *et al.*, 1984; Manczinger & Ferenczy, 1985; Ogawa *et al.*, 1989; Hoh *et al.*, 1992; Prabavathy *et al.*, 2006), para outras linhagens, entre recombinantes obtidos por fusão de protoplastos podem ser encontrados fusionantes que apresentam maior quantidade de secreção de uma ou outra enzima de interesse, o que faz desta técnica um estratégia de grande potencial para ser empregada em melhoramento de fungos produtores de celulases.

5. CONCLUSÕES

O desenvolvimento do presente trabalho permitiu concluir que:

- a técnica do doador morto, utilizada em fusão de protoplastos, permite a obtenção de heterocários entre *P. echinulatum* e *T. harzianum*;
- a fusão de protoplastos entre *P. echinulatum* e *T. harzianum* permitiu a obtenção de clones com morfologia de *T. harzianum* portando a característica de resistência ao benomil, sendo capazes de crescer e esporular em meios contendo o inibidor;
- o perfil de bandas de RAPD, a produção de celulases e a morfologia das linhagens obtidas por fusão de protoplastos entre *P. echinulatum* e *T. harzianum* acompanharam o padrão apresentado por um dos parentais, acompanhando a semelhança morfológica;
- as linhagens resultantes de heterocários apresentaram variabilidade genética para produção de celulases, que foi observada tanto no halo de hidrólise de celulose em placas de Petri, quanto nos cultivos em estado sólido e submerso, com aumento em atividades sobre papel filtro, de β -glicosidase ou de endoglicanase.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ai, Y.; Teng, R.; Gaio, P.; Meng, F.; Wang, Z. (1998). The intergeneric compatibility of heredity and expression for cellulase genomes between *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*. **Life Sci.** 38: 186-192.
- Ai-Huan, S.; Hong-Ye, L.; Xiao-Hong, L. (2004). Isolation and regeneration of protoplast from *Penicillium dogitatum*. **Chin. J Agr. Biotechnol.** 1: 197-202.
- Anne, J. (1983). Protoplasts of filamentous fungi in genetics and metabolite production. **Experientia.** 46: 167-78.
- Anwar, M.N.; Suto, M.; Tomita, F. (1996). Isolation of mutants of *Penicillium purpurogenum* resistant to catabolite repression. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 45: 684-687.
- Araújo, E.F.; Coelho, J.L.C.; Dias, E.S.; Guimarães, W.V.; Silva, D.O. (1997). Production and regeneration of *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum* protoplast. **Rev. Microbiol.** 28: 116-120.
- Arsdell, J.N.V.; Kwok, S.; Schweickart, V.L.; Ladner, M.B.; Gelfand, I. (1987). Cloning, Characterization and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of endoglucanases I from *Trichoderma reesei*. **Bio/Technology.** 5: 60-66.
- Azevedo, J.L. de (1998). **Genética de Microrganismos.** Vol.1. Editora da UFG, Goiânia. 478 páginas.
- Bailey, M.J.; Nevalainen, K.M.H. (1981). Induction, isolation and testing of stable *Trichoderma reesei* mutant with improved production of solubilizing cellulase. **Enzyme Microb. Technol.** 3: 153-157.
- Baltz, R.H. (1978). Genetic recombination in *Streptomyces fradiae* by protoplast fusion and cell regeneration. **J. Gen. Microbiol.** 107: 93–102.

- Barcellos, F.G.; Pizzirani-Kleiner, A.A. (2003). Genetic characterization of somatic recombination in *Trichoderma pseudokoningii*. **Braz. J. Microbiol.** 34: 152-156.
- Barnett, C.C.; Berka, R.M.; Fowler, T. (1991). Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei*: Evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates. **Bio/Technology.** 9: 562 - 566.
- Bisaria, V.S.; Ghose, T.K. (1981). Biodegradation of cellulosic materials: Substrats, microorganisms, enzyme and products. **Enzyme Microb. Technol.** 3: 90-104.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
- Brown, J.A.; Ogawa, K.; Wood, T.M. (1986). Studies on the preparation and regeneration of protoplast from the cellulolytic fungus *Penicillium pinophilum*. **Enzyme Microb. Technol.** 9: 527-532.
- Cardoso, P.G.; Queiroz, M.V.; Pereira, O.L.; Araújo, E.M. (2007). Morphological and molecular differentiation of the pectinase producing fungi *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. **Braz. J. Microbiol.** 38: 71-77.
- Carrau, J.L.; Dillon, A.J.P.; Bertarello, A.; Dahmer, A.C.E. (1988). Produção de celulasas em mutantes de fungos celulolíticos. In: 15^o Reunião Anual de Genética de Microrganismos e Simpósio Internacional de Genética de Fungos filamentosos. **Anais.** ESALQ, USP, Piracicaba, SP.
- Carrau, J.L.; Dillon, A.J.P.; Ribeiro, R.T.; Leygue-Alba, N.M.R.; Azevedo, J.L. (1981). Produção de enzimas celulolíticas por microrganismos. In: Simpósio Internacional de Engenharia. **Anais** Genética, Piracicaba, 1981.

- Chahal, D.S. (1985). Solid–stade fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. **Appl. Environ. Microbiol.** 49: 205-210.
- Chen, X.; Romaine, C.P.; Tan, Q., Schlaghauser, B.; Ospina-Giraldo, M.D.; Royse, D.J.; Huff, D.R. (1999). PCR-Based Genotyping of Epidemic and Preepidemic *Trichoderma* Isolates Associated with Green Mold of *Agaricus bisporus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 2674-2678.
- Chiu, S.W.; Chen, M.J.; Chang, S.T. (1995). Differentiating homothallic *Volvariella* mushrooms. **Mycol. Res.** 99: 333-336.
- Dillon, A.J.P. (2000). Obtenção de linhagens para produção de celulases por fusão de protoplastos envolvendo mutantes celulolíticos de *Penicillium echinulatum* e *Trichoderma harzianum*. **Tese de doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.
- Dillon, A.J.P. (2004). Celulases. In: Said, S. e Pietro, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Editora Legis Summa, Ribeirão Preto, SP. 243-270.
- Dillon, A.J.P.; Carrau, J.L.; Ribeiro, R.T.S.; Cattânio, M.E. (1985). Isolamento de mutantes desreprimidos em uma linhagem de *Trichoderma sp* (5A) isolada do coleóptero *Passalus binominatus erosus*. In: II Seminário de Hidrólise de Biomassas. **Anais**. Maringá, 1985.
- Dillon, A.J.P.; Carrau, J.L.; Ribeiro, R.T.S.; Cattânio, M.E.; Melatti, I. (1987). Melhoramento genético de uma linhagem isolada do coleóptero *Passalus binominatus erosus*. In: 14º Reunião Anual de Genética de Microrganismos. **Anais**. Goiânia, 1987.
- Dillon, A.J.P.; Paesi-Toresan S.; Barp L.B. (1992). Isolation of cellulase producing mutants from *Penicillium sp* strains denominated 3MUV3424. **Rev. Bras. Genet.** 15: 491-498.
- Dillon, A.J.P., Zorgi, C., Camassola, M., Henriques, J.A.P. (2006). Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing

- increased cellulase and β -glucosidase activities. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 70, 740-746.
- Durand, H.; Clanet, M.; Tiraby, F. (1988). Genetic improvement of *T. reesei* for large scale cellulase production. **Enzyme Microb. Technol.** 10: 341-345.
- Durand, N.; Reymond, P.; Fèvre, M. (1993). Randomly amplified polymorphic DNA recombination following an induced parasexual cycle in *Penicillium roqueforti*. **Curr. Genet.** 24: 417-420.
- Farahnak, F.; Seki, T.; Ryu, D.D.Y.; Ogrydziak, D. (1986). Construction of lactose assimilating and high-ethanol-producing yeast by protoplast fusion. **Appl. Environ. Microbiol.** 51: 362-367.
- Farkas, V.; Labudová, I.; Bauers, S.; Ferenczy, I. (1981). Preparation of mutants of *Trichoderma viride* with increased production of cellulose. **Folia Microbiol.** 26: 105-110.
- Fennington, G.; Lupo, D.; Stutzenberger (1982). Enhanced cellulase production in mutants of *Thermoospora curvata*. **Biotechnol. Bioeng.** 24: 2487-2497.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. (1996). Introdução ao uso de marcadores moleculares em genética. 2 ed. Editora **EMBRAPA-CENARGEN**. Brasília, DF. pp. 220.
- Figueiredo, D.M.M.; Pavani, B.S.C.; Thiemann, J.E. (1985). Método em placa para seleção de linhagens celulolíticas alto-produtoras. In: Reunião Anual de Genética de Microrganismos. **Anais**. Ouro Preto, 1985.
- Fodor K; Demiri E; Alföldi L. (1978). Polyethylene glycol-induced fusion of heat-inactivated and living protoplasts of *Bacillus megaterium*. **J. Bacteriol.** 1: 68-70.
- Furlanetto, M.C.; Pizzirani-Kleiner, A.A. (1992). Intraspecific hybridization of *Trichoderma pseudokoningii* by anastomosis and protoplast fusion. **FEMS Microbiol. Lett.** 90: 191-196.

- Góes, L.B.; Costa, A.B.L.; Freire, L.L.C, Oliveira, N.T (2002). Randomly amplified polymorphic DNA of *Trichoderma* isolates and antagonism against *Rhizoctonia solani* . **Braz. Arch. Biol. Technol.** 45: 151-160.
- Hanson, L.E.; Howell, C.R. (2002). Biocontrol efficacy and other characteristics of protoplas fusants between *Trichoderma konigii* and *T. virens*. **Mycol. Res.** 3: 321-328.
- Harkki, A.; Mantyla, A.; Penttilá, M.; Muttillainen, S.; Bühler, R.; Suominen, P.; Knowles, J.; Nevalainen (1990). Genetic Engineering of *Trichoderma* to produce strains with novel cellulase profiles. **Enzyme Microb. Technol.** 13: 227-233.
- Hatvani, L.; Manczinger, L.; Kredics, L.; Szekeres, A.; Antal, Z.; Vágvölgyi, C. (2006). Production of *Trichoderma* strains with pesticide-polyresistance by mutagenesis and protoplast fusion. **Ant. van Leeuwen.** 89: 387-393.
- Hayashida, S.M.O.K. (1986). Production and characteristics-negative *Humicola grisea* var. *thermoidea* mutant. **Appl. Environ. Microbiol.** 51: 1041-1046.
- Heightman, T.D.; Vasella, A.T. (1999). Recent insights into inhibition, structure and mechanism of configuration retaining glycosidases. **Angew. Chem. Int. Ed.** 38: 750-770.
- Henriksson, H. (2000). Cellobiohydrolase 58 (P.c Cel 7D) is complementary to the homologous CBH I (T.r. Cel 7A) in enantioseparations. **J. Chromatog. A.** 898: 63-74.
- Hoh, Y.K.; Tan, T.K.; Yeoh, H. (1992). Protoplast fusion of β -glucosidase producing *Aspergillus niger* strains. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 37: 81-88.
- Joglekar, A.V.; Karanth, N.G. (1984). Studies on cellulase production by a mutant *Penicillium funiculosum* UV-49. **Biotechnol. Bioeng.** 26:1079-1084.
- Khattab, A.A.; Bazaraa, W.A. (2005). Screening, mutagenesis and protoplast fusion of *Aspergillus niger* for the enhancement of extracellular glucose oxidase production. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 32: 289-294.

- Kattabi, N.; Ezzahiri, B.; Louali, L.; Oihabi, A. (2001). Effect of fungicides and *Trichoderma harzianum* on sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathol. Mediterr.** 40: 143-148.
- Kim B.K.; Kang J.H.; Jin, M.; Kim H.W.; Shim M.J.; Choi E.C. (2000). Mycelial protoplast isolation and regeneration of *Lentinus lepideus*. **Life Sci.** 66: 1359-67.
- Kishida, M.; Mugurama, T.; Sakanaka, K.; Katsuragi, T.; Sakay, Y. (1996). Chromosomal deletion or rearrangement in chimeric hybrids of *Saccharomycopsis fibuligera* and *Saccharomyces diastaticus* obtained by cell fusion. **J. Ferment. Bioeng.** 81: 281-285.
- Kolar, H.; Mischak, H.; Kammel, W.P.; Kubicek, C.P. (1985). Carboxymethylcellulase and β -glucosidase secretion by protoplast of *Trichoderma reesei*. **J. Gen. Microbiol.** 131: 1339-1347.
- Kumari, J.A.; Panda, T. (1994). Intergeneric hybridization of *Trichoderma reesei* QM9414 and *Saccharomyces cerevisiae* NCIM 3288 by protoplast fusion. **Enzyme Microb. Technol.** 16: 870-881.
- Kwan, H.K.; Chiu, S.; Pang, K.; Cheng, S. (1992). Strain typing in *Lentinula edodes* by polymerase chain reaction. **Experim. Mycol.** 16: 163-166.
- Lachke, A.H.; Bastawde, K.B.; Powar, V.K.; Srinivasan, M.C. (1986). Isolation of hypercellulolytic mutant (CU-1) of *Penicillium funiculosum*. **Enzyme Microb. Technol.** 8: 105-108.
- Lakshmi, B.R.; Chandra T.S. (1993). Rapid release of protoplasts from *Eremothecium ashbyii* in comparison with *Trichoderma reesei* and *Penicillium chrysogenum* using Novozime and Funcelase. **Enzyme Microb. Technol.** 15: 699-702.
- Macris, B.J. (1984). Enhanced cellulase and beta-glucosidase production by a mutant of *Alternaria alternata*. **Biotechnol. Bioeng.** 26: 194-196.

- Manczinger, L.; Ferenczy, L. (1985). Somatic cell fusion of *Trichoderma reesei* resulting in new genetic combination. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 22: 72-76.
- Mandels, M.; Reese, E.T. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. **J. Bacteriol.** 73: 269-278.
- Mandels, M.; Andreotti, R.; Roche, C. (1976). Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** 6: 21-33.
- Mandels, M. (1982). Celulases. In: **Anual Reports on Fermentation Process**. Ed. G. T. Tsao. 35-78.
- Marchi, C. E.; Borges, M.F.; Brommonscheke, S.H. (2006). Obtenção de protoplastos de *Botryosphaeria* sp. **Ci. Biol. Saúde.** 12 : 23-32.
- Martins, C.V.B.; Horii, J.; Pizzirani-Kleiner, A.A. (1998). Fusão de protoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* avaliada por floculação e produção de H₂S. **Sci. Agric.** 55: 64-72.
- Martins, C.V.B.; Horii, J.; Pizzirani-Kleiner, A.A. (1999). Characterization of fusion protoplast of yeast and their segregants by electrophoretic karyotyping and RAPD. **Rev. Microbiol.** 30 71-76.
- Meza, V.; Moreno, P.; Tengerdy, R.P.; Gutierrez-Correa, M. (1995). Transfer of a benomyl resistance marker by heat-inactivated *Trichoderma reesei* protoplast. **Biotechnol. Lett.** 17: 827-832.
- Miettinen-Oinonen, A.; Suominen, P. (2002). Enhanced production of *Trichoderma reesei* endoglucanases and use of the new cellulase preparations in producing the stonewashed effect on denim fabric. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 3956-3964.
- Miettinen-Oinonen, A.; Torkkeli, T.; Paloheimo, M.; Nevalainen, H. (1997). Overexpression of the *Aspergillus niger* pH 2.5 acid phosphatase gene in heterologous host *Trichoderma reesei*. **J. Biotechnol.** 58: 13-20.

- Moloney, A.P.; Hackett, T.J.; Considini, P.J.; Coughlan, M.P. (1983). Isolations of *Talaromyces emersonii* CBS 814.70 with enhanced cellulase activity. **Enzyme Microb. Technol.** 5: 260-264.
- Montenecourt, B.S.; Eveleigh, D.E. (1977a). Semiquantitative Plate Assay for Determination of Cellulase Production by *Trichoderma viride*. **Appl. Environ. Microbiol.** 33: 178-183.
- Montenecourt, B.D.; Eveleigh, D.E. (1977b). Preparation of Mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. **Appl. Environ. Microbiol.** 33: 777-782.
- Montenecourt, B.S.; Eveleigh, D.E. (1979). Mechanisms controlling the synthesis of the *Trichoderma reesei* cellulase system. **Microbial polysacch. Polysacch. Academic Press.** 14: 327-337.
- Mostafa, M.; Reza, Z.M.; Omid, J.; Javad H.M. (2002). Use of RAPD, enzyme activity staining, and colony size to differentiate phytopathogenic *Fusarium oxysporum* isolates from Iran. **Braz. J. Microbiol.** 33: 299-303.
- Nevalainen, H.; Penttilä, M. E.; Harkki, A.; Teeri, T.T.; Knowles, J. (1990). The molecular biology of *Trichoderma* and its application to the expression of both homologous and heterologous genes. In: **Mol. Ind. Mycol.** Ed. S.A. Leong., R. M. Beek., M. Dekker, 129-148.
- Ochi, K. (1982). Protoplast fusion permits high-frequency transfer of a *Streptomyces* determinant which mediates actinomycin synthesis. **J. Bacteriol.** 150: 592-597.
- Ogawa, K.; Brown, A.; Wood, T.M. (1987). Intraspecific hybridization of *Trichoderma reesei* QM9414 by protoplast fusion using colour mutants. **Enzyme Microb. Technol.** 9: 527-532.
- Ogawa, K.; Ohara, H.; Koide, T.; Toyama, N. (1989). Intraspecific hybridization of *Trichoderma reesei* by protoplast fusion. **J. Ferment. Bioeng.** 67: 207-209.

- Ogawa, K.; Yoshida, N.; Gesnara, W.; Omumasaba, C.A.; Chamuswarng, C. (2000). Hybridization and breeding of the benomyl resistant mutant, *Trichoderma harzianum* antagonized to phytopathogenic fungi by protoplast fusion. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 64: 833-836.
- Papavizas, G.C.; Lewis, J.A.; Moity, T.H.A.E. (1982). Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. **Phytopathol.** 72: 126-132.
- Park, J.; Park, K. (2001). Improvement of the physical properties of reprocessed paper by using biological treatment with modified cellulase. **Bioresouce Technol.** 79: 91-94.
- Peberdy, J.F. (1989). Fungi without coats-protoplasts as tools. for mycological research. **Mycol. Res.** 93: 1-20.
- Penttilä, M.E.; André, L.; Saloheimo, M.; Lehtovaara, P.; Knowles, J.K.C. (1987). Expression of two *Trichoderma reesei* endoglucanases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast.** 3: 175-185.
- Penttilä, M.E.; André, L.; Lehtovaara, P.; Bailey, M.; Teeri, T.; Knowles, J.K.C. (1988a). Efficient secretion of two fungal cellobiohydrolase by *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene.** 63: 103-112.
- Pereira, J.F.; Queiroz, M.V.; Gomes, E.A.; Muro-Abad, J.I.; Araújo, E.F. (2002). Molecular characterization and evaluation of pectinase and cellulase production of *Penicillium* spp. **Biotechnol. Lett.** 24: 831-838.
- Prabavathy, V.R.; Mathivanan, N.; Sagadevan, E.; Murugesan, K.; Latithakumari, D. (2006). Intra-strains protoplast fusion enhanced carboxymethylcellulose activity in *Trichoderma reesei*. **Enzyme Microb. Technol.** 38: 719-723.

- Prabavathy, V.R.; Mathivanan, N.; Sagadevan, E.; Murugesan, K.; Latithakumari, D. (2006). Self-fusion of protoplast enhances chitinase production and biocontrol activity I *Trichoderma harzianum*. **Bioresource Technol.** 97: 2330-2334.
- Ribeiro, R.T.; Suzin V.F.; Passos, J.B.; Dillon, A.J.P.; Carrau, J.L. (1983). Desrepressão parcial à glicose em mutantes obtidos da linhagem 2HH de *Penicillium* sp, produtora do complexo celulolítico. In: 10º Reunião anual de Genética de Microrganismos e 2º Simpósio de Enologia e Viticultura. **Anais.** Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Saloheimo, M.; Lehtovaara P.; Pentillä, M.; Teeri, T.T.; Stahlberg, J.; Johansson; Pettersson, G.; Claeysens, M.; Tomme, P.R.; Knowles, J.K.C. (1988). EGIII, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the characterization of both gene and enzyme. **Gene.** 63: 11-21.
- Saloheimo, M.; Henrissat, B.; Hoffrén, A.M.; Teleman, O.; Pentillä, M. (1994). A novel, small endoglucanase gene, *egl5*, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast. **Mol. Microbiol.** 13: 219-228.
- Sariah, M.; Choo, C.W.; Zakaria, H.; Noriah, M.S. (2005). Quantification and characterization of *Trichoderma* spp. from different ecosystems. **Mycopathologia.** 159: 113-117.
- Shoemaker, S.P.; Raymond, J.C.; Bruner, R. (1981). Cellulase: Diversity amongst improved *Trichoderma* strains. In: Trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals (Hollander, A.ed.) Basic life Science. **Plenum Pub. Company.** 18: 89-109.
- Shoemaker, S.; Schweickart, V.; Ladner, M.; Gelfand, D.; Kwork, S.; Myambo, K.; Innis, M. (1983). Molecular cloning of exocellobiohidrolase I derived from *Trichoderma reesei* strain L27. **Bio/Technology.** 1,691-1983.
- Silva, A.C.F.; Rosa, C.R.E.; Melo, I.S. (1999). Sensibilidade de isolados de *Trichoderma* spp. a benomil e iprodione. **Ciênc. Rural.** 29: 395-399.

- Silva, I.F. (1996). Caracterização genética por RAPD de recombinantes em *Trichoderma pseudokoningii*. **Tese de doutorado**. ESALQ/USP, Piracicaba, Brasil.
- Solís, M.; Flores, M.E.; Huitrón, C. (1997). Improvement of pectinase production by interspecific hybrids of *Aspergillus* strains. **Letters Appl. Microbiol.** 24: 77-81.
- Spagna, G. (1998). A simple method for purifying glycosidases: α -L-arabinofuranosidase and β -D-glucopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of wine. Part I. **Enzyme Microbiol. Technol.** 22: 298-304.
- Sternberg, D.; Dorval, S. (1979). Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. **Biotechnol. Bioeng.** 21: 181-191.
- Taski-Adjukovic, K.; Vasic, D.; Nagl, N. (2006). Regeneration of interspecific somatic hybrids between *Helianthus annuus L.* and *Helianthus maximiliani* (Schrader) via protoplast electrofusion. **Plant. Cell. Rep.**
- Teeri, T.; Salovuori, L.; Knowles, J. (1983). The molecular cloning of the major cellulase gene from *Trichoderma reesei*. **Bio/Technology.** 1,696-1983.
- Toss E.; Meneghetti, L.E.; Dillon, A.J.P. (1995a). Seleção de mutantes para a produção de celulasas em *Trichoderma* sp, após crescimento de conídios tratados com HCl. 20^a Reunião Anual de Genética de Microrganismos. **Anais**. Piracicaba, São Paulo, Brasil.
- Toss, E.; Meneghetti, L; Dillon, A.J.P. (1995b). Melhoramento genético na linhagem de *Trichoderma* sp B72.36S. **41º Congresso Nacional de Genética**. Caxambú, Minas gerais, Brasil.
- Toyama, H.; Shinmyo, A.; Okada, H. (1983). Protoplast formation from conidia of *Trichoderma reesei* by cell wall lytic enzymes of strain of *Trichoderma viride*. **J. Ferment. Technol.** 61: 409-411.
- Toyama, H.; Yamaguchi, K.; Shinmyo, H.; Okada, H. (1984). Protoplast fusion of *Trichoderma reesei*, using immature conidia. **Appl. Environ. Microbiol.** 47: 363-368.

- Toyama, H.; Toyama, N. (1990). Autopolyploid formation of *Trichoderma reesei* QM9414 by colchicine treatment. **J. Ferment. Bioeng.** 69: 51-53.
- Toyama, H.; Toyama, N. (1991). Nuclear abnormality of conidia induced by colchicine in *Trichoderma reesei* QM9414. **Agric. Biol. Chem.** 55: 2393-2394.
- Toyama, H.; Toyama, N. (1995). Multinucleation in the conidia of polyploids derived from *Trichoderma reesei* QM9414 by colchicine treatment. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 15: 121-124.
- Varavallo, M.A.; Queiroz, M.V.; Lana, T.G.; Brito, A.T.R.; Gonçalves, D.B.; Araújo, E.F. (2007). Isolation of recombinant strains with enhanced pectinase production by protoplast fusion between *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. **Braz. J. Microbiol.** 38: 52-57.
- Varavallo, M.A.; Queiroz, M.V.; Pereira, J.F.; Araújo, E.F. (2004). Isolation and regeneration of *Penicillium brevicompactum* protoplasts. **Acta Scientiarum. Biol. Scienc.** 4: 475-479.
- Vazquez, F.; Heluane, H.; Spencer, J.F.T.; Spencer, D.M.; Figueroa, L.I.C. (1997). Fusion between *Pichia stipitis* and isolated filamentous fungi nuclei. **Enzyme Microb. Technol.** 21: 32-38.
- Zhang, Y.X.; Perry, K.; Vinci, V.A.; Powell, K.; Stemmer, W.P.; del Cardayre, S.B. (2002). Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. **Nature.** 415: 644-646.
- Ward, M.; Wu, S.; Dauberman, J.; Weiss, G.; Larenas, E.; Bower, B.; Rey, M.; Clarkson, K.; Bott, R. (1993). Cloning, sequence and preliminary structural analysis of a small, high pH endoglucanase (EGIII) from *Trichoderma reesei*, In: Reinikainen T, Suominen P (eds). **Proc 2nd Tricel Meeting**, Majvik, Finland 1993. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research. 8: 153-158.

Yoo, Y.D.; Pack, M.Y. (1992). Simultaneous production of endoglucanase and β -glucosidase using synthetic two cistron genes. **Biotechnol. Lett.**14: 77-82.